



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO DISTRITO
FEDERAL**

RAFAELA MAGALHÃES BARROS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

**BRASÍLIA-DF
FEVEREIRO/ 2011**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO DISTRITO
FEDERAL**

RAFAELA MAGALHÃES BARROS

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRCIO BOTELHO DE CASTRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 037/11

**BRASÍLIA-DF
FEVEREIRO/ 2011**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

BARROS, R. M. **Caracterização Histopatológica da Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 103 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor a Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Barros, Rafaela Magalhães

Caracterização histopatológica da Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal. / Rafaela Magalhães Barros orientação de Márcio Botelho de Castro – Brasília, 2011. 102 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

1. Leishmaniose visceral. 2. histopatologia. 3. Cão 4. Diferentes órgãos.
I. BARROS, R. M. II. Título.

CDD ou CDU
Agris / FAO



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

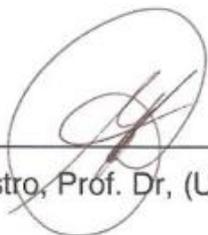
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA NO DISTRITO FEDERAL**

RAFAELA MAGALHÃES BARROS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADO POR:



Márcio Botelho de Castro, Prof. Dr. (Universidade de Brasília)



Luciana Sonne, Prof^a. Dr^a. (Universidade de Brasília)



Ana Carolina Mortari, Prof^a. Dr^a. (Universidade de Brasília)

Brasília-DF, 10 de Fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me dar forças para alcançar mais esta conquista.

Aos meus pais, Sergio e Doris, por todo carinho, apoio e confiança. Especialmente minha mãe por ter dedicado sua vida em educar suas filhas e hoje pelo amor incondicional demonstrado aos netos. Obrigada mãe por cuidar dos meus filhos como se fossem as jóias mais preciosas desse mundo. Por abdicar de fazer todas as suas obrigações cuidando dessas crianças, por se mostrar sempre disponível. Por entender o meu desespero em terminar a dissertação, sem ter outra pessoa para auxiliar com os pequeninos.

Aos meus filhos, Sarah e Isaac, grande razão da minha vida. Por tornarem meus dias mais felizes. Por me presentear com cada sorriso, abraço, cada gesto de amor, irei amá-los sempre. Peço desculpas por ter sido ausente durante esses últimos meses. Tudo isso, porque quero ser um dia motivo de orgulho para vocês.

Ao meu esposo Raul, por toda paciência. Por ter me ajudado com as porcentagens deste trabalho, mesmo com a rotina pesada do dia a dia. Por ter suportado minha ausência, até mesmo nas madrugadas durante todo este tempo. A minha irmã, Roberta Viviane por todo apoio, incentivo e por saber esperar.

Ao professor Marcio pela orientação e por ter me propiciado a oportunidade de realizar o grande sonho do mestrado. Ao professor Rafael por todo apoio estatístico, por toda atenção dedicada a uma pessoa desconhecida. A colega Isabela pela prontidão e apoio demonstrado quando sua ajuda foi solicitada.

A eterna amiga Fabiana Elias, por acreditar em mim. Por ter me ensinado tanto. Por ter sido orientadora de graduação, de residência e agora de vida. Por estar sempre disposta a ajudar.

As amigas Patovets Vanessa, Mirna e Cris por me incentivarem com palavras sábias e animadoras e por fazerem acreditar que eu poderia conseguir. A amiga Anahi pela torcida e por entender todas as lágrimas de desespero.

A professora Roselene Ecco, quem me fez descobrir o amor pela patologia, pelo incentivo à pesquisa e pelo carinho depositado em mim.

A toda equipe do laboratório, pelo apoio na confecção das lâminas.

Meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente participaram da concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I	1
Introdução	1
Referencial teórico	3
Objetivos	8
Geral	8
Específico	8
Referências	09
CAPÍTULO II	15
1. Introdução	15
2. Materiais e métodos	17
2.1 Animais	17
2.2 Colheita de material e procedimento histopatológico	17
2.3 Avaliação histopatológica	18
2.3.1 Linfonodo	18
2.3.2 Fígado	19
2.3.3 Baço	19
2.3.4 Pele	19
2.3.5 Rim	19
2.3.6 Olho	19
2.3.7 Pulmão	19
2.3.8 Intestino	20
2.3.9 Estômago	20
2.3.10 Tecido Nervoso	20
2.4 Análise estatística	20
3. Resultados	21
3.1 Alterações histológicas nos Linfonodos	22

3.2 Alterações histológicas no fígado	28
3.3 Alterações histológicas no baço	33
3.4 Alterações histológicas na pele	36
3.5 Alterações histológicas no rim	41
3.6 Alterações histológicas no olho	44
3.7 Alterações histológicas no pulmão	19
3.8 Alterações histológicas no intestino	53
3.9 Alterações histológicas no estômago	55
3.10 Alterações histológicas no tecido nervoso	57
4. Discussão	60
5. Conclusão	82
6. Referências	83
CAPÍTULO III	101
Considerações Finais	101

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: Valores de p para associação de maior carga parasitária em tecidos de cães com baixo grau de inflamação levando em consideração a significancia acima de 3,841. 22
- TABELA 2: Resultados da avaliação histopatológica de linfonodos (pré-escapulares, axilares e poplíteos) de 58 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010). 25
- TABELA 3: Resultados da avaliação histopatológica do fígado de 57 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina, no Distrito Federal (Brasília, 2010). 30
- TABELA 4: Resultados da avaliação histopatológica do baço de 57 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010). 34
- TABELA 5: Resultados da avaliação histopatológica da pele de 45 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010). 37
- TABELA 6: Resultados da avaliação histopatológica do rim de 61 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010). 42
- TABELA 7: Resultados da avaliação histopatológica do olho de 36 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010). 46

TABELA 8:	Resultados da avaliação histopatológica do pulmão de 59 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina (Brasília, 2010).	51
TABELA 9:	Resultados da avaliação histopatológica do intestino de 61 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina (Brasília, 2010).	54
TABELA 10:	Resultados da avaliação histopatológica no estômago de 56 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina (Brasília, 2010).	55
TABELA 11:	Regiões do tecido nervoso com infiltrado inflamatório, de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010).	58
TABELA 12:	Resultados da avaliação histopatológica do tecido nervoso de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010).	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Infiltrado inflamatório acentuado em cápsula de linfonodo de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).	26
FIGURA 2:	Infiltrado inflamatório em cápsula de linfonodo, com formas amastigotas de <i>Leishmania spp</i> , dentro e fora do citoplasma de macrófagos, em um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).	26
FIGURA 3:	Histiocitose sinusal em linfonodo de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).	27
FIGURA 4:	Amastigotas no citoplasma de macrófagos na região da histiocitose sinusal em linfonodo de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).	27
FIGURA 5:	Infiltrado inflamatório periportal associado com granuloma intralobular em fígado de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).	31
FIGURA 6:	Formação de granuloma intralobular em fígado de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).	31
FIGURA 7	Formas amastigotas de <i>Leishmania spp</i> em fígado de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).	32
FIGURA 8:	Formas amastigotas no baço de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).	34
FIGURA 9:	Periesplenite no baço de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010). (A) visualização da periesplenite no aumento de 40x. (B) Visualização da periesplenite no aumento de 400x.	35
FIGURA 10:	Histiocitose no baço de um cão com LVC (HE – Brasília, 2010).	35
FIGURA 11:	Infiltrado inflamatório difuso na derme de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).	38
FIGURA 12:	Formas amastigotas, dentro e fora de macrófagos, na derme de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).	38
FIGURA 13:	Freqüência das glomerulopatias em 61 cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral – Brasília, 2011.	40

- FIGURA 14: Glomerulonefrite membranoproliferativa em um cão com Leishmaniose Visceral Canina (Brasília, 2010) **A.** Proliferação e aumento da celularidade mesangial; espessamento da parede capilar glomerular com diminuição de sua luz (seta). Coloração HE. **B.** Espessamento e duplicação da membrana basal dos capilares glomerulares (seta). Coloração PAMS. 43
- FIGURA 15: Glomerulonefrite membranosa em cão com leishmaniose visceral canina. (Brasília, 2010) **A.** Espessamento da parede capilar glomerular com diminuição de sua luz (seta). Coloração HE. **B.** Depósito de material PAS positivo ao redor de alças capilares (seta). Coloração PAS 43
- FIGURA 16: Infiltrado inflamatório perivascular no olho de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010). 47
- FIGURA 17: Infiltrado inflamatório na conjuntiva bulbar do olho de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010). 47
- FIGURA 18: Infiltrado inflamatório em córnea do olho de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010). 48
- FIGURA 19: Inúmeras formas amastigotas no olho de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010). 48
- FIGURA 20: Infiltrado inflamatório histioplasmocítico perivascular no pulmão de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010). 52
- FIGURA 21: Amastigotas (setas) associadas ao infiltrado inflamatório histioplasmocítico perivascular no pulmão de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010). 52
- FIGURA 22 Placa de Peyer aumentada no intestino de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010). 54
- FIGURA 23: Mineralização na mucosa gástrica de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010). 56
- FIGURA 24: Presença de infiltrado inflamatório perivascular no tecido nervoso de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010) 59

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose de grande impacto na saúde pública. No Brasil, a enfermidade encontra-se amplamente difundida, sendo considerada endêmica no Distrito Federal. É uma doença progressiva crônica que é frequentemente fatal. Atualmente é considerada uma das seis principais doenças endêmicas de prioridade no mundo. Os cães são um dos reservatórios domésticos do parasita e a principal fonte na infecção para humanos. A fim de avaliar o papel do cão no ciclo de infecção da LVC, todas as manifestações da doença devem ser conhecidas, como a extensão e a progressão das lesões em vários órgãos comprometidos. Apesar da LVC ser uma doença sistêmica severa, existem poucos estudos descrevendo padrões histológicos detalhados de distintos tecidos afetados pelo parasita. Com isso o objetivo do trabalho foi determinar as principais características histopatológicas nos linfonodos, fígado, baço, rim, pele, olho, pulmão, intestino, estômago e tecido nervoso de animais diagnosticados com LV. Descrevendo a forma de distribuição e tipo de infiltrado nos diferentes órgãos, avaliando a presença de amastigotas nos tecidos e analisando outros achados microscópicos associados à enfermidade. Em virtude da necessidade de notificação compulsória da doença, o diagnóstico da LV deve ser feito da forma mais precisa possível. Compreendendo as lesões da leishmaniose nos diferentes órgãos, é possível traçar estratégias para pesquisar as diferenças fundamentais entre animais sintomáticos e assintomáticos, com vistas à vigilância epidemiológica eficaz e ao controle da disseminação da doença. O cão serve como um excelente modelo para o estudo da LV em seres humanos, uma vez que a doença é causada pelo mesmo agente que desvenda alterações semelhantes. Por conseguinte, prejuízo em cães pode ser considerado um parâmetro a ser usado para avaliar a doença em seres humanos.

Palavra chave: leishmaniose visceral, histopatologia, cães.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a zoonosis of major public health impact. In Brazil, the disease is widespread and is considered endemic in the Distrito Federal. It is a chronic progressive disease that is often fatal and presents a wide spectrum of pathological events. Currently, is considered one of the six main priority endemic diseases in the world. Dogs are domestic reservoirs of the parasite and the main source for the infection to humans. To assess the role of dogs in the infection cycle of CVL, all manifestations of the disease must be known, since clinical and pathological features to the extent and progression of lesions in various organs affected. Despite the CLV being a severe systemic disease, there are few studies describing detailed histologic patterns in distinct compartments affected by the parasite. The aim of this study was to determine the main histopathologic features in lymph nodes, liver, spleen, kidney, skin, eye, lung, intestine, stomach and nervous tissue of animals diagnosed with VL. Describing the distribution and type of infiltration in different organs, evaluating the presence of amastigotes in the tissues and analyzing other microscopic findings associated with illness. Because of the need for mandatory reporting of disease, the diagnosis of VL should be done as accurately as possible. Understanding the lesions of leishmaniasis in different organs, it is possible to devise strategies to search for the fundamental differences between symptomatic and asymptomatic animals, with a view to effective surveillance and control the spread of disease. The dog serves as an excellent model for the study of VL in humans since the disease is caused by the same agent that reveals similar changes. Therefore, loss in dogs can be considered a parameter to be used to evaluate the disease in humans.

Keywords: visceral leishmaniasis, histopathology, dogs.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença de potencial zoonótico com grande impacto na saúde pública e de distribuição mundial causada por protozoários do gênero *Leishmania* (ALVES *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2008). No Brasil, a enfermidade encontra-se amplamente difundida, sendo causada pelo protozoário *Leishmania infantum chagasi*, o qual é transmitido pela picada de flebotomíneos, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie de vetor envolvida (SANTOS *et al.*, 2010).

Compreendendo uma das seis endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (OMS) devido ao seu caráter endêmico em várias regiões do mundo (GONTIJO E MELO, 2004; MOREIRA *et al.*, 2010), a LVC vem se tornando um importante problema de saúde pública (MONTEIRO *et al.*, 2005). Atualmente é considerada como uma doença emergente e reemergente, tanto em zonas rurais como urbanas (HUEB *et al.*, 2000). Inicialmente a LVC tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas

urbanas de médio e grande porte, sendo também conhecida por calazar, barriga d'água, entre outras denominações menos conhecidas (BRASIL, 2003).

Devido à grande variedade de sinais da doença e à grande porcentagem de cães assintomáticos, o diagnóstico clínico da LVC constitui-se muitas vezes em um desafio para o médico veterinário (SILVA *et al.*, 2006). Até o momento não está disponível teste diagnóstico que apresente 100% de especificidade e sensibilidade para a doença. Em virtude da necessidade de notificação compulsória da doença, o diagnóstico da leishmaniose visceral deve ser feito de forma mais precisa. Para tanto, é importante que se conheça o método utilizado, as suas limitações e interpretação clínica. Durante infecções naturais recomenda-se que múltiplos métodos diagnósticos sejam utilizados, tendo em vista que o uso isolado de determinada técnica pode não identificar todos os animais infectados (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Apesar da LVC ser uma doença sistêmica severa existem poucos estudos descrevendo padrões histológicos detalhados de distintos órgãos afetados pelo parasito (GIUNCHETTI *et al.*, 2007).

REFERENCIAL TEÓRICO

A Leishmaniose visceral canina (LVC) é uma enfermidade causada por protozoário pertencente à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. No Brasil o agente etiológico é *Leishmania infantum chagasi* (ALVES *et al.*, 2010; IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007) e o *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor e recentemente foi identificado em todas as regiões brasileiras (ALVES *et al.*, 2010; COLLA-JACQUES *et al.*, 2010)

No Brasil, a LVC apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e também a região Sul (SOUZA *et al.*, 2009; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009; FREHSE *et al.*, 2010).

. O estudo de Carranza-Tamayo *et al.* (2010) conclui que LV se tornou endêmica em Brasília. Em setembro de 2005 foi constatado o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral em humanos no Distrito Federal. A partir de então, foram realizados inquéritos sorológicos na população canina em diversas áreas do DF. Diversos cães apresentaram-se sororeagentes para leishmaniose visceral canina (LVC), também sendo constatado o vetor biológico (CRMV-DF 2006).

As transformações no ambiente provocadas pelo intenso processo migratório, em virtude de pressões econômicas ou sociais, distorções na distribuição de renda, processo de urbanização crescente, esvaziamento rural e as secas periódicas acarretam a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos, facilitando ocorrência de epidemias (BRASIL, 2003). As condições sócio-econômicas, ambientais e hábitos de vida são fatores significativos na epidemiologia da Leishmaniose visceral (LV) em áreas endêmicas. Tais condições podem contribuir para que a LV seja perpetuada nas áreas rurais e periurbanas, acometendo aglomerados humanos com baixo nível sócio-econômico que vivem em condições precárias de moradia (CALDAS *et al.*, 2001).

Locais que exibem graves problemas ambientais, principalmente em relação ao saneamento básico apresentam maiores soroprevalências de anticorpos antileishmania. Provavelmente este fato está associado à maior presença do vetor.

Esses locais estão próximos a resquícios da Mata Atlântica e em algumas residências foram observadas criações de animais de produção. Estas características tem sido especuladas como possíveis fatores de risco para a ocorrência de LV no Nordeste brasileiro (SANTOS *et al.*, 2010).

O agente etiológico da LV apresenta duas formas: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota, que é intracelular obrigatória, sendo encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2006). Os vetores pertencem ao gênero *Phlebotomos* e *Lutzomya*. Flebotomíneos não são mosquitos, pois a fase larval dos mosquitos ocorre na água, já nos flebotomíneos a fase larval é desenvolvida na matéria orgânica. Por isso, locais onde se encontram criações de animais com muito sombreados e acúmulo de lixo são grandes potenciais para desenvolvimento dos flebotomíneos, tornando difícil o seu controle (BARRETO, 2006)

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas ao sugarem o sangue de mamíferos infectados ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas. Após esse período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogena para outros tecidos, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (SILVA, 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

No Brasil, no meio urbano e rural o cão é apontado como o principal hospedeiro doméstico, sendo este a principal fonte de infecção para o homem (ALVES *et al.*, 2010; CALABRESE *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; CAMARGO-NEVES *et al.*, 2006; RAMIRO *et al.*, 2003). Parece bastante evidente que a forma de vida de cada cão em particular possa favorecer a sua exposição aos vetores e, por

consequente, a infecção, como é o caso de cães de guarda noturnos (SANTOS *et al.*, 2010). Outras espécies como gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores são naturalmente infectadas por *Leishmania*. Entretanto, em áreas endêmicas, os cães são de grande importância na manutenção do ciclo da doença, constituindo o principal elo na cadeia de transmissão da LV (IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007). Os hospedeiros silvestres que representam maiores riscos de infecção para os cães ou humanos tem sido os gambás (*Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris*), com ampla distribuição geográfica nas Américas e de grande atração pelo ambiente domiciliar. Assume-se que a presença desse animal no peridomicílio aumenta o risco da infecção (BORASCHI E NUNES, 2007).

Segundo Genaro *et al.* (2003), para todas as espécies de *Leishmania*, a principal forma de transmissão se dá pela picada do hospedeiro invertebrado infectado. Ainda, não foi comprovada a transmissão direta de animal para animal, de animal para pessoa ou pessoa para pessoa (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2006).

A LVC é uma doença sistêmica severa cujas manifestações clínicas estão intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado (BRASIL, 2003). Quando o parasito acomete espécies susceptíveis, a imunossupressão por ele causada promove a sua disseminação para muitos órgãos (CARVALHO *et al.*, 2007). Desta forma, é possível classificar os cães como assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Cães aparentemente assintomáticos podem atuar como fonte de infecção aos vetores, potencialmente participando do ciclo zoonótico de transmissão (SANTOS *et al.*, 2010).

A infecção usualmente causa doença sistêmica crônica. Classicamente, a leishmaniose em cães apresenta sinais inespecíficos como febre, apatia, anorexia, perda de peso, linfadenomegalia localizada ou generalizada, lesões dermatológicas, diarreia, falência renal, ceratoconjuntivite, epistaxe, anemia e onicogribose (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; IKEDA-GARCIA E MARCONDES, 2007; MACHADO *et al.*, 2007). Ocasionalmente são observadas alterações locomotoras, hepáticas, respiratórias, cardíacas e/ou neurológicas (NOGUEIRA *et al.*, 2009). Os animais assintomáticos representam grande problema para a saúde pública, pois a detecção da infecção é difícil, o que impossibilita a adoção de medidas adequadas

de controle (MACHADO *et al.* 2007). A intensidade do parasitismo aparentemente não está associada diretamente à gravidade do quadro clínico, podendo ser observados cães com sintomatologia leve à infecção intensa (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2006; FEITOSA *et al.*, 2000).

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina é difícil devido à variedade de manifestações clínicas da doença. Os achados clínicos são comuns a outras enfermidades, tornando o diagnóstico laboratorial ou parasitológico necessários para a confirmação da suspeita. Outro ponto importante é que a maioria dos cães infectados não desenvolve sinais clínicos, o que dificulta o diagnóstico (IKEDA-GARCIA E MARCONDES, 2007). Para o diagnóstico da leishmaniose visceral existem basicamente três categorias de provas utilizadas: métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Apesar de discordâncias entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado, ainda o padrão ouro para o diagnóstico da doença (IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007). É realizado através da análise citológica de lâminas de esfregaços ou *imprints*. Os métodos parasitológicos permitem a identificação direta do parasita na forma amastigota em tecido animal (BRASIL, 2006). Contudo, em muitos casos, especialmente em animais assintomáticos, nos quais poucas formas amastigotas estão presentes podem ocorrer resultados falsos negativos (FARIA, 2007). A pesquisa direta do parasito apresenta especificidade de 100%, no entanto a sensibilidade é baixa, em torno de 60 e 80% (LUVIZOTTO, 2007), sendo ainda menor em cães assintomáticos. A sensibilidade depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina (BRASIL, 2006).

Os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis (IKEDA-GARCIA & FEITOSA, 2006). A detecção de anticorpos anti-leishmania circulantes utilizando técnicas sorológicas constitui instrumento importante no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (BRASIL, 2006). Os métodos sorológicos para detecção de anticorpos circulantes anti-leishmania são, entre outros, a imunofluorescência indireta (RIFI), o teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), com diferentes modificações tais como Dot-ELISA, FML-ELISA, Fast-ELISA, BSM-ELISA, Slide-ELISA) a fixação de complemento (FC), a aglutinação direta, hemaglutinação indireta e imunoeletroforese (KARGIN KIRAL *et*

al., 2004). Essas técnicas apresentam alta sensibilidade e especificidade, mas nem sempre um resultado positivo pode ser conclusivo de doença ativa, da mesma forma que cães infectados podem ser soronegativos (SILVA *et al.*, 2006). Várias doenças infecciosas como tripanossomíase, erlichiose, babesiose, dirofilariose e borreliose podem interferir na análise, demonstrando resultados falso-positivos em cães (LUVIZOTTO, 2007). Resultados de estudos realizados por Dantas-Torres (2006) mostraram que 83,3% dos cães com co-infecção (erlichiose e babesiose) apresentaram soropositividade ao teste para leishmaniose. Esses resultados sugerem a necessidade de mais de um método diagnóstico quando a pesquisa da LVC em áreas onde existe a ocorrência também de erlichiose e babesioses canina.

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) permite identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito (NOGUEIRA *et al.*, 2009). A sensibilidade pode chegar a 88% logo após a infecção, mas declina até cerca de 50% nos meses subsequentes (IKEDA-GARCIA & FEITOSA, 2006). A principal desvantagem das técnicas moleculares é a necessidade de equipamentos e técnicos treinados (IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007).

A LVC, apesar dos inúmeros testes diagnósticos disponíveis, continua representando um desafio, pois não existe um único método capaz de obter sensibilidade e especificidade máxima, de forma a permitir um diagnóstico preciso das diversas formas de apresentação da doença (LUVIZOTTO, 2007; SILVA *et al.*, 2006).

As alterações patológicas na LVC são causadas tanto pela ação direta do parasita nos tecidos, levando à formação de lesões inflamatórias não supurativas, quanto pela deposição de imunocomplexos em vários órgãos e tecidos, principalmente no baço, fígado e rins. O estudo da resposta imunológica hospedeiro-parasita como fator de desencadeamento e severidade das lesões clínicas é essencial para melhor compreensão e caracterização da doença (MACHADO *et al.*, 2007). A fim de avaliar o papel do cão no ciclo de infecção da LVC, todas as manifestações da doença devem ser conhecidas, incluindo avaliação clínica e caracterização patológica da extensão e progressão das lesões em vários órgãos comprometidos (ALVES *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

GERAL

Caracterizar as alterações histopatológicas provocadas pela Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em diferentes órgãos.

ESPECÍFICO

- Determinar as principais manifestações clínicas e alterações macroscópicas em cães com LVC no Distrito Federal.
- Determinar as principais características histopatológicas nos linfonodos (pré-escapulares, axilares e poplíteos), fígado, baço, rim, pele, olho, pulmão, intestino, estômago e tecido nervoso de animais diagnosticados com LV.
- Avaliar semi-quantitativamente a forma de distribuição, tipo de infiltrado nos diferentes órgãos e presença das amastigotas nos tecidos.
- Comparar as diferenças entre os animais sintomáticos de cães assintomáticos.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. L.; ARAGÃO, F. R.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, Y. M.; LIRA, R. A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L. C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**. v. 71, p. 78-84, 2007.

ALVES, G. B. B.; PINHO, F. A.; SILVA, S. M. M. S.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, F. A. L. Cardiac and pulmonary changes in symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*.. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 43, n.3, p. 310-315, 2010.

AMÓRA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S.; MONTEIRO, A. M.; ROCHA, M. F. G. Fatores relacionados com a positividade de cães para Leishmaniose Visceral em Áreas Endêmicas do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**. v. 36, n. 6, p. 1854-1859, 2006.

BARRETO, A. Debate sobre leishmaniose. **Clínica Veterinária**. Ano XI, n. 64, p. 28-30, 2006.

BORASCHI, C. S. S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 44-48, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral**, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 122p. 2003.

BRASIL. Ministério Da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Editora MS : Brasília –DF, 122p, 2006.

CALABRESE, K.S.; CORTADA, V.M.C.L.; DORVAL, M.E.C.; LIMA, M.A.A.; OSHIRO, E. T.; SOUZA, C.S.F.; SIVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L. O.P.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; ABREU-SILVA, A. L. Leishmania (Leishmania) Infantum/Chagasi: Histopathological Aspects Of The Skin In Naturally Infected Dogs In Two Endemic Areas. **Experimental Parasitology**. v. 124, p. 253-257, 2010.

CALDAS, A. J. M. SILVA, D. R. C.; PEREIRA, C. C. R.; NUNES, P. M. S.; SILVA, B P.; SILVA, A. A. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. Infecção por Leishmania Chagasi em Crianças de uma área endêmica de Leishmaniose Visceral Americana na Ilha de São Luiz – MA, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, p. 445-451, 2001.

CAMARGO-NEVES. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. Secretaria de saúde**. Governo do estado de São Paulo, p. 122, 2006.

CARVALHO, A. A.; MACÊDO, E. L.; VERÇOSA, B. L.; SILVA, S. M. M.; CARVALHO, S. M.; COSTA, F. A. L. Caracterização histopatológica e imunoistoquímica da nefropatia da leishmaniose visceral experimental em hamster. **Revista Clínica Veterinária**, v. 71, p. 60-64, 2007.

COLLA-JACQUES, F. E.; CASANOVA, C.; PRADO, A. P. Estudo da fauna de volantes de areia em uma área endêmica de leishmaniose cutânea americana e leishmaniose visceral canina no município de espírito santo do pinhal, São paulo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, n. 2, p. 208-215, 2010.

DANTAS-TORRES, F. leishmaniose felina: revisão de literatura. **Clínica Veterinária**. Ano XI, n. 61, p. 32-40, 2006.

FARIA, M. B. Leishmaniose Visceral canina: Revisão bibliográfica. 2007. Rio de Janeiro: UCB. Dissertação (Especialização em clínica cirúrgica e médica). 45p.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. S. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com Leishmaniose Visceral no Município de Araçatuba, São Paulo. **Clínica Veterinária**. Ano V, n. 28, p. 36-44, 2000.

FREHSE, M. S.; GRECA JUNIOR, H.; ULLMANN, S.; CAMOSSO, L. G.; MACHADO, J. G.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W.; MOLENTO, M. B. Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free área. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. v. 19, n. 1, p. 64-66, 2010.

GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: Neves, D. P. **Parasitologia Humana**, Atheneu, 10ª ed., p. 56-72, 2003.

GONTIJO, C. M.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

HUEB, M. CAMIÁ, R. P.; RIBEIRO, L. C.; FONTES, C. J. F. Calazar em Mato Grosso – Foco Recente em Área Periurbana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, p. 324-425, 2000.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Clínica Veterinária**. ano XI, n. 62, p. 32-38, 2006.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 34-32, 2007.

KARGIN KIRAL, F.; SEYREK, K.; PASA, S.;ERTABAKLAR, H.;ÜNSAL, C. Some Haematological, Biochemical and Electrophoretic Findings in Dogs with Visceral Leishmaniasis **Revue de Médecine Vétérinaire**. v. 155, n. 4, p. 226-229, 2004

MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 50-58., 2007.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; DE PAULA, E. V.; LINS, G. L.; ROCHA, M. F.; FOSTES DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose Visceral: Estudo de Flebotomíneos e Infecções Canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n.2, p. 147-152, 2005.

MOREIRA, N. D.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; JULIANA VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M.; MALAQUIAS, L. C. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. AND REIS, A. B. Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunisation with two different vaccines against visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 128, n. 4, p. 418-424, 2008.

MOREIRA, P. R. R.; VIEIRA, L. M.; ANDRADE, M. M. C.; BANDARRA, M. B. MACHADO, G. F.; MUNARI, D. P.; VASCONCELOS, R. O. Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. v. 107, n. 3, p. 605-613, 2010.

NOGUEIRA J. L.; SILVA, M. V. M.; PASSOS, C. C.; AMBRÓSIO, C. E. A Importância Da Leishmaniose Visceral Canina Para A Saúde Pública: Uma Zoonose Reemergente **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária** Ano VII, n 13, p.12, 2009.

RAMIRO, M. J. ZARATE, J. J.; HANKE, J. R.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUES, J. R. ESTEBAM, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J. A.; LARRAGA, V. Protection in Dogs Against Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* is Achieved by Immunization with a Heterologous Prime-boost regime Using DNA and Vaccinia Recombinant Vectors Expressing LACK. **Vaccine**, v. 21, p. 2474-2484, 2003.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R. L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA, R. C. A.; BRITO, F. L. C.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. R.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalence of Anti-*Leishmania spp* antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 1, p. 41-45, 2010.

SILVA, E. S.; VAN DER MEIDE, W. F.; SCHOONE, G. J.; CONTIJO, C. M.F.; SCHALLIG, H. D.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Veterinary Research Communications**. n. 30, p. 637-643, 2006.

SILVA, M. N. Patologia e Patogênese da Leishmaniose Visceral Canina. **Revista Trópica –Ciências Agrárias e Biológicas**. v.1, n. 1, p. 20, 2007

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine Leishmaniosis:epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**. v. 20, n. 5, p. 471-489, 2009.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; DILERMANDO, J. F. A. The first report of the principal vector of visceral leishmaniasis in Latin America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v.104, n.8, p. 1181-1182, 2009.

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

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença endêmica que ocorre em vários continentes predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (MACHADO *et al.*, 2007). É considerada importante pelo impacto que produz na saúde pública, notadamente pela alta incidência, letalidade e implicações econômicas, constituindo-se sério problema sanitário e econômico-social pela depleção da força de trabalho. O Brasil está entre os países da América Latina que apresentam cerca de 90% dos novos casos anuais (LIMA *et al.*, 2004; IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007)

A LVC, inicialmente descrita como doença de ambiente silvestre ou rural, na atualidade é apontada como doença reemergente com incidência crescente e em franco processo de urbanização. No Brasil, a LVC encontra-se em expansão desde 1999 (BORASCHI E NUNES, 2007).

Os ciclos urbanos tem sido responsáveis pela expansão nos estados das regiões centro-oeste e sudeste. As principais razões pelos níveis epidêmicos da LVC nos grandes centros são o estreito convívio entre o homem e os reservatórios. Os

abrigos de animais domésticos próximos às habitações, a ausência de boas condições de higiene e os capões de mata nativa próxima as moradias são fatores que favorecem a concentração de flebotomos e de reservatórios mamíferos próximos ao homem. A devastação de áreas silvestres fez com que os vetores e os hospedeiros silvestres migrassem para o peridomicílio humano em busca de alimento (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Os cães representam importante modelo animal de estudo na LV, em função da susceptibilidade da espécie ao parasito, da resposta orgânica frente ao patógeno e, principalmente, pelo relevante risco à saúde pública devido à sua proximidade com o homem (MACHADO *et al.*, 2007). Os cães também possuem elevada ocorrência de infecções inaparentes e, nos casos oligossintomáticos podem apresentar intenso parasitismo cutâneo (BORASCHI & NUNES, 2007).

A ampla variedade de sinais clínicos torna o diagnóstico clínico difícil. Assim, recomenda-se que o profissional subsidie o diagnóstico com achados clínico-epidemiológicos e exames subsidiários citológicos, histológicos, parasitológicos, sorológicos e/ou moleculares (ALBUQUERQUE *et al.* 2007). Ainda não está disponível um teste que isoladamente, reúna todas as características consideradas desejáveis para o diagnóstico, que sejam de fácil execução, custo acessível, rapidez e alta especificidade e sensibilidade (IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007).

De acordo com Machado *et al.* (2007) as principais lesões histopatológicas observadas em cães são hipertrofia e hiperplasia das células do sistema fagocítico mononuclear (principalmente do baço, linfonodo, fígado e medula óssea), inflamação crônica na pele, reação inflamatória granulomatosa no fígado e no baço, pneumonia intersticial e glomerulonefrite.

Todas as manifestações da LVC devem ser conhecidas a fim de avaliar o papel do cão no ciclo da doença (ALVES *et al.*, 2010).

Compreendendo as lesões da leishmaniose nos diferentes órgãos é possível traçar estratégias para pesquisar as diferenças entre animais sintomáticos e assintomáticos, com vistas à vigilância epidemiológica e ao controle da disseminação da doença (CARVALHO *et al.*, 2007).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi baseado em um levantamento nos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade de Brasília (UnB) de cães necropsiados com histórico e sorologia positiva confirmados pelo exame parasitológico (detecção do parasita na citologia) e/ou PCR para Leishmaniose Visceral entre 2006 e 2009.

2.1 Animais

Os animais eram oriundos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), do hospital veterinário da UnB, de clínicas e propriedades particulares. Os animais selecionados eram previamente eutanasiados e encaminhados ao LPV da UnB para realização de necropsia. Esses animais foram divididos em grupos sintomáticos e assintomáticos para efeito de comparação. O grupo dos animais sintomáticos foi representado pelos animais que apresentaram sinais característicos da LVC no exame externo como: linfadenopatia, alterações cutâneas, hepatoesplenomegalia, caquexia, entre outros. O grupo dos animais assintomáticos foi definido pelos animais sem qualquer sinal da leishmaniose.

2.2 Colheita de material e procedimento histopatológico:

Coletou-se fragmentos de linfonodos (pré-escapulares, axilares e poplíteos), fígado, baço, rim, pele, olho, pulmão, estômago, intestino e tecido nervoso (13 cortes do córtex frontal até medula cervical) para uma descrição histológica minuciosa das lesões apresentadas em cada órgão. Esses fragmentos foram fixados em solução de formalina tamponada 10% por no mínimo 48 horas, processados rotineiramente para realização de cortes de 4µm e corados pela técnica hematoxilina e eosina (HE) para avaliação morfológica. Quando necessário foram realizadas colorações especiais como prata metanamina (PAMS) para visualizar espessamento e duplicação da membrana basal glomerular, ácido periódico de Schiff (PAS) para visualizar depósito de material PAS positivo ao redor das alças capilares e Vermelho Congo (VG) para evidenciar deposição de material amilóide quando suspeito.

Realizou-se imuno-histoquímica nos cortes de tecido nervoso que apresentaram inflamação. Utilizou-se o método peroxidase estreptavidina-biotina com anticorpo policlonal contra a forma amastigota da *Leishmania spp*, utilizando o kit da DAKO-USA. A inibição da peroxidase endógena realizou-se através da incubação das lâminas em peróxido de hidrogênio a 3%, diluído em metanol, durante 20 minutos. Os antígenos foram recuperados em tampão citrato, pH 6,0, a 97-99° C, durante 40 minutos. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com soro de cabra diluído 1:10 com solução de PBS. A incubação com anticorpos primários se deu por 18-20 horas a 4° C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS, incubadas com anticorpo secundário biotinilado (DAKO, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente, lavadas com PBS e incubadas com complexo avidina-peroxidase (DAKO, USA), durante 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada com o cromógeno - DAB (DAKO, USA). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris 1:10, em seguida, desidratadas e montadas com bálsamo neutro. Tecidos de pele de animal positivo na pesquisa parasitológica foram utilizados como controle positivo. Os cortes foram examinados em microscópio óptico para pesquisa do complexo antígeno-anticorpo, principalmente em locais com presença de infiltrado inflamatório de células mononucleares.

2.3 Avaliação histopatológica

A avaliação microscópica foi realizada sempre pelo mesmo observador.

A avaliação semi-quantitativa das lesões encontradas nos órgãos e tecidos avaliados foi realizada pela descrição quanto à distribuição, natureza da lesão, presença de parasitas nos tecidos e quanto à severidade sendo (-) = ausente, (+) = discreto, (++) = moderado e (+++) = acentuado.

2.3.1 Linfonodo (pré-escapulares, axilares e poplíteos): avaliação da presença de infiltrado e amastigota em cápsula; atrofia ou hipertrofia e hiperplasia de folículos linfoides na região cortical; histiocitose sinusal e/ou plasmocitose dos cordões medulares, hemossiderose e edema perivascular.

- 2.3.2 Fígado: avaliação do tipo e distribuição do infiltrado inflamatório, pesquisa de formas amastigotas, degeneração de hepatócitos e congestão sinusoidal.
- 2.3.3 Baço: avaliação morfológica com especial atenção aos macrófagos da polpa vermelha e zona marginal, pesquisa de amastigotas, avaliação da polpa branca, hemossiderose e congestão.
- 2.3.4 Pele: avaliação da inflamação quanto à distribuição, localização, intensidade e tipo de infiltrado, presença das amastigotas e alteração do colágeno.
- 2.3.5 Rim: As lesões glomerulares foram classificadas segundo o critério de classificação das glomerulonefrites pela World Health Organization (WHO) que inclui: glomerulopatia com alterações mínimas, glomeruloesclerose segmentar focal, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite proliferativa mesangial, glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite crescêntica, e glomerulonefrite crônica (CHURG *et al.*, 1985). Avaliação das alterações tubulares quanto à presença de fenômenos degenerativos, de cilindros hialinos intratubulares, de formas amastigotas, tipo e intensidade do infiltrado inflamatório e congestão.
- 2.3.6 Olho: avaliação de todo bulbo ocular quanto à inflamação, distribuição, localização, intensidade e tipo de infiltrado e presença das amastigotas.
- 2.3.7 Pulmão: avaliação da inflamação quanto à distribuição (localização), intensidade e tipo de infiltrado, presença das amastigotas, edema, congestão e antracose.

2.3.8 Intestino: determinação da inflamação quanto à intensidade, tipo de infiltrado e avaliação da placa de Peyer.

2.3.9 Estômago: avaliação da inflamação quanto à intensidade, tipo de infiltrado e mineralização.

2.3.10 Tecido nervoso: avaliação do infiltrado inflamatório (em 13 cortes, do córtex frontal até medula cervical) quanto à distribuição (focal, multifocal), localização (meninge ou parênquima cerebral), intensidade e tipo (histioplasmocítico, linfoplasmocítico, linfohistiocítico).

2.4 Análise Estatística:

O grau de inflamação foi agrupado em duas categorias: ausência ou baixo grau de inflamação (agrupando-se as frequências das categorias ausente e discreta) e inflamação moderada ou severa (para as categorias moderada e acentuada). Primeiramente foi testada a igualdade de distribuição de frequência dos dois graus de inflamação e da carga parasitária entre animais sintomáticos e assintomáticos. Quando não foram encontradas diferenças, os animais sintomáticos e assintomáticos foram agrupados e testados quanto a igualdade de distribuição de frequência entre as duas variáveis citadas e ao acaso. Ambos os testes foram realizados através da aproximação ao Teste Exato de Fisher (ZAR, 1999). Também comparou-se a igualdade de distribuição dos tipos de infiltrado inflamatório entre os graus de inflamação e entre quadro clínico de forma similar à acima descrita, porém, através do teste do Qui-quadrado (MOTTA, 2006). Foi utilizado um nível de significância de $p < 0,05$ para todas as análises.

3. RESULTADOS

Foram utilizados 63 cães com histórico de sorologia positiva para Leishmaniose Visceral confirmados pelo parasitológico na citologia e/ou PCR, para maior precisão da descrição microscópica da enfermidade.

De acordo com a apresentação de sinais clínicos, foram classificados neste trabalho 45 (71,42%) cães sintomáticos e 18 (28,57%) assintomáticos.

Os principais sinais clínicos foram linfadenopatia (n=34 – 53,96%), lesões alopecicas (n=33 – 52,38%), esplenomegalia (n=25 – 39,68%), hepatomegalia (n=23 – 36,50%), palidez das mucosas (n=16 – 25,39%), redução do escore corporal (n=9 – 14,28%), lesões de pele ulcerada (n=9 – 14,28%), seborreia seca / caspa (n=7 – 11,11%) e onicogribose (n=1 – 1,58%).

Nas lesões alopecicas observou-se maior ocorrência em membros (11- 33,33%), orelhas (9 – 27,27%), lesões generalizadas (6 – 18,18%), periocular (5 – 15,15%) e em dorso (2 – 6,06%);

Não foi constatada predisposição sexual nos cães acometidos (fêmea [33 – 52,39%] e macho [30 – 47,61%],

Quanto às raças acometidas, a prevalência de cães necropsiados foi: cães sem raça definida (29 - 46,03%); pitbull (4 - 6,34%); rottweiler (4 – 6,34%); boxer (3 - 4,76%); fila brasileiro (3 – 4,76%); poodle (3- 4,76%); teckel (2- 3,17%); Dog Alemão (2- 3,17%); labrador retriever (2- 3,17%); Pastor Alemão (2- 3,17%); pug (2- 3,17%); Akita (1- 1,58%); Fox Paulistinha (1- 1,58%); Mastiff (1- 1,58%); Weimaraner (1- 1,58%); Doberman pinscher (1- 1,58%). Na análise das fichas em duas o item raça não foi preenchido.

Avaliação histopatológica

Durante a avaliação histopatológica não encontrou-se associação significativa entre grau de inflamação e apresentação dos quadros clínicos em nenhum dos órgãos avaliados ($p \geq 0,05$). Foi demonstrada significativa associação, em todos os órgãos testados com presença de amastigotas, de maior carga parasitaria em animais com baixo grau de inflamação. Em determinados órgãos

sugeriram maior intensidade nessa relação, com $p < 0,005$ conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Valores de p para associação de maior carga parasitária em tecidos de cães com baixo grau de inflamação levando em consideração a significancia acima de 3,841.

Órgão	Valor de p
Pulmão	$p = 33,43794$
Rim	$p = 31,71895$
Fígado	$p = 19,21302$
Olho	$p = 15,57692$
Baço	$p = 15,32426$
Linfonodo	$p = 11,02763$
Pele	$p = 5,24237$

3.1 Alterações histológicas nos linfonodos

Dos 58 animais analisados 49 (84,48%) apresentaram alterações inflamatórias na cápsula (figura 1) variando de discreta a acentuada. Destes, 35 (71,42%) pertenciam ao grupo dos sintomáticos e 14 (28,57%) aos assintomáticos.

Doze animais sintomáticos apresentaram discreto infiltrado na cápsula, sendo que sete (58,33%) apresentaram infiltrado histioplasmocítico, quatro (33,33%) linfoplasmocítico e um (8,33%) histiocítico. Catorze animais apresentaram infiltrado moderado com 13 (92,86%) histioplasmocítico e apenas um (7,14%) linfoplasmocítico. Nove animais apresentaram infiltrado acentuado na cápsula, sendo oito (88,89%) histioplasmocítico e um (11,11%) linfoplasmocítico.

Nos linfonodos, comparando-se infiltrado histioplasmocítico (HP) com os

outro tipos de infiltrados agrupados, observou-se que há predominância de infiltrado HP em animais com inflamação moderada a acentuada ($p \leq 0,05$).

Juntamente o infiltrado, em 16 animais sintomáticos foi possível visualizar as formas amastigotas da *Leishmania spp* (figura 2), sendo que em cinco (31,25%) a carga parasitária foi discreta, em oito (50,00%) moderada e em três (18,75%) acentuada.

Do grupo dos assintomáticos, 14 animais apresentaram infiltrado na cápsula. Seis apresentaram infiltrado discreto, sendo três (50,00%) histioplasmocítico, um (16,67%) linfoplasmocítico, um (16,67%) histiocítico e um (16,66%) plasmocítico. Oito animais apresentaram infiltrado moderado, sendo sete histioplasmocítico (87,50%) e um (12,50%) linfoplasmocítico. Dos assintomáticos, em apenas um (6,67%) animal foi visualizado a presença discreta das formas amastigotas de *Leishmania spp*.

Atrofia dos folículos linfoides foi visualizada em 22 animais sintomáticos e oito assintomáticos. A graduação dessas lesões pode ser visualizada na tabela 2. Em 26 animais foi visualizado hiperplasia e hipertrofia os folículos linfoides, sendo 19 sintomáticos e sete assintomáticos. No grupo dos animais sintomáticos, seis animais também apresentaram atrofia em outros cortes de linfonodo.

Na região de seio medular foi observado histiocitose em 50 (86,20%) cães (figura 3), sendo 40 (80,00%) do grupo dos sintomáticos e 10 (20%) dos assintomáticos. Dos animais sintomáticos, 15 (37,5%) apresentaram histiocitose discreta, 12 (30,00%) moderado e 13 (32,5%) acentuado. Dos 10 animais assintomáticos quatro (40,00%) apresentaram histiocitose discreta, um (10,00%) moderada e cinco (50,00%) acentuada. Juntamente com a histiocitose foi possível visualizar presença formas amastigotas (figura 4) em 35 animais (60,34%), sendo 28 (80,00%) sintomáticos e sete (20,00%) assintomático. Dos animais sintomáticos 17 (60,71%) apresentaram discreta presença das amastigotas, cinco (17,86%) moderada e seis (21,43%) acentuada. Dos animais assintomáticos, quatro (57,14%) apresentaram discreta, dois (28,57%) moderada e um (14,29%) acentuada.

Nos cordões medulares 17 (29,31%) cães apresentaram plasmocitose, sendo 13 (76,47%) animais do grupo dos sintomáticos e quatro (23,53%) dos

assintomáticos. Dos sintomáticos, dois (15,38%) apresentaram plasmocitose discreta, oito (61,54%) moderado e três (23,08%) acentuado. Nos assintomáticos três (75%) apresentaram plasmocitose discreta e apenas um (25%) acentuada. Visualizou-se corpúsculo de Russel no interior dos plasmócitos em quatro animais.

Nos linfonodos também se observou hemossiderose em 47 animais (81,03%), sendo 34 (72,35%) do grupo dos sintomáticos e 13 (27,65%) assintomáticos. Dos animais sintomáticos 15 (44,11%) apresentaram hemossiderose discreta, 11 (32,36%) moderada e oito (23,53%) acentuada. Dos assintomáticos, cinco (38,46%) demonstrou hemossiderose discreta, seis (46,16%) moderada e dois (15,38%) acentuada. Tais pigmentos dificultaram muito a visualização da presença das formas amastigotas. Edema foi visualizado em 14 animais sintomáticos, sendo dois (14,28%) discreto, em seis (42,86%) moderado e em seis (42,86%) acentuado. Dos animais assintomáticos seis animais também apresentaram edema, sendo um (16,66%) discreto, dois (33,34%) moderado e três (50,00%) acentuado.

Tabela 2: Resultados da avaliação histopatológica de linfonodos de 58 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010).

Região	Área	Grau Infiltrado		Tipo infiltrado								AMG		Diagnóstico							
		S	A	HP		LP		Ht		PI		S	A	Atrofia		HH		HSD		Edm	
Córtex	C / F	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A
A.		8	1	-	-	-	-	-	-	-	-	27	14	-	-	-	-	-	-	-	-
+		12	6	7	3	4	1	1	1	0	1	5	1	8	4	9	4	-	-	-	-
++		14	8	13	7	1	1	0	0	0	0	8	0	10	3	9	2	-	-	-	-
+++		9	0	8	0	1	0	0	0	0	0	3	0	4	1	1	1	-	-	-	-
Total		43	15	28	10	6	2	1	1	0	1	43	15	22	8	19	7	-	-	-	-
Medula	S M																				
A.		-	-	-	-	-	-	3	5	-	-	15	8	-	-	-	-	9	2	29	9
+		-	-	-	-	-	-	15	4	-	-	17	4	-	-	-	-	15	5	2	1
++		-	-	-	-	-	-	12	1	-	-	5	2	-	-	-	-	11	6	6	2
+++		-	-	-	-	-	-	13	5	-	-	6	1	-	-	-	-	8	2	6	3
Total		-	-	-	-	-	-	43	15	-	-	43	15	-	-	-	-	43	15	43	15
	C M																				
A.		-	-	-	-	-	-	-	-	30	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+		-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
++		-	-	-	-	-	-	-	-	8	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+++		-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total		-	-	-	-	-	-	-	-	43	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: ausente, (+) discreto; (++) moderado; (+++) acentuado; C / F: Cápsula ou Foliculo; SM: Seio Medular; CM: Cordões Medulares; HP: Histioplasmocítico; LP: Linfoplasmocítico; Ht: Histiocítico; PI: Plasmocítico; AMG: amastigota; HH: hiperplasia e hipertrofia; HSD: hemossiderina; Edm: edema; S: sintomático; A: assintomático.

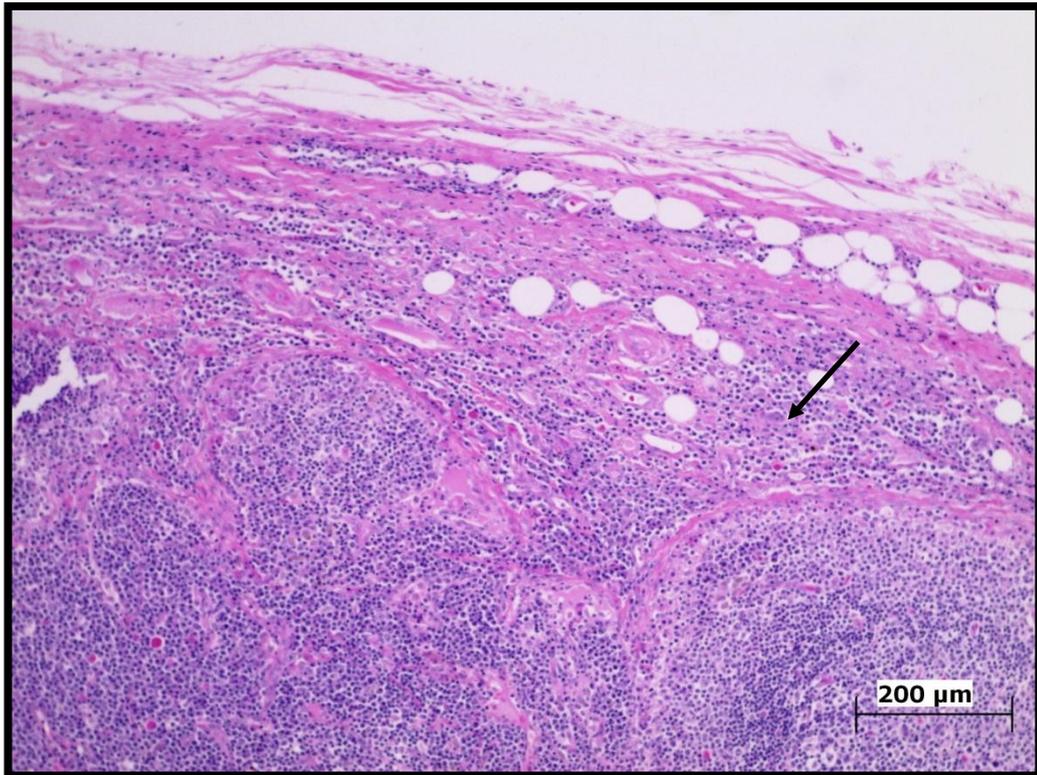


Figura 1: Infiltrado inflamatório acentuado em cápsula (seta) de linfonodo de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

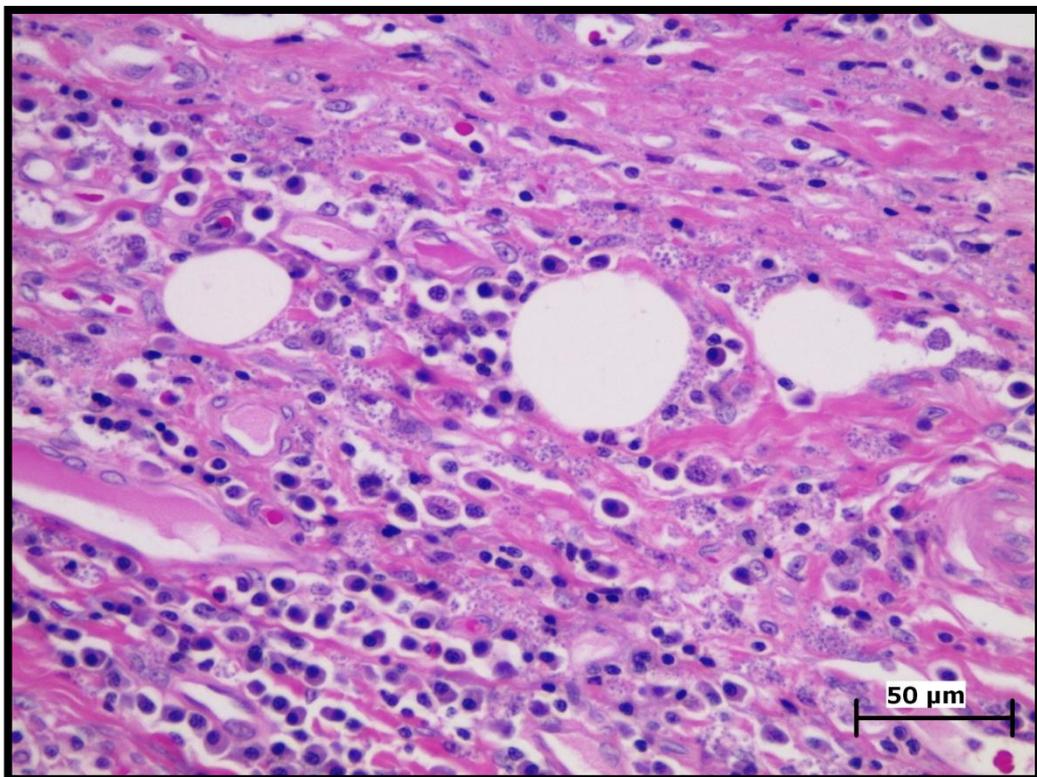


Figura 2: Infiltrado inflamatório em cápsula de linfonodo, com formas amastigotas de *Leishmania* spp, dentro e fora do citoplasma de macrófagos, em um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

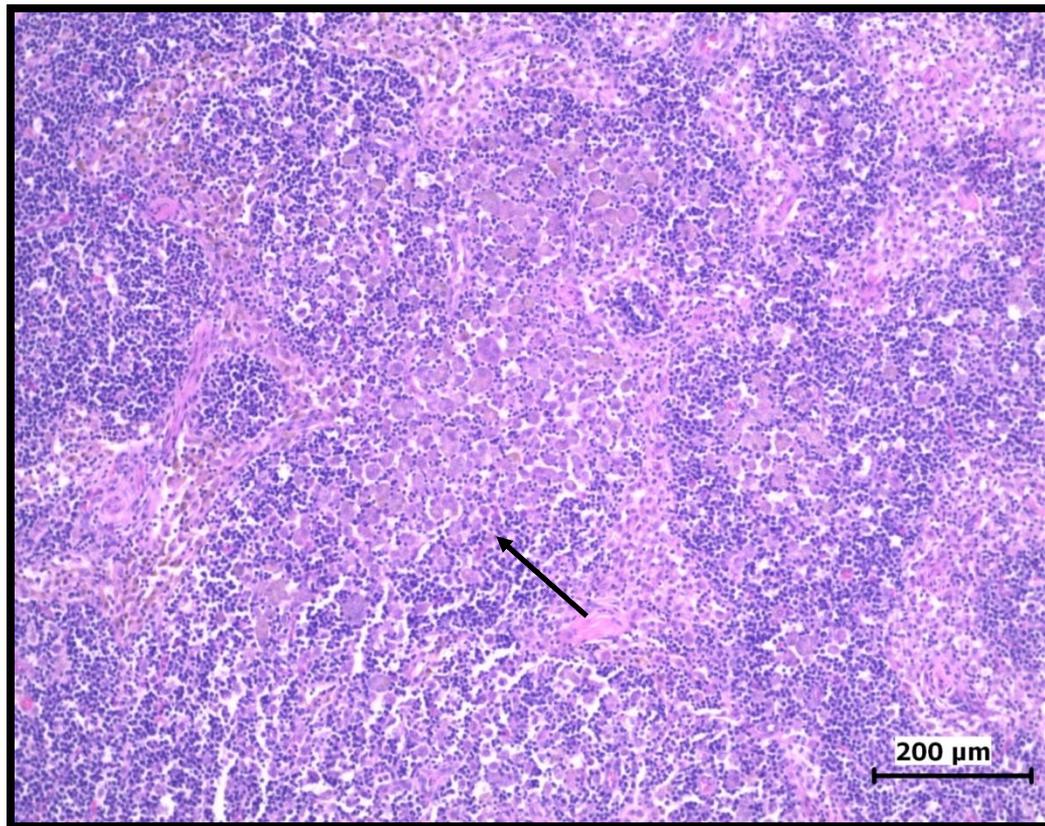


Figura 3: Histiocitose sinusal (seta) em linfonodo de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

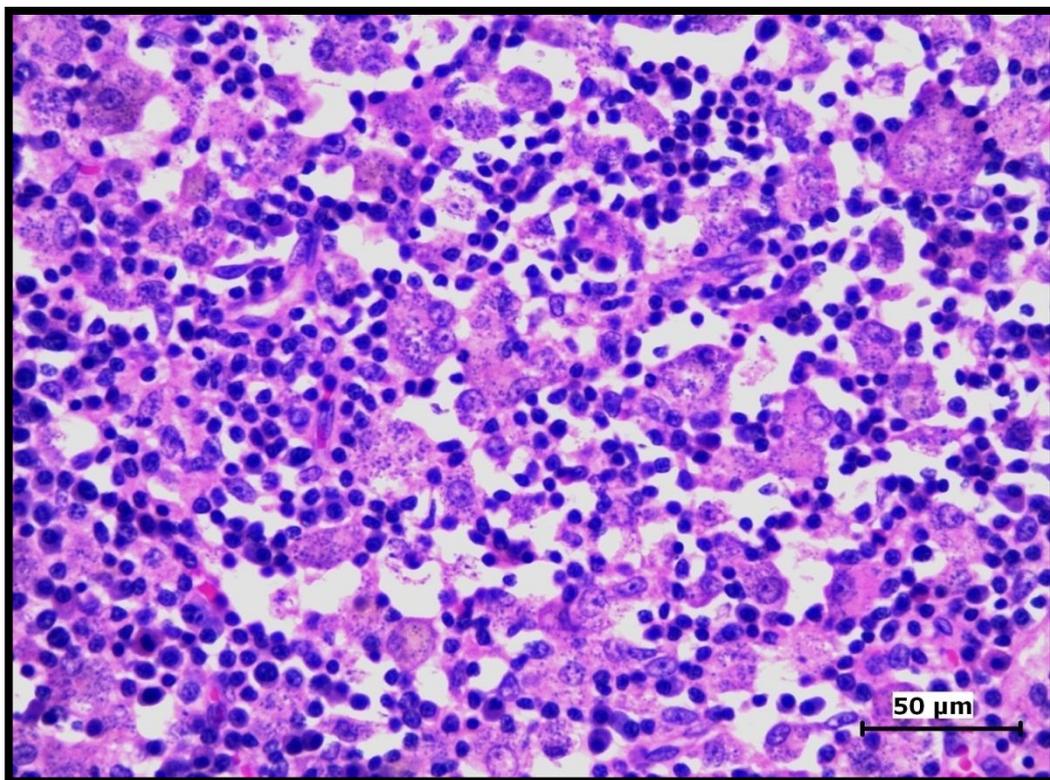


Figura 4: Amastigotas no citoplasma de macrófagos na região da histiocitose sinusal em linfonodo de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

3.2 Alterações histológicas no fígado.

Nos 57 animais analisados, 53 (92,98%) animais apresentaram algum tipo de infiltrado inflamatório variando de discreto a moderado. Destes, 36 (67,92%) pertenciam ao grupo dos sintomáticos e 17 (32,08%) dos assintomáticos. Quinze animais sintomáticos (41,66%) apresentaram infiltrado discreto, sendo seis (40,00%) histioplasmocítico, seis (40,00%) linfoplasmocítico, um (6,67%) linfohistiocítico, um (6,67%) histiocítico e um (6,66%) linfocítico. Destes quinze animais nove (60,00%) apresentaram distribuição periportal, três (20,00%) periportal e granuloma intralobular, um (6,67%) apenas granuloma intralobular, um (6,67%) perivascular e um (6,66%) em sinusóide.

Dos dezoito animais sintomáticos (50,00%) que apresentaram infiltrado moderado, 12 (66,67%) eram histioplasmocítico, dois (11,11%) linfoplasmocítico, dois (11,11%) linfohistiocítico e dois (11,11%) plasmocítico. Quanto à localização nove (50,00%) animais apresentaram infiltrado periportal e granuloma intralobular, cinco (27,78%) perivascular e quatro (22,22%) periportal.

Três (8,34%) animais sintomáticos apresentaram infiltrado acentuado sendo um (33,33%) histioplasmocítico, um (33,33%) linfoplasmocítico e um (33,34%) linfohistiocítico. Destes dois (66,67%) apresentaram distribuição periportal e granuloma intralobular e um (33,33%) perivascular.

A distribuição periportal associada com granuloma intralobular pode ser visualizada nas figuras 5 e 6.

Juntamente com infiltrado foi possível visualizar formas amastigotas (figura 7) em 23 (40,35%) animais. Destes, 15 (65,22%) eram animais sintomáticos e oito (34,78%) assintomáticos. Dos animais sintomáticos, 11(73,34%) animais apresentaram carga parasitária discreta, três (20,00%) moderada e um (6,66%) acentuada.

No grupo dos animais assintomáticos, sete (41,17%) apresentaram infiltrado inflamatório discreto sendo três (42,86%) histioplasmocítico, três (42,86%) linfoplasmocítico e um (14,28%) linfohistiocítico. A distribuição foi cinco (71,42%)

periportal, um (14,29%) com periportal e granuloma intralobular e um (14,29%) perivascular.

Oito (47,06%) animais assintomáticos apresentaram infiltrado moderado, sendo sete (87,50%) histioplasmocítico e um (12,50%) linfoplasmocítico. A localização foi dois (25,00%) periportal, quatro (50,00%) periportal e granuloma intralobular e dois (25,00%) perivascular.

Dois (11,77%) animais assintomáticos apresentaram infiltrado acentuado, sendo nos dois observados um infiltrado histioplasmocítico. A distribuição foi um (50,00%) periportal e granuloma intralobular e um (50,00%) difuso.

Associado ao infiltrado inflamatório visualizou-se formas amastigotas, sendo que em seis (75,00%) foi classificada como discreta e em dois (25,00%) acentuada.

Também foram observadas lesões degenerativas e congestivas. Em 35 animais sintomáticos e 18 assintomáticos a degeneração hidrópica pode ser visualizada (tabela 3). As lesões congestivas estavam presentes em 37 animais sintomáticos e 17 assintomáticos

Outros achados encontrados no fígado foram pigmentos de hemossiderina (5 - 8,77%), necrose centrolobular (3 - 5,26%), hemorragia (1 - 1,75%), degeneração glicogênica (4 - 7,01%), cirrose (1 - 1,75%), hemangiossarcoma (1 - 1,75%), edema perivascular acentuado (2 - 3,5%), retenção biliar (9 - 15,78%).

Tabela 3: Resultados da avaliação histopatológica do fígado de 57 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina, no Distrito Federal (Brasília, 2010).

	Grau Infiltrado		Tipo infiltrado										AMG		Distribuição infiltrado								Diagnóstico												
			HP		LP		LH		PI		Ht		Lf		PP		PP E GIL		GIL		PV		DF		SN		Dg H		Cong						
	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A					
Ausente	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	2	1
+	15	7	6	3	6	3	1	1	0	0	1	0	1	0	11	6	9	5	3	1	1	0	1	1	0	0	1	0	14	10	2	1			
++	18	8	12	7	2	1	2	0	2	0	0	0	0	0	3	0	4	2	9	4	0	0	5	2	0	0	0	0	9	6	17	9			
+++	3	2	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	12	2	18	7			
Total	39	18	19	12	9	4	4	1	2	0	1	0	1	0	39	18	13	7	14	6	1	0	7	3	0	1	1	0	39	18	39	18			

(+) = discreto; (++) moderado; (+++) acentuado; HP – Histioplasmocítico; LP: Linfoplasmocítico; LH: Linfohistiocítico; PI: Plasmocítico; Ht: Histiocítico; Lf: Linfocítico; PP: Periportal; PP e GIL: Periportal e Granuloma Intralobular; GIL: Granuloma Intralobular; PV: Perivascular; DF: Difuso; SN: Sinusoide; AMG: Amastigota; Dg H: Degeneração Hidrópica; Cong: Congestão; S: sintomático; A: assintomático.

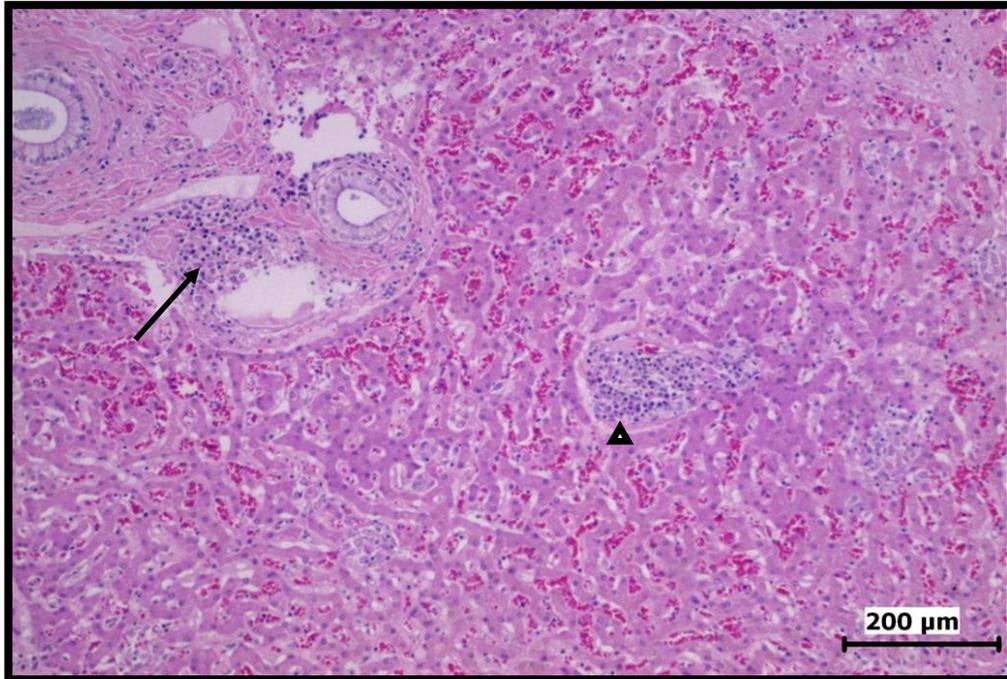


Figura 5: Infiltrado inflamatório periportal (seta) associado com granuloma intralobular (cabeça de seta) em fígado de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

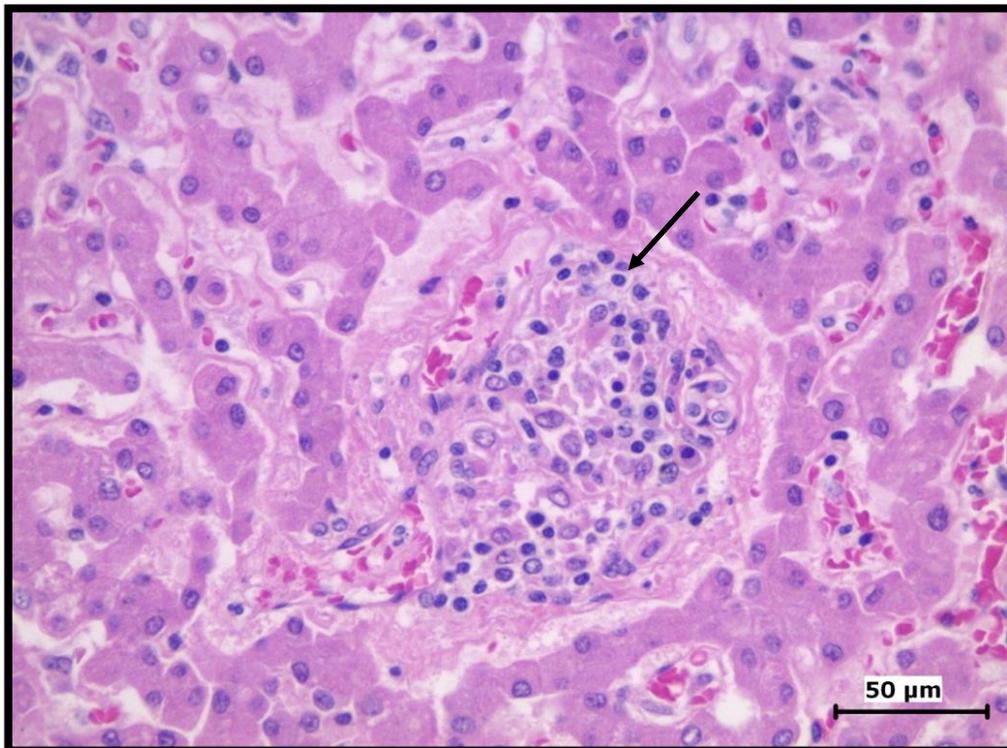


Figura 6: Formação de granuloma intralobular em fígado de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

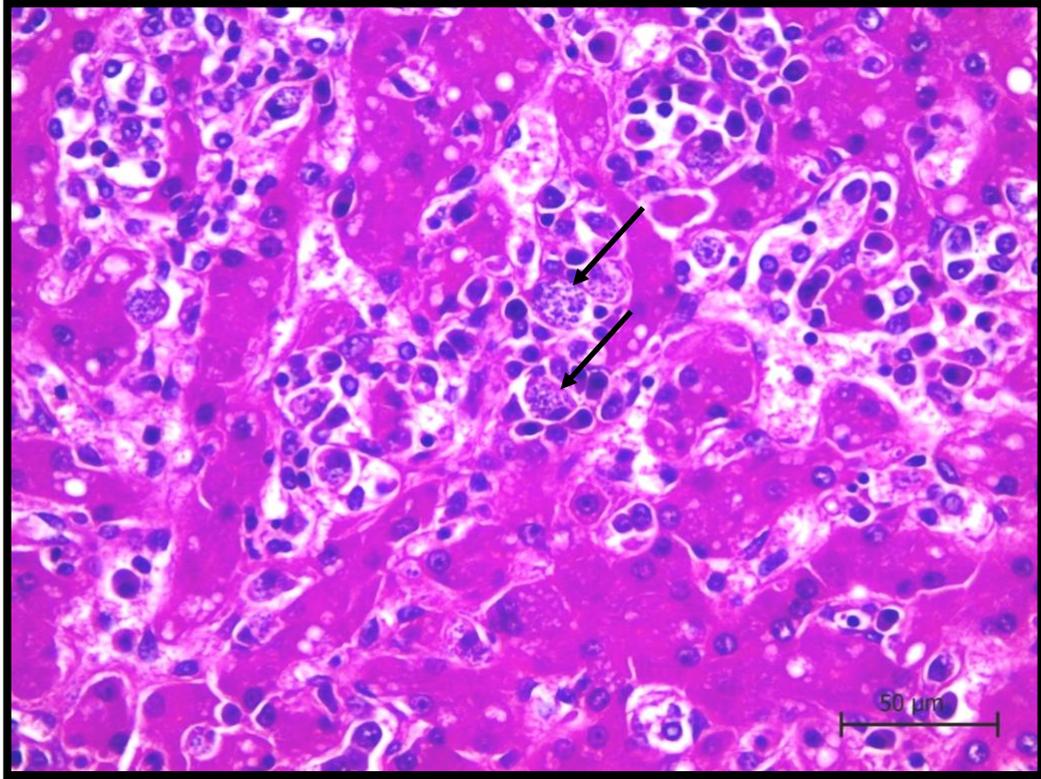


Figura 7: Formas amastigotas de *Leishmania spp* (setas) em fígado de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

3.3 Alterações histológicas no Baço

Dos 57 animais analisados, a hiperplasia e hipertrofia de polpa branca esteve presente em 16 (28,07%) animais sendo 10 (62,5%) do grupo dos sintomáticos e seis (37,5%) dos assintomáticos. Dos animais sintomáticos, quatro (40,00%) apresentaram uma lesão discreta, quatro (40,00%) moderada e dois (20,00%) acentuada. Dos animais assintomáticos, três (50,00%) apresentaram lesão discreta e três (50,00%) moderada.

Formas amastigotas foram visualizadas em 14 animais sintomáticos (figura 8) e em seis animais assintomáticos. Do grupo dos sintomáticos, em sete (50,00%) a presença das amastigotas foi discreta, em cinco (35,71%) moderada e em dois (14,29%) acentuada. No grupo dos assintomáticos, em cinco (83,33%) visualizou-se amastigotas de forma discreta e em um (16,67%) moderada.

Também foi visualizada hemossiderose e congestão. A hemossiderose foi detectada em 48 (84,21%) animais sendo 38 (79,16%) do grupo dos sintomáticos e 10 (20,83%) do grupo dos assintomáticos. A congestão foi observada em 28 (49,12%) animais, sendo 18 (64,28%) sintomáticos e 10 (35,71%) assintomáticos. A intensidade das lesões pode ser visualizada na tabela 3.

Periesplenite (figura 9) com infiltrado mononuclear foi detectada em sete (12,28%) animais, sendo visualizadas formas amastigotas em quatro (57,14%) destes animais.

Histiocitose (figura 10) foi observada em todos os animais que apresentaram as formas amastigotas da *Leishmania spp.* Em geral a histiocitose localizou-se na região subcapsular, por vezes organizada em forma de granulomas. Apenas um animal apresentou histiocitose subcapsular, porém sem a visualização das formas amastigotas.

Tabela 4: Resultados da avaliação histopatológica do baço de 57 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010).

	AMG		Diagnóstico					
	S	A	HPB		Cong		HSD	
			S	A	S	A	S	A
Ausente	28	9	32	9	24	5	4	5
+	7	5	4	3	6	4	15	4
++	5	1	4	3	8	6	18	4
+++	2	0	2	0	4	0	5	2
Total	42	15	42	15	42	15	42	15

(+) = discreto; (++) moderado; (+++) acentuado; AMG: Amastigota; HPB: Hiperplasia de polpa branca; Cong: Congestão; HSD: Hemossiderina; S: sintomático; A: assintomático

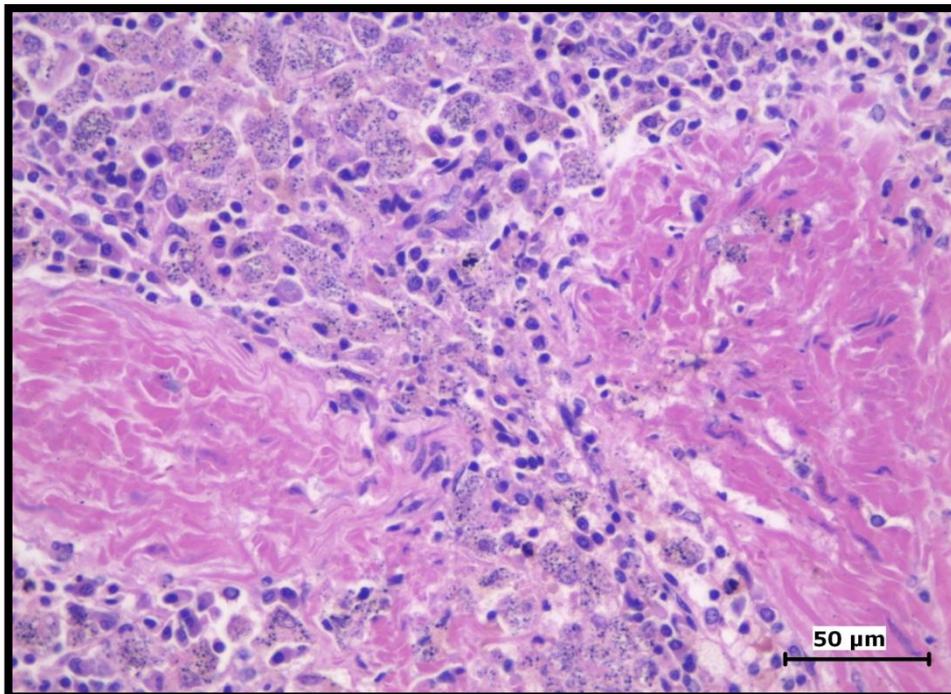


Figura 8: Formas amastigotas no baço de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

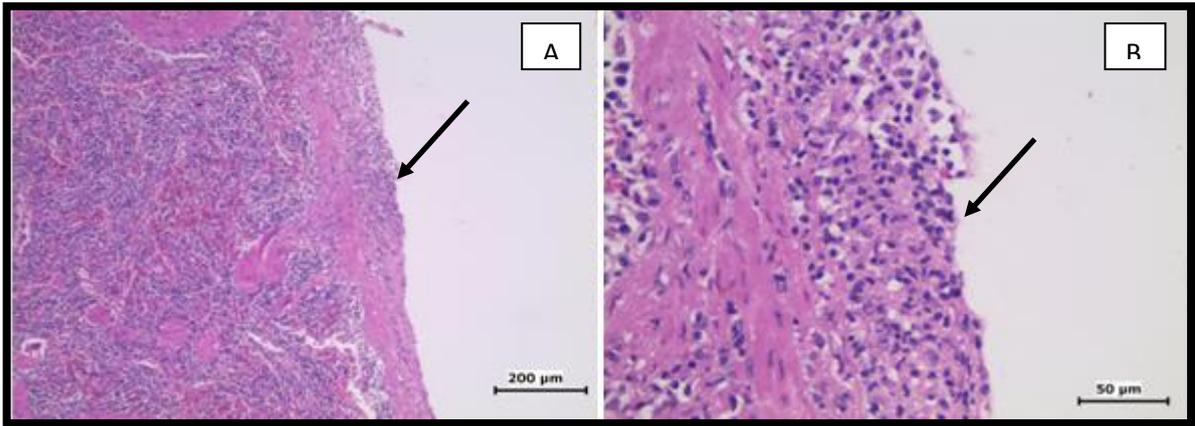


Figura 9: Periesplenite no baço de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010). (A) visualização da periesplenite (seta) no aumento de 40x. (B) Visualização da periesplenite (seta) no aumento de 400x.

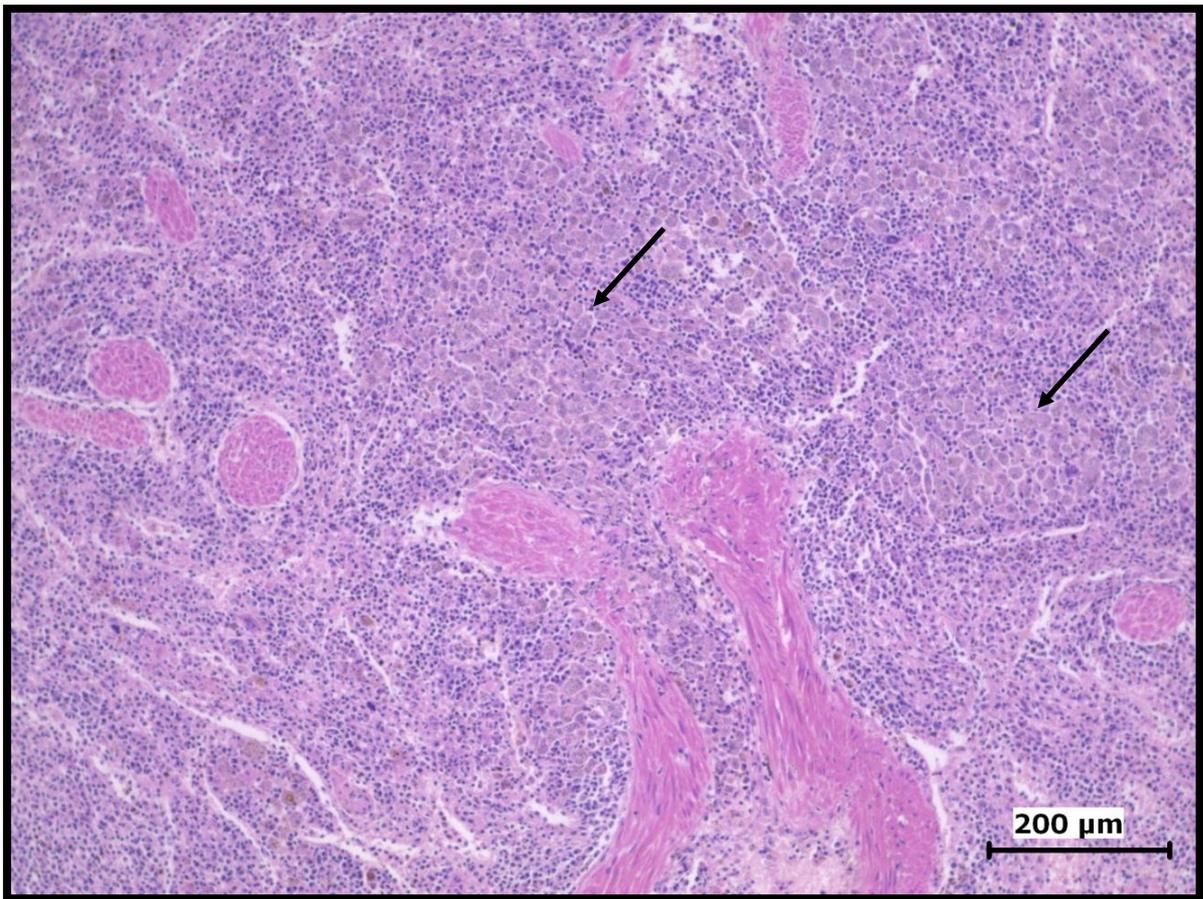


Figura 10: Histiocitose (setas) no baço de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

3.4 Alterações histológicas na pele

Dos 45 animais analisados, foi observado infiltrado inflamatório (figura 11) em 32 (71,11%) casos, variando de discreto a acentuado. Destes, 26 (81,25%) pertenciam ao grupo dos sintomáticos e seis (18,75%) dos assintomáticos. No grupo dos sintomáticos cinco (19,23%) cães apresentaram infiltrado discreto, sendo dois (40,00%) linfoplasmocítico, um (20,00%) histioplasmocítico, um (20,00%) plasmocítico e um (20,00%) histiocítico. Quanto a distribuição foram três (60,00%) em derme superficial, um (20,00%) próximo de anexos e um (20,00%) perivascular.

Onze (42,30%) animais sintomáticos apresentaram infiltrado moderado. Destes seis (54,55%) histioplasmocítico, dois (18,18%) linfoplasmocítico, um (9,09%) linfohistiocítico, um (9,09%) plasmocítico e um (9,09%) histiocítico. A localização foi dois (18,18%) em derme superficial, dois (18,18%) perifolicular e sete (63,64%) próximo de anexos.

Dez (38,47%) animais sintomáticos apresentaram infiltrado acentuado, sendo seis (60,00%) histioplasmocítico, um (10,00%) plasmocítico e três (30,00%) histiocítico. Quanto a distribuição foram sete (70,00%) difusos, um (10,00%) em derme superficial, um (10,00%) em derme profunda e um (10,00%) perifolicular.

Dos animais assintomáticos quatro (33,33%) apresentaram infiltrado moderado sendo dois (50,00%) histioplasmocítico, um (25,00%) linfohistiocítico e um (25,00%) histiocítico. Em um (25,00%) o infiltrado foi localizado em derme superficial, um (25,00%) difuso, um (25,00%) perifolicular e um (25,00%) próximo de anexos.

Dois (16,67%) animais assintomáticos apresentaram infiltrado acentuado, um (50,00%) histioplasmocítico e um (50,00%) histiocítico, sendo os dois (100,00%) próximo dos anexos cutâneos como folículo piloso, glândula sudorípara e glândula sebácea.

Juntamente com o infiltrado, foi possível visualizar presença das formas amastigotas em 19 (42,22%) animais (figura 12) sendo 15 (78,94%) animais sintomáticos e quatro (21,05%) animais assintomáticos. A intensidade pode ser visualizada na tabela 5.

Tabela 5: Resultados da avaliação histopatológica da pele de 45 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010).

	Grau Infiltrado		Tipo infiltrado										AMG		Distribuição infiltrado												
	S	A	HP		LP		LH		PI		Ht		S	A	DIFUS		DS		DP		PF		PA		PV		
Ausente	7	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	5	0	1	0	2	0	0	0	1	0	1	0	5	3	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
++	11	4	6	2	2	0	1	1	1	0	1	1	4	0	0	1	2	1	0	0	2	1	7	1	0	0	
+++	10	2	6	1	0	0	0	0	1	0	3	1	6	1	7	0	1	0	1	0	1	0	0	2	0	0	
Total	33	12	13	3	4	0	1	1	3	0	5	2	33	12	7	1	6	1	1	0	3	1	8	3	1	0	

(+) = discreto; (++) moderado; (+++) acentuado; HP – Histioplasmocítico; LP: Linfoplasmocítico; LH: Linfohistiocítico; PI: Plasmocítico; Ht: Histiocítico; DIFUS: Difuso; DS: Derme Superior; DP: Derme Profunda; PF: Perifolicular; PA: Próximo de anexos; PV: Perivascular; AMG: Amastigota; S: sintomático; A: assintomático

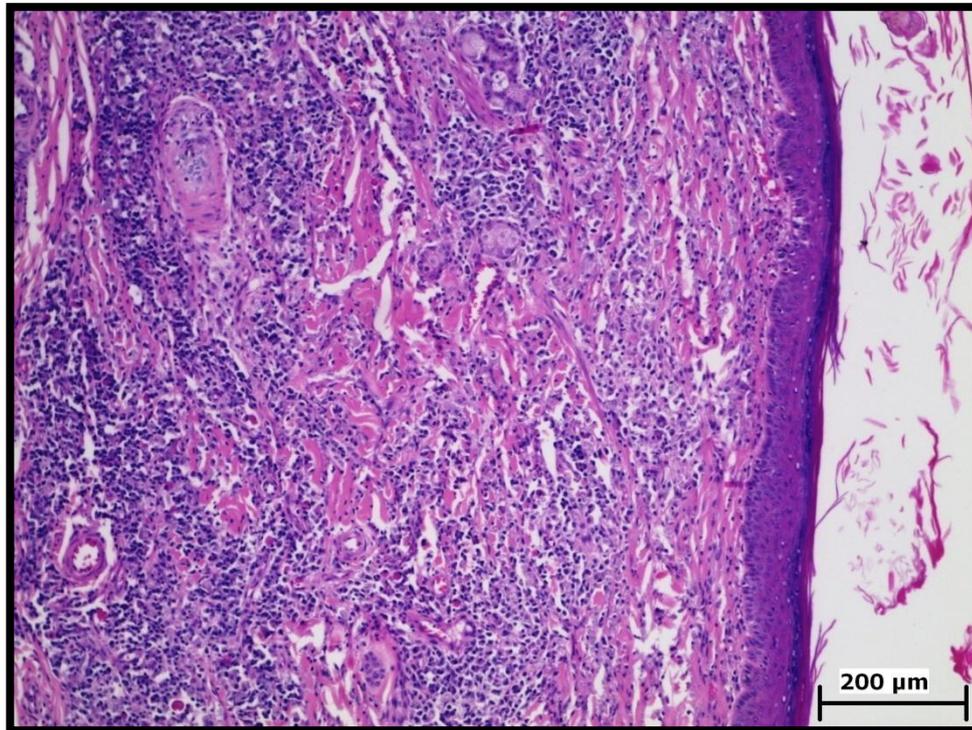


Figura 11: Infiltrado inflamatório difuso na derme de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

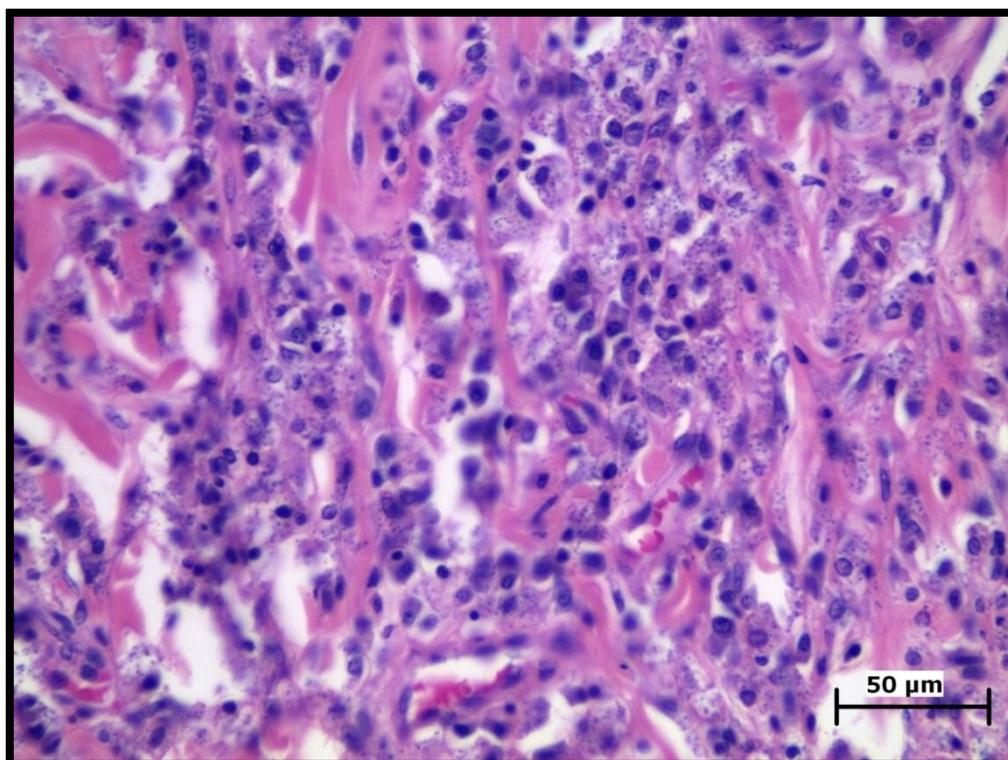


Figura 12: Formas amastigotas, dentro e fora de macrófagos, na derme de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

3.5 Alterações histológicas no rim

Dos 61 animais estudados, 45 (73,77%) apresentaram alteração inflamatória intersticial variando de discreto a acentuado, com distribuição multifocal. Destes, 33 (73,34%) pertenciam ao grupo sintomático e 12 (26,66%) ao assintomático. O tipo de infiltrado e severidade pode ser visualizado na tabela 6.

Fibrose intersticial foi observada em seis (9,83%) casos, sendo quatro sintomáticos (um discreto, dois moderado e um acentuado) e dois assintomáticos (um discreto e um moderado).

As alterações tubulares mais frequentes nos animais sintomáticos foram representadas por degeneração hidrópica tubular variando de discreta a acentuada em 35 animais (81,39%), cilindros hialinos intratubulares em 21 animais (48,83%) e mineralização tubular em 10 animais (23,25%). Nos animais assintomáticos as alterações tubulares observadas foram degeneração hidrópica em 16 (88,88%) cilindros hialinos intratubulares em oito (44,44%) animais e mineralização tubular em seis (33,33%) animais.

A deposição de lipofuscina no interior das células tubulares esteve presente em 16 casos (26,22%), apresentando intensidade de rara a discreta. O grupo sintomático abrangeu 14 casos (87,5%) e o grupo assintomático dois casos (12,5%).

Alterações glomerulares

Trinta e oito animais (62,29%), dos 61 cães estudados apresentaram alterações glomerulares e destes, 28 (73,68%) pertenciam ao grupo sintomático e 10 (26,32%) ao assintomático.

As alterações glomerulares encontradas nesse estudo, foram classificadas de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (CHURG *et al.*, 1985) em glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite membranosa, glomeruloesclerose segmentar focal e glomerulonefrite proliferativa mesangial, conforme ilustrado na figura 13. Não foi encontrado nenhum animal com glomerulonefrite crônica ou amiloidose renal.

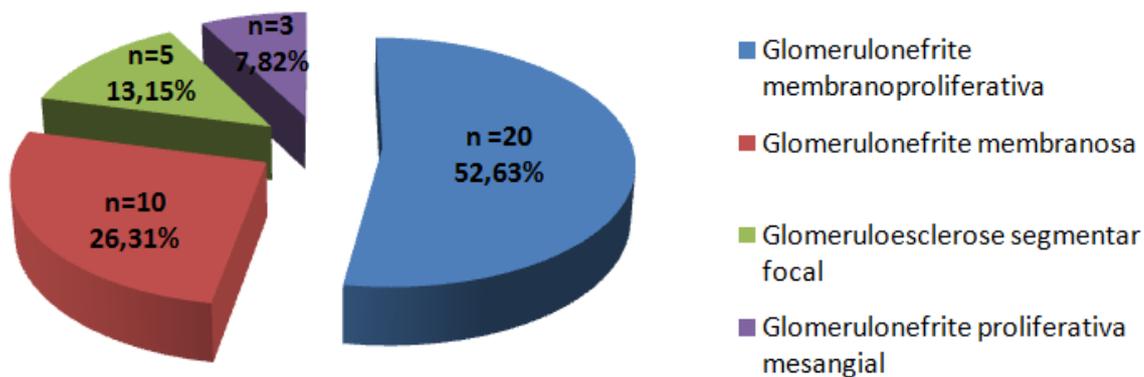


Figura 13: Frequência das glomerulopatias em 61 cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral – Brasília, 2011.

A glomerulonefrite membranoproliferativa foi o tipo mais frequente, sendo observada em 20 casos (52,63%). Destes, quatro cães (20,00%) pertenciam ao grupo assintomático e 16 (80,00%) ao sintomático. Proliferação celular e evidente expansão da matriz mesangial foram visualizadas, associadas a alterações da parede capilar glomerular (figura 14 A). A coloração PAS permitiu visualizar depósito de material PAS positivo ao redor das alças capilares, enquanto que na coloração PAMS foram visualizados espessamento e duplicação da membrana basal glomerular (figura 14 B).

Glomerulonefrite membranosa foi observada em 10 casos (26,31%) sendo três cães (30,00%) assintomáticos e sete (70,00%) sintomáticos. Todos os animais apresentaram espessamento difuso da membrana basal glomerular com arquitetura glomerular preservada e sem aumento da celularidade mesangial. Comumente, o lúmen capilar encontrava-se diminuído ou até mesmo obliterado (figura 15 A). A coloração PAS permitiu visualizar depósito de material PAS positivo ao redor das alças capilares (figura 15 B), enquanto que na coloração PAMS, foram visualizados espessamento e duplicação da membrana basal glomerular. Essas alterações distribuíam-se de forma difusa por todo o glomérulo.

Glomeruloesclerose segmentar focal foi observada em cinco casos (13,15%). Destes, dois cães (40,00%) pertenciam ao grupo assintomático e três (60,00%) ao sintomático. Todos os animais classificados com glomeruloesclerose focal apresentaram, à microscopia de luz, esclerose do tufo glomerular associadas a áreas de colapsos do lúmen capilar de distribuição focal. Observou-se material PAS

positivo nessas áreas focais de glomeruloesclerose, sugerindo a deposição de glicoproteínas. Não foram observadas alterações na membrana basal glomerular na coloração PAMS.

Glomerulonefrite proliferativa mesangial foi observada em três casos (7,82%). Destes, um cão (33,34%) pertenciam ao grupo assintomático e dois (66,66%) ao sintomático. Todos os animais apresentaram proliferação de células mesangiais e expansão da matriz mesangial sem alterações de parede capilar, distribuídas de forma difusa por todo o glomérulo e com intensidade discreta. Comumente, o tufo glomerular preencheu grande parte do espaço de *Bowman*. A parede dos capilares glomerulares apresentou-se normal na coloração PAS e PAMS.

Dos 61 casos estudados, em 23 animais (37,7%) não foram encontradas alterações glomerulares. Oito casos (34,78%) pertenciam ao grupo assintomático e quinze (65,22%) ao grupo sintomático.

Formas amastigotas da *Leishmania* foram visualizados em seis (9,83%) animais sintomáticos, destes quatro (66,66%) apresentaram carga parasitária discreta, um (16,67%) moderado e um (16,67%) acentuado.

Cistos foram observados em 23 (37,70%) animais, destes 16 (69,56%) pertenciam ao grupo sintomático sendo 12 (75,00%) discreto e quatro (25,00%) acentuado. Sete (30,44%) animais pertenciam ao grupo dos assintomáticos, sendo todos discretos.

Congestão foi visualizada em 51 animais (83,60%), destes 36 (70,58%) animais pertenciam ao grupo dos sintomáticos e 15 (29,42%) ao assintomáticos. Dos sintomáticos 10 (27,78%) apresentaram congestão discreta, 22 (61,11%) moderada e quatro (11,11%) acentuado. No grupo dos assintomáticos sete (46,67%) apresentaram congestão discreta, cinco (33,33%) moderada e três (20,00%) acentuado.

Tabela 6: Resultados da avaliação histopatológica do rim de 61 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010).

	Grau Infiltrado		Tipo infiltrado inflamatório intersticial								Glomérulo				AMG		Diagnóstico											
	S	A	HP		LP		LH		PI		GNMP		GNMB		GNSF		GNPM		S	A	Dg H		CHIT		CISTO		CONG	
Ausente	10	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37	18	8	2	22	10	27	11	7	3
+	11	5	0	2	8	2	0	0	3	1	4	2	1	3	2	1	2	1	4	0	20	8	5	5	12	7	10	7
++	14	6	2	2	8	3	1	0	3	1	10	1	5	0	1	1	0	0	1	0	12	6	11	3	0	0	22	5
+++	8	1	4	1	1	0	1	0	2	0	2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	3	2	5	0	4	0	4	3
Total	43	18	6	5	17	5	2	0	8	2	16	4	7	3	3	2	2	1	43	18	43	18	43	18	43	18	43	18

(+) = discreto; (++) moderado; (+++) acentuado; HP – Histioplasmocítico; LP: Linfoplasmocítico; LH: Linfohistiocítico; PI: Plasmocítico; GNMP: Glomerulonefrite; GNMB: Glomerulonefrite membranosa; GNSF: Glomeruloesclerose Segmentar Focal; GNPM: Glomerulonefrite Proliferativa Mesangial; AMG: Amastigota; Dg H: Degeneração Hidrópica; CHIT: Cilindro Hialino Intratubular; Cong: Congestão; S: sintomático; A: assintomático

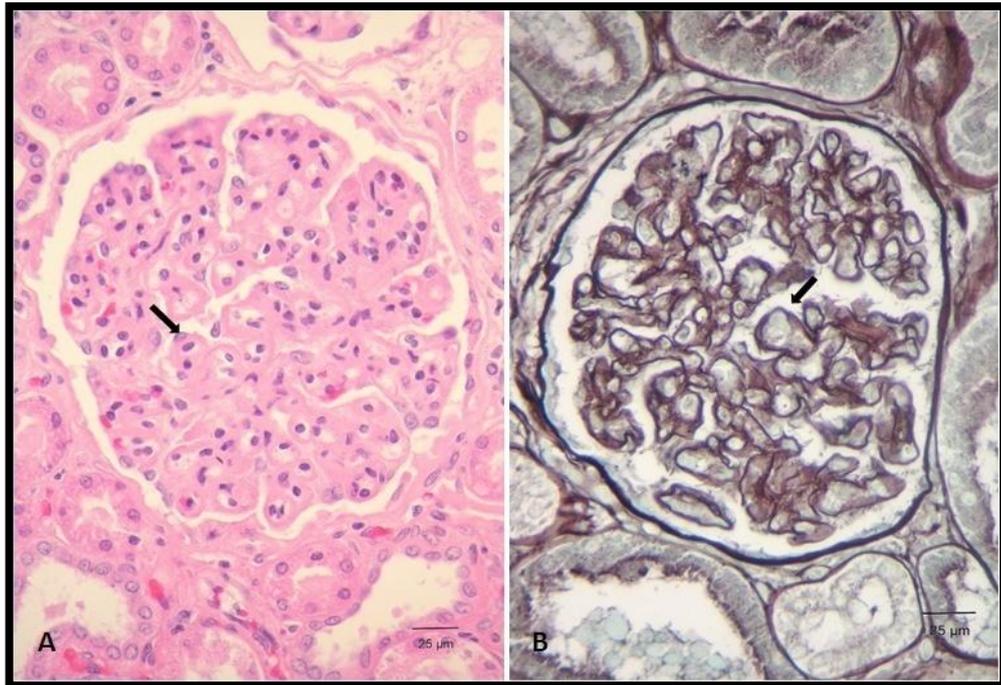


Figura 14: Glomerulonefrite membranoproliferativa em um cão com Leishmaniose Visceral Canina (Brasília, 2010) **A.** Proliferação e aumento da celularidade mesangial; espessamento da parede capilar glomerular com diminuição de sua luz (seta). Coloração HE. **B.** Espessamento e duplicação da membrana basal dos capilares glomerulares (seta). Coloração PAMS.

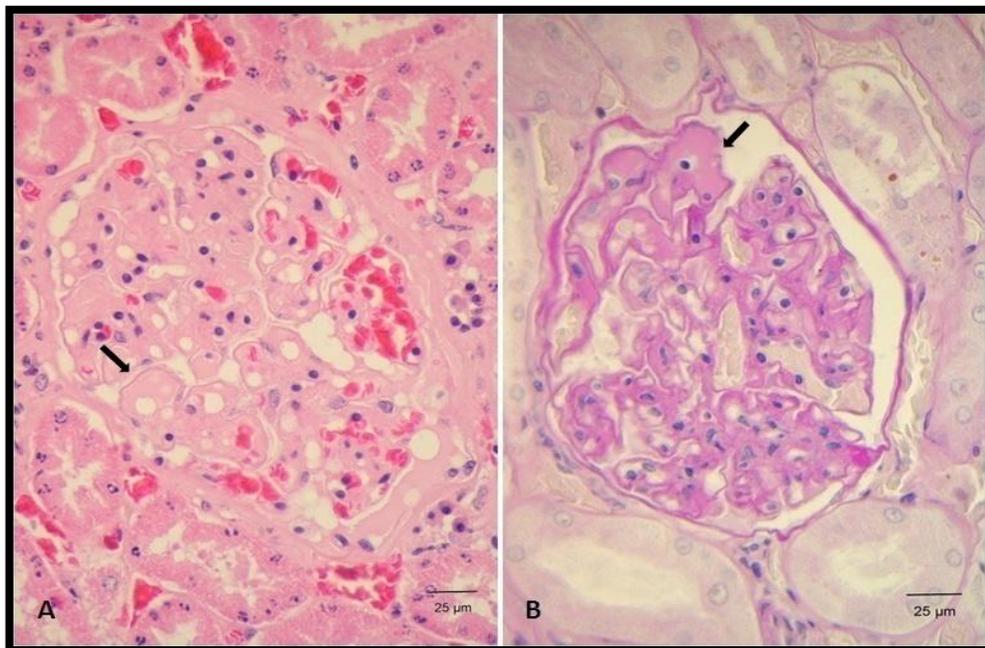


Figura 15: Glomerulonefrite membranosa em cão com leishmaniose visceral canina. (Brasília, 2010) **A.** Espessamento da parede capilar glomerular com diminuição de sua luz (seta). Coloração HE. **B.** Depósito de material PAS positivo ao redor de alças capilares (seta). Coloração PAS.

3.6 Alterações histológicas no olho

Dos 36 animais analisados 21 (58,33%) apresentaram infiltrado inflamatório, sendo 14 (66,64%) do grupo dos animais sintomáticos e sete (33,33%) dos assintomáticos. Dos animais sintomáticos seis (42,86%) apresentaram infiltrado discreto, sendo três (50,00%) histioplasmocítico, um (16,67%) linfocítico, um (16,67%) histiocítico e um (16,66%) linfocítico. Destes animais três (50,00%) apresentaram distribuição perivascular (figura 16) e três (50,00%) em conjuntiva bulbar (figura 17).

Quatro (28,57%) animais sintomáticos apresentaram infiltrado inflamatório moderado sendo dois (50,00%) histioplasmocítico, um (25,00%) histiocítico e um (25,00%) linfocítico. Quanto a distribuição, foram dois (50,00%) casos em conjuntiva bulbar, um (25,00%) perivascular e um (25,00%) na substância fibrilar da córnea.

Quatro (28,57%) animais sintomáticos apresentaram infiltrado inflamatório acentuado, sendo três (75,00%) com infiltrado histioplasmocítico e um (25,00%) histiocítico. Destes três (75,00%) apresentaram distribuição em conjuntiva bulbar e um (25,00%) em córnea (figura 18).

No grupo dos animais assintomáticos, quatro (57,14%) apresentaram infiltrado discreto constituído por infiltrado linfoplasmocítico em um (25,00%) animal, um (25,00%) histiocítico, um (25,00%) linfocítico, e um (25,00%) plasmocítico. A distribuição perivascular ocorreu em dois (50,00%) cães e periglandular em outros dois (50,00%). Um animal apresentou infiltrado acentuado sendo histioplasmocítico com localização perivascular.

Dois (28,57%) animais assintomáticos apresentaram infiltrado moderado, representado por um (50,00%) histioplasmocítico e um (50,00%) linfoplasmocítico. A localização foi um (50,00%) em conjuntiva bulbar e um (50,00%) perivascular.

Apenas um (14,29%) animal assintomático apresentou infiltrado acentuado sendo histioplasmocítico perivascular (100,00%).

Formas amastigotas da *Leishmania* (figura 19) foram visualizadas em três (14,28%) cães dos que apresentaram infiltrado inflamatório, conforme demonstrado na tabela 7.

Tabela 7: Resultados da avaliação histopatológica do olho de 36 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010).

	Grau Infiltrado		Tipo infiltrado								AMG		Distribuição infiltrado											
	S	A	HP		LP		LH		PI		Ht		Lf		S	A	CB		PV		Co		PG	
	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A
Ausente	9	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	12	-	-	-	-	-	-	-	-
+	6	4	3	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	3	0	3	2	0	0	0	2
++	4	2	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	0	0
+++	4	1	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3	0	0	1	1	0	0	0
Total	23	13	8	2	0	2	1	0	0	1	3	1	2	1	23	13	8	1	4	4	2	0	0	2

(+) = discreto; (++) moderado; (+++) acentuado; HP – Histioplasmocítico; LP: Linfoplasmocítico; LH: Linfohistiocítico; PI: Plasmocítico; Ht: Histiocítico; Lf: Linfocítico; CB: Conjuntiva Bulbar; PV: perivascular; Co: Córnea; PG: Periglandular; AMG: Amastigota; S: sintomático; A: assintomático

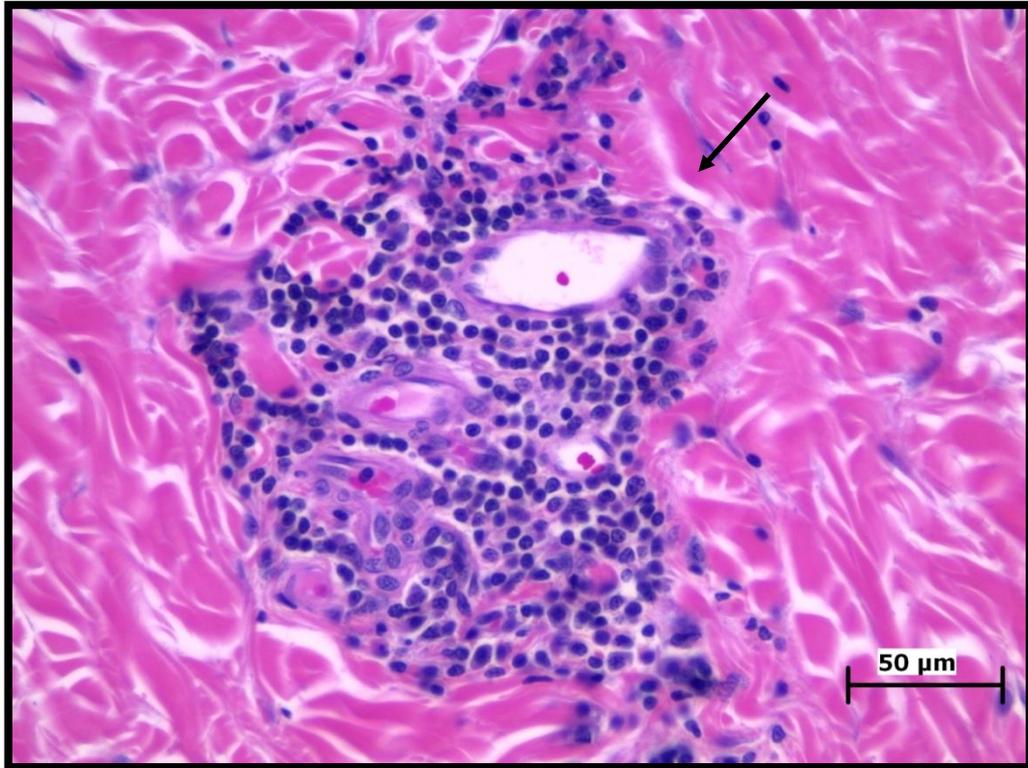


Figura 16: Infiltrado inflamatório perivascular (seta) no olho de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010)

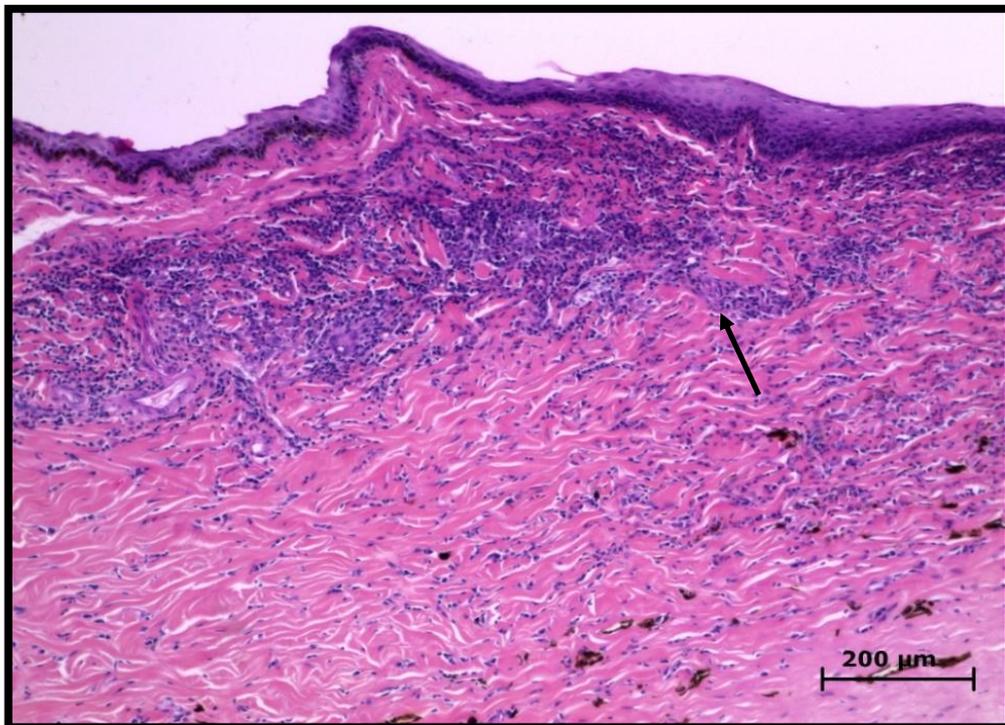


Figura 17: Infiltrado inflamatório (seta) na conjuntiva bulbar do olho de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010)



Figura 18: Infiltrado inflamatório (seta) em córnea do olho de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010)

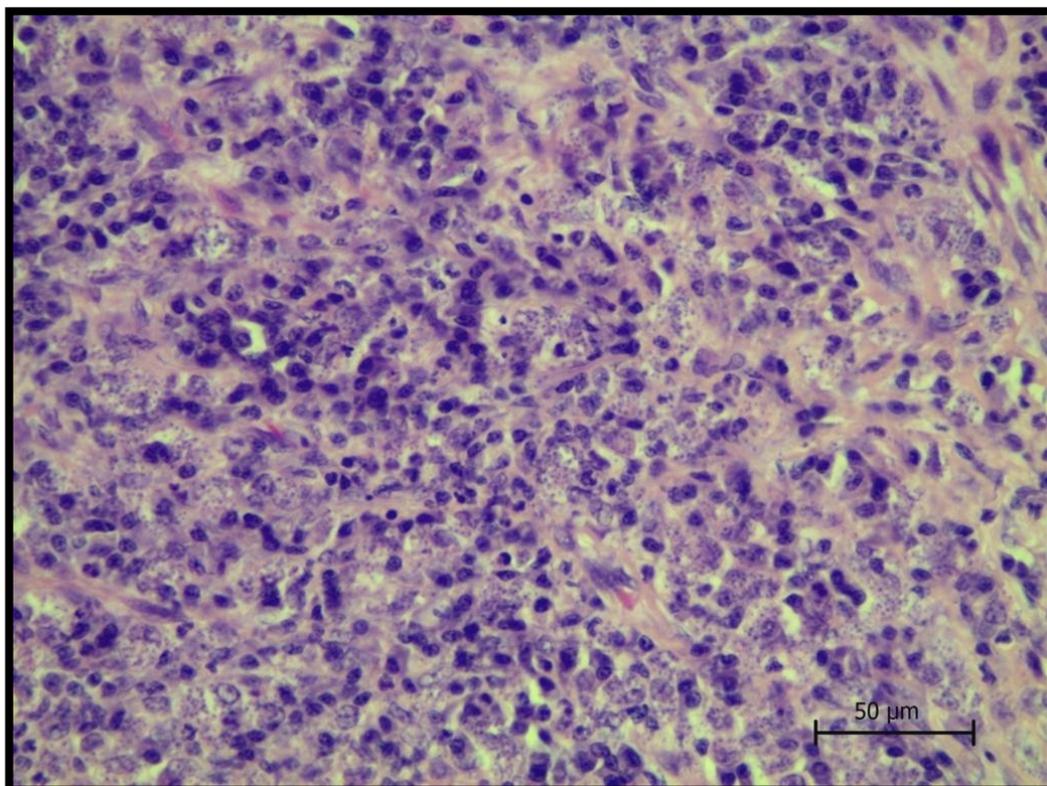


Figura 19: Inúmeras da formas amastigotas no olho de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

3.7 Alterações histológicas no pulmão

Dos 59 animais analisados, 29 (49,15%) apresentaram alterações inflamatórias (figura 20), variando de discreta a acentuada. Destes, 20 (68,96%) animais do grupo sintomático e nove (31,04%) assintomáticos. No grupo dos sintomáticos sete (35%) apresentaram infiltrado discreto, sendo três (42,85%) histiocítico, dois (28,57%) linfocitocitário, um (14,29%) histioplasmocítico e um (14,29%) plasmocítico. Quanto a distribuição foram quatro (57,14%) perivascular, dois (28,57%) em septos e um (14,29%) peribronquiolar.

Onze (55%) animais sintomáticos apresentaram infiltrado moderado. Destes, cinco (45,45%) histiocítico, três (27,28%) histioplasmocítico, um (9,09%) linfoplasmocítico, um (9,09%) linfocitocitário e um (9,09%) linfocítico. Quanto à localização foram cinco (45,45%) perivascular, quatro (36,36%) em septo alveolar, e dois (18,19%) peribronquiolar.

Dois (10%) animais sintomáticos apresentaram infiltrado acentuado, sendo um (50,00%) histioplasmocítico e um (50,00%) histiocítico. Um (50,00%) em septo alveolar e um (50,00%) perivascular.

Dos animais assintomáticos seis apresentaram infiltrado discreto. Destes, dois (33,32%) histiocítico, um (16,67%) linfoplasmocítico, um (16,67%) linfocitocitário, um (16,67%) histioplasmocítico e um (16,67%) eosinofílico. Quanto a localização foram quatro (66,67%) perivascular, um (16,67%) em septo alveolar e um (16,67%) focal.

Três animais assintomáticos apresentaram infiltrado moderado. Sendo, um (33,33%) linfoplasmocítico, um (33,33%) histioplasmocítico e um (33,34%) histiocítico. Estavam localizados um (33,33%) em septo alveolar, um (33,33%) perivascular e um (33,34%) peribronquiolar.

Amastigotas (figura 21) foram visualizadas em três (5,08%) cães sintomáticos sendo em dois com carga parasitária discreta e um moderada.

Congestão foi observada em 58 (98,30%) animais. Destes, 42 (72,42%) animais sintomáticos e 16 (27,58%) animais assintomáticos. Edema estava presente em 38 (64,40%) animais. Destes, 27 (71,06%) animais sintomáticos e 11 (28,94%) animais assintomáticos. Antracose foi visualizada em 30 (50,84%) animais. A severidade das lesões pode ser visualizada na tabela 8.

Tabela 8: Resultados da avaliação histopatológica do pulmão de 59 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina (Brasília, 2010).

	Grau Infiltrado		Tipo infiltrado										Distribuição infiltrado						AMG		Diagnóstico											
	S	A	LP		LH		HP		Ht		PI		Eo		Lf		SEP		PV		FC		PB		S	A	edm		Cong		ant	
Ausente	23	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	16	16	5	1	0	20	9
+	7	6	0	1	2	1	1	1	3	2	1	0	0	1	0	0	2	1	4	4	0	1	1	0	2	0	9	1	3	0	12	4
++	11	3	1	1	1	0	3	1	5	1	0	0	0	1	0	4	1	5	1	0	0	2	1	1	0	13	5	23	5	11	2	
+++	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5	5	16	11	0	1	
Total	43	16	1	2	3	1	5	2	9	3	1	0	0	1	1	0	7	2	10	5	0	1	3	1	43	16	43	16	43	16	43	16

(+) = discreto; (++) moderado; (+++) acentuado;; LP: Linfoplasmocítico; LH: Linfohistiocítico; HP: Histioplasmocítico; Ht: Histiocítico; PI: Plasmocítico; Eo: eosinofílico; Lf: Linfocítico; SEP: Septo; PV: Perivascular; FC: Focal; PB: Peribronquiolar; AMG: Amastigota; Edm: Edema; Cong: Congestão; Ant: Antracose. S: sintomático; A: assintomático.

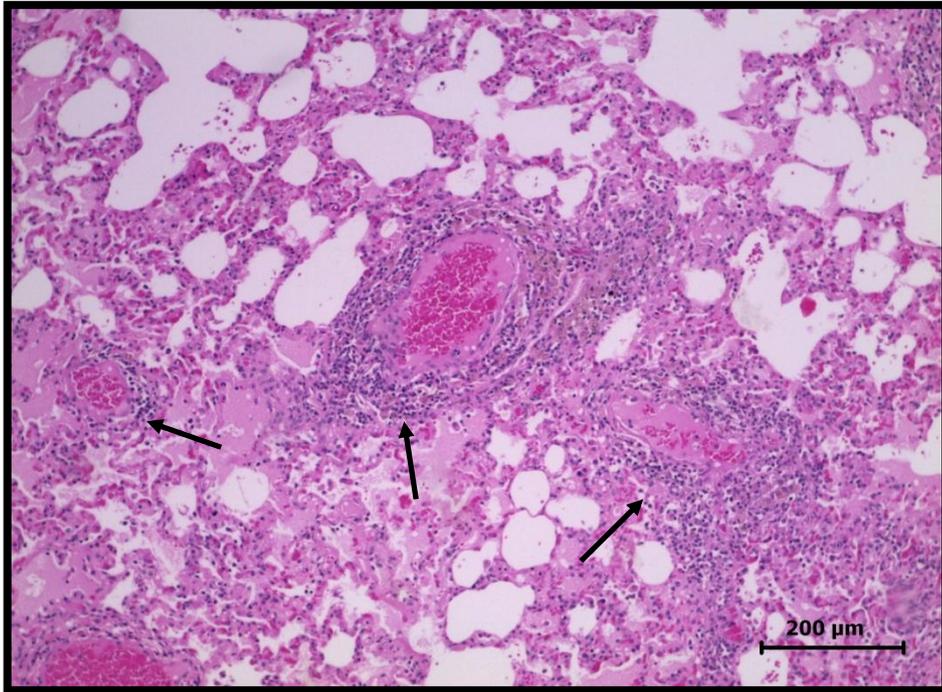


Figura 20: Infiltrado inflamatório histioplasmocítico perivascular (setas) no pulmão de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

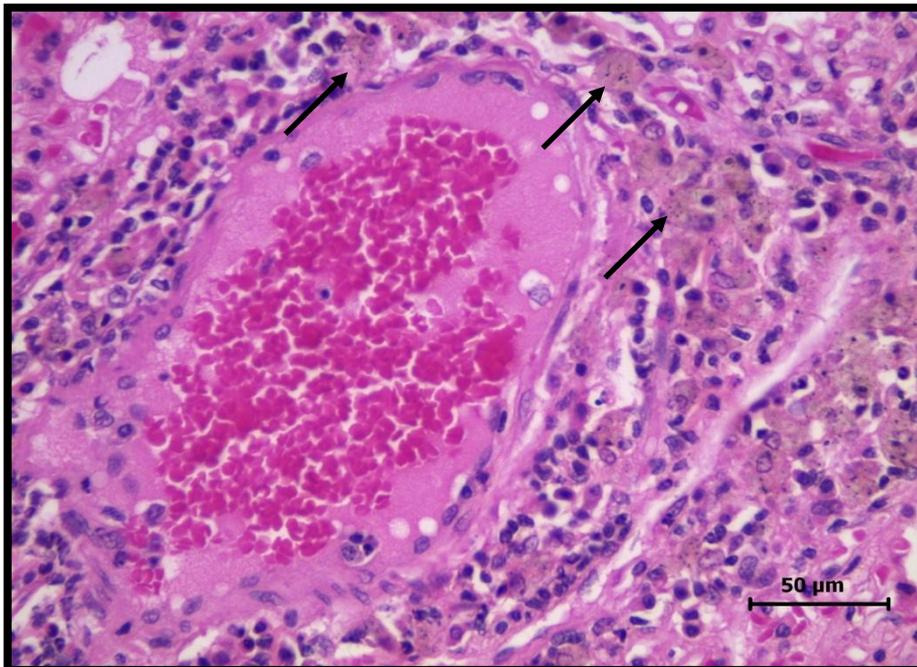


Figura 21: Presença de amastigotas associado ao infiltrado inflamatório histioplasmocítico perivascular no pulmão de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

3.8 Alterações histológicas no intestino

Dos 61 animais analisados, 44 (72,13%) apresentaram infiltrado inflamatório. Sendo 29 (65,90%) do grupo dos sintomáticos e 15 (34,10%) do grupo dos assintomáticos. Dezenove (65,52%) animais sintomáticos apresentaram infiltrado inflamatório discreto, sendo que 18 (94,74%) animais apresentaram infiltrado por eosinófilos e apenas um (5,26%) por histiócitos. Nove (31,03%) animais apresentaram infiltrado moderado constituído por histiócitos em três (33,34%) casos, eosinófilos em dois (22,22%) casos, linfoplasmocítico em dois (22,22%) casos e plasmocítico em dois (22,22%) casos. Apenas um (3,45%) animal apresentou infiltrado acentuado constituído por histiócitos (100,00%).

No grupo dos assintomáticos 10 (66,66%) animais apresentaram infiltrado inflamatório discreto sendo sete (70,00%) constituído por eosinófilos, dois (20,00%) por plasmócitos e um (10,00%) por histiócitos. Cinco (33,34%) animais apresentaram infiltrado moderado sendo três (60,00%) histiocítico, 1 (20,00%) por eosinófilos e um (20,00%) linfohistiocítico

A placa de Peyer estava aumentada (figura 22) em nove animais sendo cinco (55,56%) do grupo dos sintomáticos e quatro (44,44%) do grupo dos assintomáticos.

Tabela 9: Resultados da avaliação histopatológica do intestino de 61 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina (Brasília, 2010).

	Grau Infiltrado		Tipo infiltrado										
			Eo		LP		LH		Ht		Pl		
	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	
Ausente	15	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	19	10	18	7	0	0	0	0	1	1	0	2	
++	9	5	2	1	2	0	0	1	3	3	2	0	
+++	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
Total	44	17	20	8	2	0	0	1	5	4	2	2	

(+) = discreto; (++) moderado; (+++) acentuado; Eo: Eosinófilo; LP: Linfoplasmocítico; LH: Linfohistiocítico; Ht: Histiocítico; Pl: Plasmocítico; S: sintomático; A: assintomático.

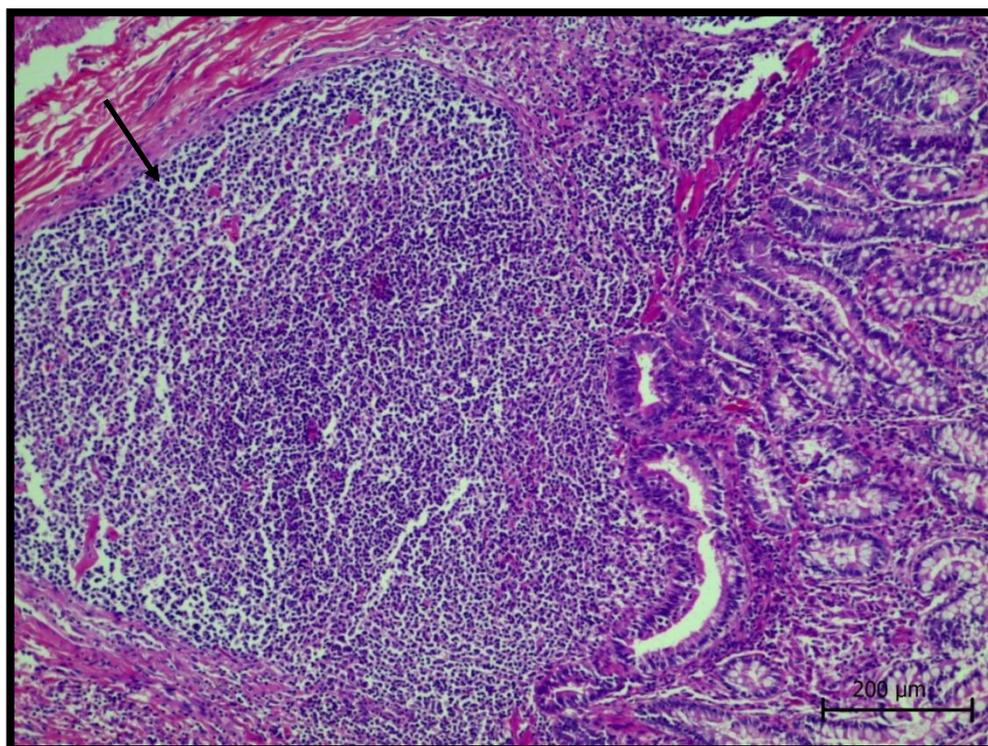


Figura 22: Placa de Peyer aumentada (seta) no intestino de um cão Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

3.9 Alterações histológicas no estômago

Dos 56 animais analisados apenas 10 (17,85%) apresentaram infiltrado inflamatório em mucosa e submucosa gástricas, sendo seis (60%) do grupo dos sintomáticos e quatro (40%) do grupo dos assintomáticos. Nos sintomáticos, três (50%) apresentaram infiltrado discreto sendo dois (66,67%) linfocíticos e um (33,33%) histioplasmocítico. Três (50%) apresentaram infiltrado moderado sendo um (33,33%) histioplasmocítico, um (33,33%) linfohistiocítico e um (33,34%) eosinofílico.

No grupo dos assintomáticos, os quatro apresentaram infiltrado discreto sendo três (75,00%) linfocítico e um (25,00%) histioplasmocítico.

Mineralização em mucosa e submucosa (figura 23) foi visualizada em seis (10,71%) casos sendo cinco (83,34%) no grupo dos sintomáticos e um (16,66%) nos assintomáticos. A severidade da lesão pode ser visualizada na tabela 10.

Formas amastigotas não foram encontradas.

Tabela 10: Resultados da avaliação histopatológica no estômago de 56 cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina (Brasília, 2010).

	Grau Infiltrado		Tipo infiltrado								Diagnóstico		
			HP		LH		Lf		Eo		MINER		
	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	
Ausente	35	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	14
+	3	4	1	1	0	0	2	3	0	0	0	0	0
++	3	0	1	0	1	0	0	0	1	0	2	0	0
+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
Total	41	15	2	1	1	0	2	3	1	0	41	14	0

(+) = discreto; (++) moderado; (+++) acentuado;; HP: Histioplasmocítico; LH: Linfohistiocítico; Lf: Linfocítico; Eo: Eosinófilo; MINER: Mineralização; S: sintomático; A: assintomático.

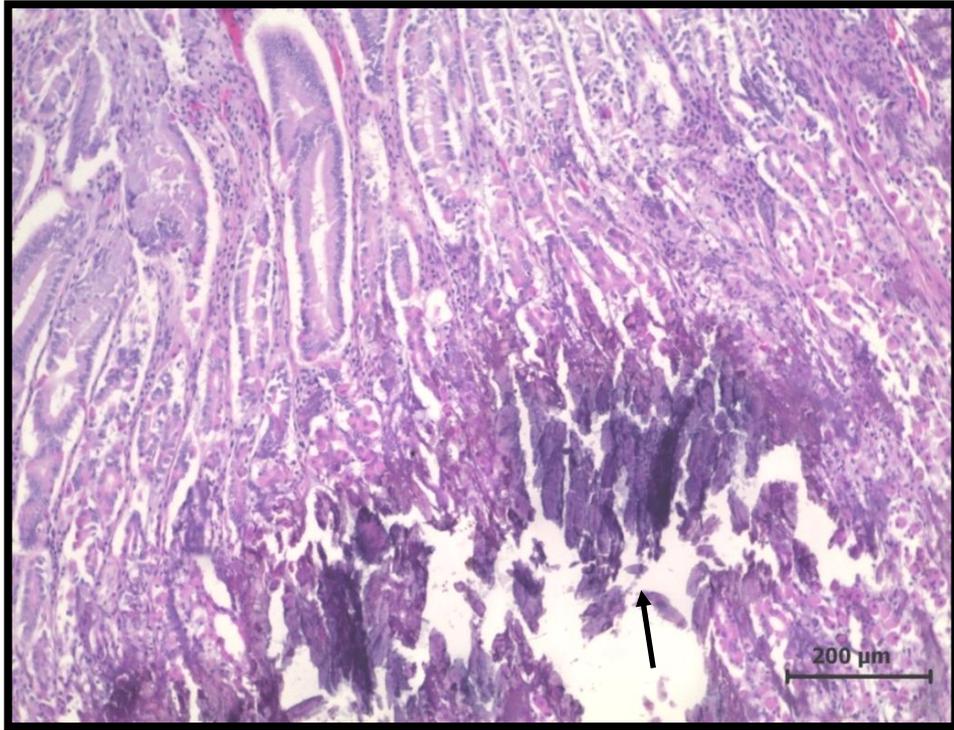


Figura 23: Mineralização acentuada (seta) na mucosa gástrica de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010)

3.10 Alterações histológicas sistema nervoso central

A principal alteração histopatológica observada no sistema nervoso central (SNC) dos animais do estudo foi infiltrado inflamatório (figura 24) localizado nas meninges e perivascular no parênquima cerebral em 14,66% dos cães com LVC variando de leve a moderada em intensidade.

Quarenta (42,10%) cortes apresentaram infiltrado linfohistiocítico em 24 (60,00%) sintomáticos e 16 (40,00%) assintomáticos. Trinta e quatro (35,78%) cortes apresentaram infiltrado linfoplasmocítico, destes 24 (70,58%) sintomáticos e 10 (29,41%) assintomáticos. Infiltrado histioplasmocítico foi observado em 21 (22,10%) cortes sendo nove (42,85%) em sintomáticos e 12 (57,14%) assintomáticos.

Quanto à distribuição 75 (78,94%) cortes apresentaram distribuição multifocal em 40 (53,33%) sintomáticos e 35 (46,66%) assintomáticos. Vinte (21,05%) cortes apresentaram distribuição focal. Destes 17 (85%) pertenciam aos sintomáticos e três (15%) aos assintomáticos.

Quanto à localização 79 (83,15%) das amostras apresentaram infiltrado em meninges, sendo 45 (56,96%) sintomáticos e 34 (43,03%) assintomáticos. Dezesesseis (16,84%) cortes apresentaram infiltrado perivascular no parênquima cerebral; destes 12 (75,00%) sintomáticos e quatro (25,00%) assintomáticos.

Não foram observadas quaisquer alterações degenerativas ou necróticas em todas as regiões analisadas.

As principais regiões do SNC com alterações inflamatórias podem ser visualizadas na tabela 11.

Nos testes imuno-histoquímicos não foram encontrados formas amastigotas do parasita nas diversas secções do SNC dos animais que apresentaram alterações inflamatórias.

Tabela 11: Regiões do tecido nervoso com infiltrado inflamatório, de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010).

	Região																							
	CF		CP		CT		CO		CI		HP		TL		CL		PT		OB		CB		ME	
	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A
Ausente	31	17	29	13	27	17	27	12	30	16	30	19	32	17	32	15	32	18	33	19	30	14	30	19
+	4	2	5	4	6	1	8	5	5	2	4	0	3	2	3	3	3	0	2	0	5	5	5	0
++	0	0	1	2	2	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	35	19	35	19	35	19	35	19	35	19	35	19	35	19	35	19	35	19	35	19	35	19	35	19

CF: Córtex Frontal; CP: Córtex Parietal; CT: Córtex Temporal; CO: Córtex Occipital; CI: Cápsula Interna; HP: Hipocampo; TL: Tálamo; CL: Colículo; PT: Ponte; OB: Óbex; CB: Cerebelo; ME: Medula Espinhal; S: sintomático; A: assintomático.

Tabela 12: Resultados da avaliação histopatológica do tecido nervoso de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal (Brasília, 2010).

	Tipo infiltrado						Distribuição				Local			
	HP		LP		LH		FC		MF		M		PVP	
	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A
Ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	6	10	24	9	23	10	15	3	38	26	41	28	12	1
++	3	2	0	1	1	6	2	0	2	9	4	6	0	3
+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	9	12	24	10	24	16	17	3	40	35	45	34	12	4

(+) = discreto; (++) moderado; (+++) acentuado; HP – Histioplasmocítico; LP: Linfoplasmocítico; LH: Linfohistiocítico; FC: Focal; MF: Multifocal; M: Meninge; PVP: Perivascular no parênquima; S: sintomático; A: assintomático.

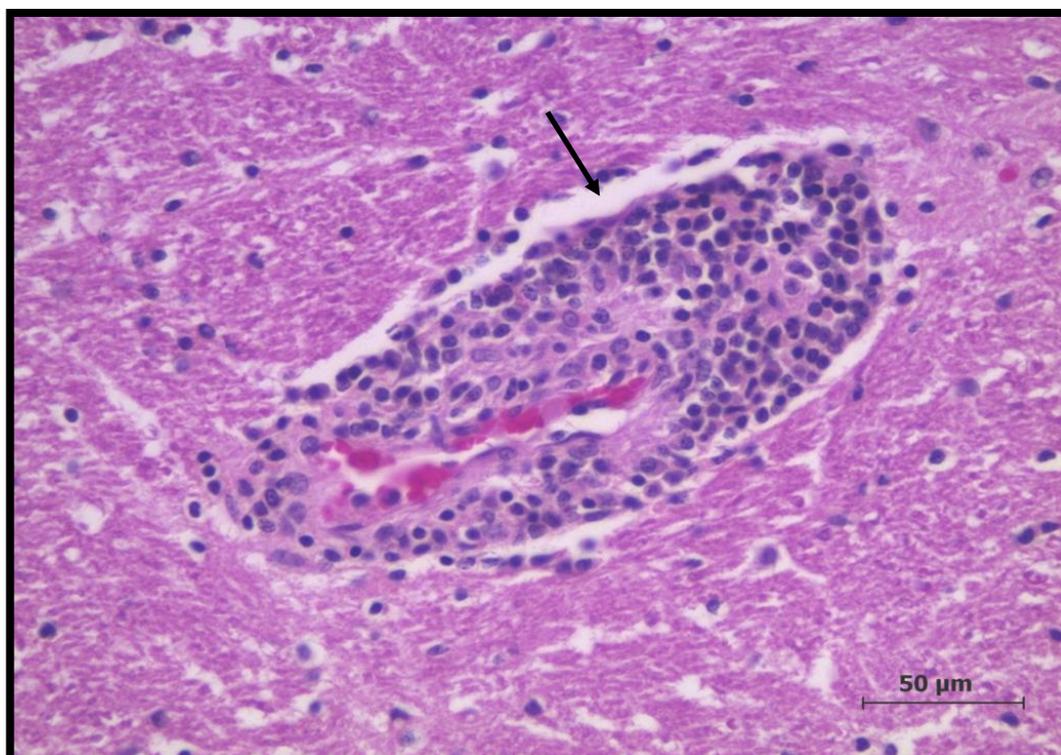


Figura 24: Infiltrado inflamatório (seta) perivascular no tecido nervoso de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (HE – Brasília, 2010).

4. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de grande impacto na saúde pública e no Brasil encontra-se amplamente difundida (SANTOS *et al.*, 2010). É uma doença progressiva crônica que é frequentemente fatal (CALABRESE *et al.*, 2010). Atualmente é considerada uma das seis principais doenças endêmicas de prioridade no mundo (MOREIRA *et al.*, 2010).

Os principais sinais clínicos observados nos cães do Distrito Federal com LVC encontrados foram linfadenopatia, lesões alopécicas, hepatoesplenomegalia e palidez das mucosas. Todos os sinais clínicos encontrados já foram previamente descritos em cães com LVC (MARZOCHI *et al.*, 1985; SLAPPENDEL, 1988; DENEROLLE, 1996; CIAMARELLA *et al.*, 1997; FERRER, 1999; KOUTINAS *et al.*, 1999; FEITOSA *et al.*, 2000; AMUSATEGUI *et al.*, 2003; ZARAGOZA *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2005; AGUIAR *et al.*, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Todavia, Lima (2007) descreveu que os sinais clínicos mais comuns na LVC são febre, descamação, eczema e ulcerações leves, principalmente no espelho nasal, orelha, cauda e articulações, pêlos opacos e úlceras de decúbito. Estas diferenças observadas nas manifestações clínicas da LVC possivelmente se devam a um variado espectro de lesões e alterações patológicas, sendo esses derivados das complexas interações da relação do parasito com seu hospedeiro (GENARO, 1993).

Linfadenopatia foi à principal alteração detectada nos cães do DF com LVC. Esta alteração também foi predominante em cães infectados pelo parasita em outras regiões do País (KONDO, 2008). Acredita-se que o aumento generalizado dos linfonodos esteja associado ao acúmulo de células fagocíticas mononucleares que levam à hipertrofia e hiperplasia desse órgão (MALLA & MAHAJAN, 2006).

As lesões alopécicas ocorreram com maior frequência nos membros e orelhas. Ciamarella *et al.* (1997) observaram alopecia, geralmente iniciando na cabeça (especialmente ouvidos e região dos olhos) e estendendo para o restante do corpo. Nogueira *et al.* (2009) descrevem alopecia, principalmente, ao redor dos olhos, nariz, boca e orelhas. Um das explicações, de acordo com Hommel (1978), estaria associada a ação direta da *Leishmania spp.* sobre o folículo piloso ou por distúrbios do metabolismo do ácido pantotênico causado por lesões hepáticas, ou

ainda pela deposição de imunocomplexos na membrana basal da pele induzindo um processo auto-imune que desencadearia a alopecia.

Hepatoesplenomegalia foi o terceiro sinal mais observado e com grande frequência é encontrada nas fases mais adiantadas da doença (LIMA, 2007). No entanto o aumento desses órgãos não é necessariamente sempre observado na doença (MELO, 2005). Estas diferenças, assim como acontece com outras alterações clínicas, possivelmente sejam decorrentes à complexidade das alterações provocadas pelo parasita e resposta do hospedeiro.

Mucosas hipocoradas também foi relatada nos animais necropsiados no DF. A anemia pode estar diretamente relacionada à sintomatologia da LV, pois tem sido freqüentemente descrita em associação à enfermidade (DEDET, 1979; SLAPPENDEL, 1988; CIRAMELLA *et al.*, 1997; MOURA *et al.*, 2002; AGUIAR *et al.*, 2007). A anemia na LVC é de origem multifatorial e pode estar associada a perdas sanguíneas (epistaxe, ulcerações na pele, perdas intestinais, hematúria), hemólise, inflamações generalizadas e insuficiência renal com a diminuição da produção de eritropoietina (KOUTINAS *et al.*, 1999; COSTA-VAL *et al.*, 2007). A ação nociva direta do parasita na medula óssea também poderia explicar a hipoplasia ou aplasia medular como causa de anemia severa em cães com a doença (PRATA & SILVA, 2005). Além disso, uma diminuição da maleabilidade dos eritrócitos encontrada em cães com a doença pode promover o sequestro esplênico e destruição dessas células (De LUNA *et al.*, 2000).

Outro sinal observado foi à baixa condição corporal. Para Abranches *et al.* (1998), a caquexia pode ocorrer na fase final da infecção e com frequência progride para emaciação, tanto em humanos quanto em animais. Níveis elevados do Fator de Necrose Tumoral (TNF) durante a infecção pelo parasita poderia ser um dos responsáveis tanto pelo emagrecimento quanto pela desorganização do tecido linfóide. Santana *et al.* (2008) observaram que existem associações entre alterações morfológicas no baço e emagrecimento. Segundo Melo (2005), o emagrecimento pode também ser devido à infiltração do parasita na mucosa do aparelho digestivo ou em virtude do desequilíbrio protéico que induz a uma albuminúria.

As úlceras cutâneas também foram um sinal clínico encontrado nos animais avaliados no DF. Pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações são visualizadas na LVC (BRASIL, 2006). A

presença dessa lesão está creditada à resposta do hospedeiro vertebrado diretamente contra o parasita na pele e também à vasculite necrosante causada por deposição de imunocomplexos (RIDLEY & RIDLEY, 1983; PUMAROLA *et al.*, 1991).

Na população de cães avaliada não foi constatada predisposição sexual de maneira similar ao observado em outras descrições da doença (NOLI, 1999; FEITOSA *et al.*, 2000; AMUSATEGUI *et al.*, 2003; ZATELLI *et al.*, 2003). Até o momento são desconhecidos fatores que possam influenciar na predisposição sexual para ocorrência da LVC, entretanto, é importante ressaltar que nas fêmeas, durante flutuações hormonais do ciclo estral possa haver alguma interferência sobre a disseminação e capacidade de infecção do parasita, ainda não caracterizada.

As principais raças acometidas foram cães sem raça definida e raças utilizadas como cães de guarda, porém ainda não foi verificada predisposição racial com a infecção do animal (BRASIL, 2006). Parece bastante evidente que o modo de vida de cada cão possa favorecer a sua exposição aos vetores e, por conseguinte a infecção, como é o caso de cães de guarda noturnos (SANTOS *et al.*, 2010). Acredita-se que as raças miniaturas sejam menos afetadas por comumente viverem no interior dos domicílios (CIAMARELLA *et al.*, 1997; AMUSATEGUI *et al.*, 2003). Os animais sem raça definida, em sua maioria eram oriundos de regiões do DF habitadas por população de baixa renda, onde se concentram maior número de animais errantes e também os casos de LVC. Isto poderia explicar a maior quantidade de animais SRD observados nesse levantamento.

A infecção no cão com *L. chagasi*, principal agente causador da LVC no Brasil, é clinicamente semelhante à infecção humana (ALVES *et al.*, 2010). Em virtude da necessidade de notificação compulsória da doença, o diagnóstico da LVC deve ser feito de forma precisa (NOGUEIRA *et al.*, 2009). Compreendendo as lesões da Leishmaniose nos diferentes órgãos, é possível traçar estratégias para pesquisar as diferenças fundamentais entre animais sintomáticos e assintomáticos, com vistas à vigilância epidemiológica eficaz e ao controle da disseminação da doença (CARVALHO *et al.*, 2007).

Apesar do fato da linfadenomegalia generalizada ser uma característica clínica clássica descrita na LVC o aspecto histológico do linfonodo ainda é pouco investigado (GIUNCHETTI *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2004).

Foram encontradas hiperplasia e hipertrofia dos folículos linfoides em 73,08% animais sintomáticos e 26,92% dos animais assintomáticos. Todavia, a hipertrofia e hiperplasia da zona cortical do linfonodo é a principal característica dos cães assintomáticos, enquanto atrofia da zona cortical é o achado histopatológico predominante nos animais sintomáticos (GIUNCHETTI *et al.*, 2007). Atrofia dos folículos linfoides foi visualizada 73,34% animais sintomáticos e 26,66% assintomáticos nos cães do DF. De acordo com Giunchetti *et al.* (2007), depleção de estruturas foliculares e linfócitos, os quais tem sido substituídos principalmente por macrófagos, são as principais características histológicas do linfonodo nas zonas corticais. Segundo Moreira *et al.* (2010) pode-se visualizar características histopatológicas similares entre linfonodos de cães com leishmaniose, independentemente do estágio clínico da doença.

Na região de seio medular foi observada histiocitose em 50 (86,20%) animais. Nos linfonodos, o aumento de número e tamanho dos folículos linfoides e a hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos medulares (cordões e seios) explicam a linfadenomegalia observada clinicamente (MOREIRA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2004).

Juntamente com a histiocitose foi possível visualizar formas amastigotas em 35 (60,34%) animais, sendo 28 (80%) animais sintomáticos e 7 (20%) assintomático. Formas amastigotas de *leishmania* costumam ser facilmente encontradas dentro de macrófagos nos cordões medulares e sinus (LIMA *et al.*, 2004). A presença de macrófagos altamente parasitados no parênquima de órgãos linfóides de animais assintomáticos também foi observada, sendo uma observação de importância na epidemiologia da doença (ABRANCHES *et al.*, 1998; NATAMI *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004; XAVIER *et al.*, 2006).

Nos cordões medulares 17 (29,31 %) animais apresentaram plasmocitose. O grande número de plasmócitos é achado frequente em linfonodos, assim como em outros órgãos linfoides como o baço (TAFURI, 1995). Estas características também tem sido demonstradas na leishmaniose visceral humana (MOREIRA *et al.*, 2010). O infiltrado de plasmócitos é esperada devido ativação policlonal e proliferação de linfócitos B, que induz aumento destas células no córtex, centro germinativo e

cordões medulares dos linfonodos (MOREIRA *et al.*, 2010). Infiltrado celular na região medular do linfonodo de cães infectados por *L. chagasi* foram principalmente caracterizados pela hipertrofia e hiperplasia dos plasmócitos quando comparados com a frequência de macrófagos e linfócitos. Este tem sido identificado como o achado histológico mais relevante da região medular (GIUNCHETTI *et al.*, 2007).

Visualizou-se corpúsculo de Russel nos plasmócitos em quatro animais, corroborando com os achados de Tafuri (1995), Martinez-Moreno *et al.* (1993), Lima *et al.* (2004) e Lima *et al.* (2007) que observaram nos cordões medulares a predominância de plasmócitos, às vezes com a formação de corpúsculos de Russell.

Alterações inflamatórias na cápsula dos linfonodos foram visualizadas em 84,48% dos animais analisados. Na maioria dos casos, apresenta-se espessada e invadida por infiltrado inflamatório mononuclear (KONDO *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2004). Infiltrado histioplasmocítico foi visualizado em 77,55% dos animais na região capsular. Conforme Lima *et al.* (2004), em cães com LVC, macrófagos são as principais células inflamatórias presentes na cápsula e alguns apresentaram formas amastigotas no citoplasma. Isto é reforçado pelo achado das formas amastigotas do parasita em 34,69% dos animais, o que pode ter influenciado na migração e acúmulo de macrófagos no local.

Edema em linfonodos foi visualizado em aproximadamente um terço dos animais analisados. Lima *et al.* (2004) descreveram que edema pode ser encontrado em alguns casos no cordões e sinus como um fluido tissular extracelular eosinofílico e amorfo, provavelmente devido ao processo inflamatório local que gera aumento da permeabilidade.

Depósitos de hemossiderina foram encontrados em 81,03% linfonodos dos animais avaliados. Lima *et al.* (2004) observaram pequenos granulos de pigmentos hemossiderina dentro dos macrófagos dos cordões medulares e sinus. Todavia em outros estudos, congestão e presença de hemossiderina foram alterações encontradas em baixa frequência (LIMA *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2010). A diminuição dos valores séricos de ferro e o aumento da ferritina na LVC (LISTE-BURILLO *et al.*, 1994) poderia explicar a hemossiderose.

Quanto à avaliação histológica hepática dos animais avaliados 92,98% apresentaram algum tipo de infiltrado inflamatório no órgão, variando de discreto a

moderado e predominantemente de natureza histioplasmocítica. No fígado de animais com LVC geralmente é encontrado infiltrado mononuclear (plasmo-histio-linfocitário) nos espaços porta e no interior de lóbulos (granulomas intralobulares) (CHUNG *et al.*, 1940; BRENER, 1957; KEENAN *et al.*, 1984; GENARO,1993; TAFURI *et al.*, 1996; TAFURI *et al.*, 2001).

Em muitas partes do mundo, com algumas variações geográficas, doença hepática e diversas alterações histopatológicas associadas tem sido descritas na LVC e doença visceral humana (MELO *et al.*, 2008). Na leishmaniose, semelhante a outras doenças causadas por parasitas intracelulares, a resposta imunológica celular é primordial na determinação de recuperação ou resistência às doenças (KAYE *et al.*, 2004). Na LV os no fígado parece correlacionar com controle espontâneo e infecções de manutenção em um estado subclínico. No entanto, a eficácia antimicrobiana da resposta granulomatosa parece ser não totalmente eficaz, e depende de fatores determinantes do hospedeiro e dos agentes patogênicos (MURRAY, 2001).

A distribuição do infiltrado inflamatório periportal associado ou não à granuloma intralobular também foi uma achado importante na LVC em cães do DF. Dentre as principais alterações histopatológicas no fígado de animais infectados com LV, tem sido destacado o infiltrado portal e granulomas intralobular (LIMA *et al.*, 2004; SANTANA *et al.*, 2007). De acordo com Santana *et al.* (2007) há pouca informação sobre a associação entre aspectos clínicos, patogênicos e histopatológicos de granulomas hepáticos causados por *L. chagasi* em cães. Considera-se importante muitas formações de granulomas hepáticos intralobulares, com tamanho variável, constituído por macrófagos (parasitados ou não com amastigotas de *L. chagasi*), algumas células epitelioides, pequeno número de linfócitos, células plasmáticas e raros neutrófilos.

Cães assintomáticos apresentaram números mais altos de granulomas hepáticos que animais sintomáticos (LIMA *et al.*, 2004; SANTANA *et al.*, 2007). Rállis *et al.* (2005) também não observaram uma associação entre as lesões histopatológicas aos sinais clínicos de LVC ou a carga de amastigotas nos tecidos do fígado. Investigações futuras são necessárias para definir melhor a relação entre as lesões hepática granulomatosas e LVC.

Juntamente com infiltrado, foi possível visualizar formas amastigotas no fígado de 40,35% cães. Destes 65,22% eram sintomáticos e 34,78% assintomáticos. Provavelmente esta diferença observada entre os grupos clínicos seja decorrente da diferença do número de animais em cada grupo. Avaliando-se separadamente cada grupo observa-se que 38,46% dos animais sintomáticos e 44,44% dos assintomáticos apresentaram formas amastigotas no tecido hepático. Diferenças de parasitismo tecidual entre os grupos clínicos também não foi encontrado por Lima (2007).

Em 92,98% dos animais analisados foi visualizada degeneração hidrópica nos hepatócitos. Lima (2007) observou degeneração hepática em 100% dos casos estudados. Uma possível explicação para isso, seria a redução do fluxo sanguíneo para órgão, decorrente à compressão vascular causada pelo infiltrado inflamatório periportal (KUMMAR *et al.*, 2005)

A hiperplasia e hipertrofia de polpa branca também foi uma alteração esplênica frequente nos cães do DF. Corroborando com esta observação, a hiperplasia linfóide do órgão tende a ser mais intensa em cães sintomáticos (LIMA *et al.*, 2007). Todavia, Melo (2005) descreve que o baço apresenta hipotrofia da polpa branca, já Santana *et al.* (2008) observaram hiperplasia nos animais assintomáticos e hipotrofia nos animais sintomáticos. Segundo estes autores, hiperplasia seguido de atrofia do folículo linfóide pode ocorrer no baço durante a LV. A dicotomia entre essas alterações esplênicas podem refletir diferentes estágios da doença, o que poderia interferir no padrão morfológico das respostas teciduais, assim como o *status* imunológico de cada indivíduo.

Formas amastigotas foram visualizadas no baço em 35,08% dos animais (70% sintomáticos e 30% assintomáticos). Agregados teciduais de macrófagos parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* foi previamente descrita em de animais com LVC assintomáticos e sintomáticos (LIMA *et al.*, 2007). Santana *et al.* (2008) observaram formas amastigotas apenas no grupo sintomático. Os parasitas foram visualizados na área subcapsular e na polpa vermelha esplênica. Em animais altamente infectados, os parasitas tendem a distribuir-se quase continuamente na polpa vermelha. Em animais com carga parasitária de menor intensidade, uma distribuição descontínua de células infectadas é observada predominando na região subcapsular.

A hemossiderose esplênica esteve presente na maioria dos animais. A hemossiderina é um pigmento derivado da hemoglobina, cuja coloração varia de amarelo-ouro ao marrom, granular ou cristalino. Em condições normais, pequenas quantidades de hemossiderina podem ser vistas nas células fagocitárias mononucleares da medula óssea, baço e fígado, que são órgãos envolvidos ativamente na degradação das hemácias. Quando em excesso pode ter varias associações como quando há uma diminuição na utilização do ferro (KUMAR *et al.*, 2005). É comum encontrar a presença deste pigmento (LIMA, 2007).

A congestão do baço esteve presente em aproximadamente metade dos animais avaliados. Lima *et al.* (2007) descreveram a congestão esplênica como um achado comum.

Periesplenite é um achado frequente na LV (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004). Neste estudo foi encontrada em apenas 12,28% animais, sendo que juntamente com o infiltrado mononuclear foram visualizadas amastigotas em 57,14% destes animais. De acordo com os resultados de Santana *et al.* (2008) periesplenite esteve presente em 28% dos casos, sendo mais frequente no grupo dos animais sintomáticos. O aumento no tamanho do órgão pode predispor ao estresse ou trauma mecânico da cápsula, mas a gênese real da perisplenite na leishmaniose permanece desconhecida. É interessante, porém, que a perisplenite com parasitas no interior de macrófagos na área subcapsular pode indicar disseminação do parasita na inflamação ou que este provoque uma reação inflamatória (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004; SANTANA *et al.*, 2008). No baço dos animais infectados a resposta imunológica não está claramente definida (SANCHEZ *et al.*, 2004).

Histiocitose esplênica foi observada em todos os animais que apresentaram as formas amastigotas da *Leishmania spp.* Em geral a histiocitose foi subcapsular, e muitas vezes organizada como granulomas. Apenas um animal apresentou histiocitose subcapsular sem formas amastigotas. Santana *et al.* (2008) descreveram que amastigotas foram mais frequentemente observadas no baço dos animais com granulomas. Estes granulomas parecem refletir uma inflamação crônica persistente em resposta à infecção descontrolada, ao invés de proteção contra a doença (LIMA, 2007). O fato de granulomas só estarem presentes nos animais com a cultura positiva do baço, apoia a ideia de que estes granulomas podem refletir um estado de

tentativa ineficiente de controle da infecção pela *Leishmania spp.* pelo sistema imune do hospedeiro (SANTANA *et al.*, 2008).

Existem associações entre alterações morfológicas no baço e emagrecimento, inicialmente referente a desorganização da estrutura de polpa branca. Santana *et al.* (2008) observaram que 70% dos animais com caquexia apresentaram algum grau de desorganização da polpa branca. Perda de definição de folículos linfoides, perisplenite, e uma alta densidade parasitária no baço também foram mais frequente em animais abaixo do peso.

Segundo Santana *et al.* (2008) o baço desempenha um papel importante na LVC, sendo acometido em todos os casos da doença. Em contraste com outros órgãos como o fígado, o baço mantém a infecção durante todo o curso da LVC. De fato, um índice de parasitismo esplênico é usado como critério clínico da resposta terapêutica na LV humana. Durante o curso de LVC, o baço torna-se um local evidente de interação entre o sistema imune e o parasita. No órgão, estão presentes todos os participantes obrigatórios na resposta imune contra o parasita, que incluem o antígeno (parasitas vivos ou seus fragmentos), células apresentadoras de antígenos e linfócitos capazes de responder a esses antígenos (ALENCAR, 1959).

A pele é o primeiro ponto de contato com organismos do gênero *Leishmania spp.* durante o processo de infecção. No curso da doença, a densidade parasitária tem sido associada com um padrão inflamatório granulomatoso em cães com LV (CALABRESE *et al.*, 2010). Foi observado infiltrado inflamatório na pele 71,11% dos animais avaliados no DF sendo de caráter histioplasmocítico em metade dos casos. O processo inflamatório cutâneo estava distribuído principalmente ao redor de anexos (folículo piloso e glândulas sebáceas e sudoríparas), difuso ou só em derme superficial ou só em derme profunda. Cães do estado do Mato Grosso do Sul mostraram infiltrado inflamatório dispersos na derme, o qual era composto por numerosos macrófagos vacuolizados parasitados e um pouco de linfócitos e plasmócitos (CALABRESE *et al.*, 2010). Lima *et al.* (2007) observaram exsudato localizado ao redor dos vasos e anexos da derme profunda e/ou difuso na derme superficial em cães com a doença.

Nos animais avaliados, quando o infiltrado foi discreto ou moderado a localização foi principalmente em derme superficial ou próximo dos anexos. Com a intensidade acentuada, 70% dos animais apresentaram distribuição difusa. Lima *et*

al. (2007) avaliaram semi-quantitativamente o infiltrado inflamatório na pele de cães com LVC. Foi observado exsudato celular difuso na derme superficial quando a inflamação era de intensidade discreta (+); exsudato celular difuso na derme superficial e em focos na derme profunda na forma moderada (++); e exsudato celular distribuído difusamente por todas as camadas da pele na forma mais intensa (+++).

Foram detectadas formas amastigotas na pele em 42,22% dos animais, sendo 78,95% sintomáticos e 21,05% assintomáticos. Calabrese *et al.* (2010) relataram que formas amastigotas foram frequentemente visualizadas livres no tecido conjuntivo dérmico. As lesões de pele são epidemiologicamente um fator clínico de grande importância, pois chamam a atenção e facilitam a identificação de animais doentes. Porém, cães assintomáticos apresentam um parasitismo não diferente de animais que apresentam essas lesões, tornando os cães assintomáticos potencialmente transmissores “ocultos” (LIMA *et al.*, 2007).

No Ceará, Deane & Deane (1955), em estudo comparativo entre a infecção humana e canina encontraram parasitos na pele de 16,3% dos indivíduos e em 77,6% dos cães naturalmente infectados. Além disso, verificou-se que a infecção experimental de flebotomíneos era mais freqüente e intensa quando os insetos se alimentavam em cães (75%) do que em pacientes humanos (28,5%). Essas observações, bem como outros trabalhos relacionados com a doença canina em áreas endêmicas de leishmaniose visceral humana (DEANE & DEANE, 1962; IVERSSON *et al.*, 1983; MARZOCHI, *et al.*, 1985), mostram o cão como a principal fonte de infecção para os flebotomíneos, quer seja pela alta prevalência da infecção canina nas regiões estudadas, quer seja pela presença do parasito na pele, o que favorece a infecção do inseto vetor e, conseqüentemente, a transmissão ao homem.

O alto parasitismo observado na pele de cães infectados mostra o papel do cão na disseminação da leishmaniose enfatizando o risco para saúde pública, especialmente porque estes animais dividem o mesmo habitat do homem (CALABRESE *et al.*, 2010). Por esta razão, a pele deve ser considerada como melhor local para análise parasitológica, sendo um indicador confiável da severidade da doença clínica na LVC. Cães sintomáticos mostraram um grande número de alterações cutâneas exemplificada por um intenso infiltrado inflamatório dermal

difuso, mudanças na matriz extracelular e carga parasitária extrema (GIUNCHETTI *et al.*, 2007).

O cão tem importante papel na transmissão da LV, suportado pela alta carga parasitária encontrada na pele de animais infectados (SANTOS *et al.*, 2010). Os parasitas depositados na pele do mamífero pelo flebótomo infectado, ultrapassam uma variedade de obstáculos, incluindo a matriz extracelular (MEC), as proteínas da camada basal para, em seguida, migrarem para outros órgãos ou estabelecer infecção dentro do fagolisossomo dos macrófagos (MELO, 2005).

Calabrese *et al.* (2010) descreveram um infiltrado inflamatório rico em mastócitos degranulados associados aos parasitas na pele dos cães de Campo Grande. Isto reforça a idéia que mastócitos participam da defesa no hospedeiro, modulando a resposta imunológica durante a invasão do patógeno. Tais células não foram observadas em nossos estudos.

É amplamente conhecida que a resposta imune cutânea no estágio inicial da infecção tem papel determinante para o curso da doença. Dentro de poucas horas após a inoculação do parasita, ocorre uma massiva infiltração celular constituída predominantemente de macrófagos os quais entram em contato rapidamente com o parasita. Portanto, avaliar as alterações cutâneas, torna-se importante devido a sua influencia na transmissão da doença. Em cães susceptíveis a infecção localizada na pele segue a disseminação do parasita, através de histiócitos, para linfonodos, medula óssea, baço, fígado, rim, pulmões e trato gastrointestinal (MELO, 2005).

Estudos tem demonstrado que formas amastigotas na pele podem estar implicadas na degradação de componentes da matriz extracelular da pele (ALVES *et al.*, 2010). O tecido conjuntivo e as membranas basais são as principais barreiras envolvidas na invasão, disseminação e nutrição de parasitas. A secreção de enzimas proteolíticas pelo parasita e de fundamental importância na interação entre este e o hospedeiro. Esta interação inclui invasão e destruição do tecido do hospedeiro e a habilidade do parasita em migrar para o local específico e ou estabelecer condições nutricionais que favoreçam o seu desenvolvimento (MELO, 2005).

Dos animais avaliado no DF com LVC, mais de 60% apresentaram lesões glomerulares distribuidas em glomerulonefrite membranoproliferativa (52,63%),

glomerulonefrite membranosa (26,31%) glomeruloesclerose segmentar focal (13,15%) e glomerulonefrite proliferativa mesangial (7,89%). Zatelli *et al.* (2003) observou 29,3% dos animais com glomerulonefrite membranoproliferativa, 26,8% com glomerulonefrite membranosa, 22% com glomeruloesclerose segmentar focal e 22% com glomerulonefrite proliferativa mesangial. Todavia, os resultados relatados por Costa *et al.* (2003) foram distintos, com 32,7% dos animais com glomerulonefrite proliferativa mesangial, 30,9% com glomerulonefrite membranoproliferativa, 18,2% com glomeruloesclerose segmentar focal e nenhum caso com glomerulonefrite membranosa. Há um consenso quanto à glomerulonefrite membranoproliferativa ser a nefropatia predominante na LVC, assim como observado no presente estudo. Os padrões proliferativos das glomerulonefrites não são restritos à LVC, sendo observado em outras doenças com antigenemia crônica, como a erliquiose, dirofilariose, entre outras (FORRESTER & LEES, 1995).

As glomerulonefrites são alterações comuns em cães portadores de LVC (BENDERITTER *et al.*, 1988; TAFURI *et al.*, 1989; POLI *et al.*, 1991; NIETO *et al.*, 1992; COSTA, 2001; COSTA *et al.*, 2003; ZATELLI *et al.*, 2003). A glomerulonefrite observada na LVC é causada principalmente pela deposição de imunocomplexos (TAFURI *et al.*, 1989), sendo os sinais clínicos apenas evidentes quando a lesão renal é grave. Em alguns casos a insuficiência renal é o único sintoma observado na doença, e nestes casos, a morte pode ocorrer em poucos dias (CIARAMELLA *et al.*, 1997).

Atualmente, a teoria mais aceita para a fisiopatologia das glomerulonefrites observadas na LV é a deposição de imunocomplexos circulantes no tecido renal, com conseqüente ativação do sistema complemento levando ao dano tecidual (SLAPPENDEL, 1988; TAFURI *et al.*, 1989; POLI *et al.*, 1991). LVC é considerada uma doença imunomediada devido a sua capacidade de modificar a resposta imune do hospedeiro, inibindo a ativação de células TCD4+ Th1 e ativando células TCD4+ Th2, que promovem a proliferação de células B e a conseqüente, a produção de grande quantidade de anticorpos específicos e não específicos contra antígenos de *Leishmania spp.* (PINELLI *et al.*, 1994; 1999). A hipergamaglobulinemia inespecífica pode ser responsável por vários fenômenos autoimunes, como a formação de imunocomplexos circulantes e de anticorpos antinucleares (SLAPPENDEL, 1988; MARTINEZ-MORENO *et al.*, 1995). A utilização de técnicas de imuno-histoquímica e

de investigação ultraestrutural demonstraram imunodepósitos localizados nos glomérulos, tanto no mesângio como na membrana basal glomerular, e também ao longo de membrana basal tubular em cães acometidos por LV (POLI *et al.*, 1991). Foi detectado imunodepósitos renais de IgG específicos contra antígenos de membrana da *Leishmania spp.* em todos os cães infectados com glomerulonefrite (MANCIANTI *et al.*, 1989).

Os diferentes padrões de glomerulonefrites são determinados, possivelmente, pelo tipo celular ou estrutura glomerular envolvida na resposta imune (BLANTZ *et al.* 1997; COUSER, 1998), pela localização do antígeno dentro do glomérulo (ABRASS, 1997) ou ainda pela localização do imunocomplexo (DAY, 1999). Na glomerulonefrite membranosa há a deposição de material eletrodense na porção subepitelial da membrana basal glomerular. Na glomerulonefrite membranoproliferativa a deposição ocorre na porção subendotelial e subepitelial da membrana basal glomerular bem como no mesângio, já na glomerulonefrite proliferativa mesangial é resultado da deposição de depósitos de imunocomplexos nas áreas esclerosadas do mesângio (DAY, 1999; GODOY, 2000).

Atualmente há evidências crescentes que a resposta imune celular também esteja envolvida na patogênese da glomerulonefrite imunomediada presente na LV (VAN ALDERWEGEN *et al.*, 1997). Células T CD4⁺ já foram detectadas tanto no glomérulo como no interstício renal de cães com a doença (COSTA *et al.*, 2000), sugerindo que a ativação dessas células possam levar a uma reação de hipersensibilidade tardia, reações citolíticas, expressão anormal de moléculas do complexo de histocompatibilidade ou a ativação de células B resultando em uma injúria local (VAN ALDERWEGEN *et al.*, 1997).

Formas amastigotas da *Leishmania* foram encontradas em apenas seis (9,83%) cães sintomáticos do DF sendo a grande maioria encontrada na pelve renal. No estudo de Soares *et al.* (2005) com 51 cães, em apenas um animal foi encontrada forma amastigota do parasita no rim. Este é considerado um achado pouco frequente na avaliação histopatológica de animais com a doença (BENDERITTER *et al.*, 1988; TAFURI *et al.*, 1989; POLI *et al.*, 1991; NIETO *et al.*, 1992; MOURA *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2003; ZATELLI *et al.*, 2003), sendo a presença direta da *Leishmania spp.* no local, não necessariamente associada ao insulto renal.

Dos 61 animais estudados, 73,77% apresentaram alteração inflamatória intersticial renal, variando de discreto a acentuado, com distribuição multifocal, de natureza principalmente linfoplasmocítica. A nefrite intersticial, caracterizada pelo infiltrado linfoplasmocitário, é um componente comum na nefropatia da LVC (CHUNG *et al.*, 1940; TAFURI *et al.*, 1989).

O mecanismo patogênico exato da nefrite intersticial na LV ainda é desconhecido, parecendo haver envolvimento tanto da resposta humoral (POLI *et al.*, 1991), quanto celular (FILLIT & ZABRISKIE, 1982; CARVALHO *et al.*, 2007). Depósitos de imunoglobulinas e de complemento na membrana basal tubular e no interstício renal suportam a hipótese de um mecanismo imunomediado humoral associado às lesões renais na LVC (POLI *et al.*, 1991). Entretanto, o infiltrado intersticial de células mononucleares, uma característica de reação mediada por células, também parece estar envolvida (FILLIT & ZABRISKIE, 1982). Independente do mecanismo envolvido, a reação é desencadeada pelos de antígenos de *Leishmania spp.* no parênquima renal (CARVALHO *et al.*, 2007).

As alterações tubulares mais frequentes foram representadas por degeneração hidrópica, cilindros hialinos intratubulares e mineralização tubular nos cães do DF com LVC. Alterações tubulares, caracterizadas por degeneração do tipo hidrópica ou vacuolar, atrofia, dilatação, necrose, cilindros hialinos, e calcificação medular também já haviam sido descritas em cães com a doença (TAFURI *et al.*, 1898; POLI *et al.*, 1991; SOARES *et al.*, 2005). A proteinúria é frequentemente observada e reflete o aumento da permeabilidade capilar glomerular às proteínas do plasma, especialmente a albumina (ALVES, 1999). A calcificação dos tecidos moles associada à uremia ocorre em numerosos locais e representa tanto calcificação distrófica como metastática. Os rins podem ter calcificação das membranas basais dos túbulos, da cápsula de Bowman e do epitélio tubular necrótico, especialmente na medular e no córtex interno (CONFER; PANCIERA, 1998).

Manifestação ocular é comum na leishmaniose canina (LEIVA *et al.*, 2005) e envolvem principalmente o segmento anterior dos olhos (CIAMARELLA *et al.*, 1997). Dos animais analisados, 58,33% apresentaram infiltrado inflamatório nos tecidos oculares sendo mais comumente de natureza histioplasmocítica, seguida da forma histiocítica. Pena *et al.* (2008) observaram três padrões inflamatórios linfoplasmocítico perivascular, linfoplasmocítico associado com macrófagos também

perivasculares e histiocítico difuso em cães com LV. O infiltrado linfoplasmocítico discreto, sem macrófagos ou amastigotas, não podem ser considerados como indicativo de leishmaniose ocular. Por isso, identificação do parasita por imunohistoquímica é muitas vezes necessário para um diagnóstico específico.

Quanto à distribuição, a grande maioria dos cães avaliados apresentou inflamação em conjuntiva bulbar. A conjuntiva é a estrutura ocular mais comumente acometida na leishmaniose canina (NARANJO *et al.*, 2005). Apenas um animal do DF apresentou infiltrado em córnea. Quando a córnea é afetada na enfermidade, os parasitas e o infiltrado inflamatório que o acompanham podem surgir a partir de uma propagação da conjuntiva (PENA *et al.*, 2008).

Formas amastigotas de *Leishmania spp.* foram visualizadas em apenas 14,28% dos animais com infiltrado inflamatório. Leiva *et al.* (2005) demonstraram a presença de inflamação granulomatosa localizada nas camadas fibrosa e vascular com um grande número de organismos intracelulares compatíveis com amastigotas do gênero *Leishmania spp.* Pena *et al.* (2008) encontraram *Leishmania spp.* em 30% dos cães com lesões oculares e relataram ainda que 88,9% dos animais com infiltrado granulomatoso apresentaram organismos de *Leishmania spp.* nos tecidos oculares. Todavia, Molleda *et al.* (1993) observaram parasitas em apenas 22,7% dos casos que evidenciaram inflamação. Estas discrepâncias poderiam refletir diferenças no estágio de evolução da doença, patogenicidade e seletividade de cepas do parasita, bem como outros fatores ainda não determinados. As alterações oftálmicas podem ser causadas pela presença direta do parasita levando a uma reação inflamatória ou por consequência de imunodepósitos nos vasos oculares causando uma reação de hipersensibilidade do tipo III (GARCÍA-ALONSO *et al.*, 1996). Uveítes estão mais relacionadas à deposição de imunocomplexos enquanto inflamações corneais e conjuntivais são comumente relacionadas ao parasito (PENA *et al.*, 2000). A ceratoconjuntivite seca pode ser justificada pela presença do parasito causando processo inflamatório ao redor dos ductos lacrimais, resultando na retenção e acúmulo das secreções indispensáveis a formação adequada do filme lacrimal (NARANJO *et al.*, 2005).

As principais alterações da LVC ocorrem em órgãos ricos em células pertencentes ao sistema fagócito mononuclear, tais como o fígado, baço, linfonodos,

medula óssea e trato gastrointestinal. No entanto, a disseminação do parasita também ocorre em outros órgãos que não pertencem a estes sistemas, por exemplo, o coração e pulmões (ALVES *et al.*, 2010).

Dos 59 animais analisados, aproximadamente metade deles apresentaram alterações inflamatória pulmonares, variando de discreta a acentuada. Infiltrado histiocítico e histioplasmocítico foram mais comumente observados. Dos cães analisados com alteração inflamatória, 44,82% apresentaram infiltrado inflamatório discreto. O grau da resposta inflamatória parece ser cuidadosamente regulado para manter a função fisiológica enquanto fornecendo rápida erradicação de microorganismos inalados. Parece que os macrófagos podem estar em um tipo de ativação basal. Este estado do macrófago induz uma rápida resposta aos patógenos, mas sem provocar uma resposta inflamatória severa. Este fato pode prevenir lesões nos pulmões, desde que estas células podem provocar danos aos tecidos (GONÇALVES *et al.*, 2003).

Quanto à distribuição do infiltrado pulmonar em cães com LVC no DF, foi visualizado em localização perivascular em 51,72% dos animais e em septo alveolar em 31,03%. Para Alves *et al.* (2010) lesões na maioria dos casos eram focais, em alguns casos foram difusas com espessamento dos septos interalveolar devido à congestão, infiltrado inflamatório e proliferação de células epiteliais e fibroblastos. Os resultados demonstraram o predomínio de infiltrado perivascular. O envolvimento do depósito de complexo imune no endotélio vascular ou gerando quimiotaxia no interstício estão envolvidos no estabelecimento de uma resposta inflamatória local principalmente provocando vasculite em muitos órgãos (GONÇALVES *et al.*, 2003).

O mecanismo pelo qual leishmaniose visceral determina alterações pulmonares é mal compreendido, particularmente nos casos de lesões persistentes onde o parasita não foi encontrado (ALVES *et al.*, 2010). Além disso, pneumonite intersticial é uma lesão assintomática e poucos estudos tem investigado a patogênese desta doença no cão (GONÇALVES *et al.*, 2003). Em cães, lesões pulmonares são muito similares aquelas observadas em humanos, e foi previamente caracterizada por alguns autores como pneumonite intersticial com espessamento da parede alveolar e exsudato celular crônico principalmente consistindo de macrófagos (TRYPHONAS *et al.*, 1977; DUARTE *et al.*, 1986; GONÇALVES *et al.*,

2003). No estudo de Duarte *et al.* (1986) realizado com 41 cães naturalmente infectados eles detectaram pneumonite intersticial em 81,5% dos animais.

A influencia do infiltrado inflamatório na pneumonite intersticial da leishmaniose visceral parece ser muito importante na patogênese das lesões. Mecanismos de defesa pulmonar são um pouco diferente do que em outros órgãos. O pulmão reage a constantes agressões e muitas vezes parece não desenvolver inflamação. Macrófagos pulmonares apresentam uma ação microbicida mesmo quando não ativados, e quando ativação ocorre eles são capazes de eliminar enormes quantidades de bactérias que entram no pulmão através das vias aéreas (ALVES *et al.*, 2010). Na LVC é muito comum encontrar alta carga parasitária nos tecidos do fígado, baço, linfonodos, medula óssea e pele. Entretanto, parasitas são difíceis de demonstrar no pulmão mesmo na doença em humanos (GONÇALVES *et al.*, 2003).

Congestão pulmonar foi visualizada em 98,30% dos animais e edema em 64,40% dos cães. A congestão da parede alveolar vem sendo descrita na doença (ALVES *et al.*, 2010). Um dos mecanismos para explicação do edema pulmonar seria o aumento da pressão hidrostática capilar, redução da pressão oncótica intravascular ou agressão aos capilares sozinhos ou em conjunto. Quando isso acontece, o líquido se acumula inicialmente nos septos interalveolares, e se a causa persiste, o líquido passa para os alvéolos (METZE, 2004).

Formas amastigotas do parasita foram visualizadas no pulmão de apenas 5,08% dos animais, sendo todos sintomáticos. Alves *et al.* (2010) não observaram formas amastigotas de *Leishmania spp* em pulmões de cães. Apesar da ausência do parasita no pulmão, acredita-se que a destruição do mesmo poderia ocorrer neste órgão com somente partículas residuais restantes (GONÇALVES *et al.*, 2003). Um estudo imunoenzimático com anticorpos específicos mostrou material antigênico e ou amastigotas de *Leishmania spp*. no septo alveolar onde ocorria pneumonia intersticial em cães com LVC (DUARTE *et al.*, 1986). Acredita-se que fibrose intensa geralmente observada pode ser devido ao estímulo contínuo provocado pelo parasita ou antígenos que chegam ao pulmão. A presença deles ativa macrófagos que então ativam a resposta inflamatória (GONÇALVES *et al.*, 2003).

É importante estar compreender as alterações nos órgãos causadas por LV, especialmente os órgãos que não pertencem ao sistema fagocítico mononuclear a fim de compreender o desenvolvimento da doença. Portanto o estudo das alterações do coração e pulmão na LVC é fundamental para o entendimento do problema em relação aos seres humanos. O cão serve como um excelente modelo para o estudo da LV em seres humanos, uma vez que a doença é causada pelo mesmo agente que causa alterações semelhantes. Por conseguinte, lesões em cães, pode ser considerado um parâmetro a ser usado para avaliar a doença em seres humanos (ALVES *et al.*, 2010).

Quanto à avaliação histológica do intestino dos animais do DF observou-se infiltrado inflamatório em 72,13% das amostras, sendo a grande maioria, constituído por eosinófilos. Um estudo microscópico revelou uma reação inflamatória crônica com parasitas ao longo do trato gastrintestinal. O exsudato celular incluiu macrófagos, linfócitos e plasmocitos com raros neutrófilos e eosinófilos. Provavelmente, os eosinófilos não estão associados com a leishmaniose, mas com parasitoses intestinais. Várias evidências mostram que os eosinófilos desempenham papel importante na defesa contra helmintos intestinais (PEREIRA, 2004). O infiltrado foi localizado em mucosa e submucosa, quando histiocítico localizado em placa de Peyer. Formações de célula gigante podem notar associado com o exsudato mononuclear. Muitos macrófagos na mucosa (lâmina propria), muscular da mucosa e camadas de submucosa revelaram uma morfologia peculiar. Eles tinham uma citoplasma abundante e pálido, com o nucleo menos denso que outras células e amastigotas em vacuolos intracelular (SILVA *et al.*, 2002).

Foi observado aumento da placa de Peyer em 14,75% dos animais. No intestino a hiperplasia linfoide das placas de Peyer, associada ou não ao parasitismo, pode ocorrer nos intestinos delgado, jejuno e íleo, grosso, ceco e cólon (BRENER, 1957; KEENAN *et al.*, 1984; TAFURI, 1995).

Diarreia, independentemente de ser proveniente do intestino delgado ou grosso, é incluído entre os sinais de LVC. A ocorrência de diarreia tem sido quase sempre associada à insuficiência renal ou hepática crônica que pode se desenvolver no curso da doença. Em alguns casos, diarreia do intestino delgado tem sido atribuída à infiltração da mucosa intestinal por células parasitadas. Colite crônica é

geralmente considerada uma apresentação clínica da LVC (ADAMAMA-MORAITOU *et al.*, 2007).

Silva (2002) encontrou maior parasitismo nas porções finais do intestino grosso (ceco e colon). Adamama-Moraitou *et al.* (2007) mostraram que o teste imuno-histoquímica era mais adequada para detectar parasitas no tecido que a coloração de hematoxilina e eosina (HE). A análise microscópica por coloração HE foi inadequada para detectar parasitas nos tecidos gastrointestinais (SILVA *et al.*, 2002). Imuno-histoquímica é mais sensível para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania spp.* Um pequeno número amastigotas intracelular ou extracelular eram facilmente reconhecíveis (ADAMAMA-MORAITOU *et al.*, 2007).

A leishmaniose visceral é conhecida por ser uma infecção oportunista. Em humanos os relatos de gastrite normalmente estão associados com pacientes HIV positivo devido da imunossupressão (WARICH-EITEL *et al.*, 2010). Dos 56 animais analisados apenas 17,85% apresentaram infiltrados inflamatórios em mucosa e submucosa gástrica, sendo principalmente linfocítico. A grande maioria apresentou infiltrado discreto e não foi visualizado infiltrado acentuado. Silva *et al.* (2002) descrevem no estômago, uma reação inflamatória discreta na mucosa (lâmina própria) na proximidade da camada submucosa. Mineralização foi visualizada em 10,71% casos. A calcificação metastática é aquela, na qual a precipitação dos sais em tecidos normais resulta de um estado de hipercalcemia (JONES *et al.*, 2000). Todos os animais que apresentaram mineralização em mucosa e submucosa gástrica apresentaram lesão de doença renal crônica. Insuficiência renal crônica provoca retenção de fosfatos, o que determina maior secreção de paratormônio no sentido de se equilibrar a relação cálcio/fósforo no sangue. Com isso, a mobilização excessiva de cálcio dos ossos, às vezes ultrapassa o limiar de solubilidade do cálcio e fósforo no plasma, favorecendo sua precipitação nos tecidos (PITTELLA & VASCONCELOS, 2004).

A principal alteração histopatológica observada no tecido nervoso dos animais com LVC no DF foi o infiltrado inflamatório nas meninges e perivascular no parênquima cerebral, variando de leve a moderada em intensidade. A grande maioria dos infiltrados foram linfohistiocítico, seguido por linfoplasmocítico. Não foram observadas quaisquer alterações degenerativas ou necróticas em todas as

regiões analisadas. Garcia-Alonso *et al.* (1996) observaram uma reação patológica esponjosa acompanhada por degeneração neuronal, mobilização das células gliais junto com acúmulo de depósitos de amiloide no encéfalo e cerebelo, associado com ruptura da barreira hematoencefálica em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Todavia manifestação neurológica isolada nunca foi relatada.

Até o presente momento poucos estudos descreveram as lesões histopatológicas do SNC em cães infectados pela *L. chagasi* (DIAS *et al.*, 2010). O exame histopatológico do sistema nervoso central de trabalhos anteriores evidenciou alterações inflamatórias e degenerativas, apesar da ausência de sinais neurológicos. Talvez, com a evolução da doença se os cães não tivessem sido eutanasiados, poderiam aparecer sintomas neurológicos. A reação por células linfocitárias é a mais frequente em enfermidades neurológicas, pois são as células da fase inflamatória subaguda e aparecem também como elementos dominantes no quadro citológico de processos crônicos (FEITOSA *et al.*, 2005).

Não foram detectadas formas amastigotas do parasita na histopatologia do SNC na população de cães analisada, assim como na no exame imuno-histoquímico. Resultado similar foi também observado no SNC de outros cães com a doença (IKEDA *et al.* 2007; MELO *et al.* 2009). No entanto há descrições do parasita (*L. infantum*) em áreas de meningite dentro e fora de macrófagos em cães (NIETO *et al.* 1996; VIÑUELAS *et al.* 2001).

Existem contradições na literatura quanto à patogênese da leishmaniose visceral no sistema nervoso central. Enquanto há relatos da observação de parasitas em todas as partes do corpo, exceto no sistema nervoso central, também foi descrita intensa deposição de antígenos de *Leishmania* e imunoglobulinas nos espaços intersticial e intravascular do plexo coroide de cães com leishmaniose visceral, levando a uma coroidite (MARCONDES *et al.*, 2006). Em virtude dessa controvérsia, e à complexidade da doença, especular sobre as causas que levam ou não a visualização do agente no SNC seria infrutífero.

Na análise estatística, através do Teste Exato de Fisher, foi demonstrado que a presença das amastigotas é maior ($p < 0,005$) em animais com baixo grau de inflamação. Na leishmaniose, semelhante a outras doenças causadas por parasitas intracelulares, a resposta imune celular é primordial na determinação de reparo ou

resistência às doenças (KAYE *et al.*, 2004). Todavia, a resposta imune não foi avaliada no presente trabalho. A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocitário mononuclear e sua presença determina uma supressão reversível e específica da imunidade mediada por células, o que permite a disseminação e multiplicação incontrolada do parasito (BRASIL, 2006). Portanto, onde a resposta é menor, há um aumento na carga parasitária, assim como fora demonstrado neste estudo. Alguns autores (PINELLI *et al.*, 1994; CABRAL *et al.*, 1998; LEANDRO *et al.*, 2001) verificaram que células mononucleares de sangue periférico de cães natural e experimentalmente infectados com amastigotas exibiram *in vitro* resposta proliferativa contra antígenos do parasita, demonstrando que pode haver uma resposta celular específica nos cães infectados com *Leishmania* (SILVA, 2007). Os parâmetros imunológicos mostram que em cães a resistência à infecção esta associada a baixos níveis de anticorpos específicos e desenvolvimento de imunidade celular, com a produção de IL-2, TNF α , e IFN- γ (PINELLI *et al.*, 1994). Suscetibilidade está correlacionada com altos níveis de anticorpos e ausência de resposta mediada por células. O grande número de parasitos observados nos órgãos linfáticos pode ser uma consequência das alterações imunológicas, permitindo a multiplicação e dispersão do parasito para outros sítios, incluindo estômago, intestino e pulmão (SILVA 2007).

A LV é uma ameaça à saúde pública no Brasil, considerando as altas taxas de letalidade e o aumentando na dispersão geográfica aos grandes conglomerados urbanos ao longo dos últimos 25 anos (CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2010). Normalmente os casos de leishmaniose canina precedem os casos humanos, já que os cães são os principais reservatórios domésticos e fundamentais na manutenção do ciclo da doença (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997). Ocorrência de leishmaniose visceral canina serve para alertar os clínicos da importância dessa doença, a qual vem emergindo (KRAUSPENHAR *et al.*, 2007).

Frente à situação da LVC no DF, estudos que descrevam as alterações morfológicas teciduais podem contribuir para compreender melhor a ampla gama de manifestações que a doença possa abranger. Sabendo da importância do cão na epidemiologia da enfermidade, deve-se conhecer a extensão e a progressão das lesões em diferentes órgãos. O diagnóstico da LVC deve ser feito de forma precisa com objetivo de se ter vigilância epidemiológica eficaz para o controle da

disseminação da doença. Além disso, pode se deduzir que o estudo das lesões na LVC é fundamental para o entendimento do problema em relação aos seres humanos, devido à similaridade observada da doença. O cão serve como um excelente modelo para o estudo da LV em seres humanos, uma vez que a doença é causada pelo mesmo agente que desvenda alterações semelhantes.

5. CONCLUSÃO

- As alterações clínicas mais frequentes em cães com LV no DF foram linfadenopatia, lesões alopécicas, hepatoesplenomegalia, palidez das mucosas e redução do escore corporal.
- Na zona cortical do linfonodo atrofia e hiperplasia/hipertrofia dos folículos linfoides foram alterações visualizadas, independente do quadro clínico do animal. Histiocitose foi melhor encontrada nos seios medulares e plasmocitose nos cordões medulares dos linfonodos.
- No fígado a alteração característica foi infiltrado periportal associado ao granuloma intralobular.
- Na pele quando infiltrado inflamatório é discreto a distribuição é principalmente em derme superficial, quando moderada fica próximo dos anexos e quando acentuada fica difuso.
- O infiltrado histioplasmocítico foi o tipo mais encontrado no linfonodo, fígado, pele, olho e pulmão de animais com LVC no DF.
- Glomerulonefrite membranoproliferativa foi à alteração glomerular mais frequentemente encontrada.
- No bulbo ocular a lesão inflamatória comumente encontrada foi na conjuntiva bulbar.
- Amastigotas foram visualizadas em animais sintomáticos e animais assintomáticos no linfonodo, fígado, baço, pele, olhos. A presença das amastigotas foi maior em animais com baixo grau de inflamação.

6. REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P., L. Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. **Acta Médica Portuguesa**, v.11, p.871-875, 1998.

ABRASS, C. K. Mechanisms of immune complex formation and deposition in renal structures. In: NIELSON, E. G., COUSER, W. G. **Immunologic renal diseases**. 1ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997. p. 291-307.

ADAMAMA-MORAITOU K. K.; RALLIS, T.; KOYTINAS, A.; 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

AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D. V. V.; COSTA, R. L. G.; JULIÃO, F. S.; SANTOS, W. L. C.; BARROUIN-MELO, S. M. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, p. 283-294, 2007.

ALBUQUERQUE, A. L.; ARAGÃO, F. R.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, Y. M.; LIRA, R. A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L. C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, v. 71, p. 78-84, 2007.

ALENCAR, J. E. Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia no Brasil. Imprensa Oficial Ceará. 1959. 342 p. Tese (Doutorado)

ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral

leishmaniasis in northeast brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 227-232, 2005.

ALVES, M. A. R. Glomerulonefrite crescêntica. In: SOARES, V., ALVES, M. A. R., BARROS, R. T. **Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento**. 1 ed. São Paulo: Sarvier. 1999. p. 118-127.

ALVES, G. B. B.; PINHO, F. A.; SILVA, S. M. M. S.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, F. A. L. Alterações cardíacas e pulmonares em cães sintomáticos e assintomáticos infectados naturalmente com *Leishmania (leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n.3, p. 310-315, 2010.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUEZ, F.; TESOURO, M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v. 18, p. 147-156, 2003.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANJEIRA, D. F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P. H. P.; DOS SANTOS, W. L. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between Splenic and Lymph Node Aspirations as Sampling Methods for the Parasitological Detection of *Leishmania chagasi* Infection in Dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n.2, 195-197, p. 195-197, 2004.

BENDERITTER, T.; CASANOVA, P.; NASHKIDACHVILI, L.; QUILICI, M. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.82, n.4, p.335-341, 1988.

BLANTZ, R. C.; WILSON, C. B.; GABBAI, F. B. Pathophysiology of acute immune injury. In: NIELSON, E. G., COUSER, W. G. **Immunologic renal diseases**. 1 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997. p. 237-250.

BORASCHI, C. S. S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 44-48, 2007.

BRASIL. Ministério Da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Editora MS : Brasília –DF, 122p. 2006.

BRENER, Z. Calazar canino em Minas Gerais. 1957. 90 p. Belo Horizonte Faculdade de Medicina, UFMG, Dissertação (Doutorado).

CABRAL, M.; GRADY, J.E.O.; GOMES, S.; SOUZA, J.C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 173-180, 1998.

CALABRESE, K.S.; CORTADA, V.M.C.L.; DORVAL, M.E.C.; LIMA, M.A.A.; OSHIRO, E. T.; SOUZA, C.S.F.; SIVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L. O.P.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; ABREU-SILVA, A. L. Leishmania (Leishmania) Infantum/Chagasi: Histopathological Aspects Of The Skin In Naturally Infected Dogs In Two Endemic Areas. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 253-257, 2010.

CARRANZA-TAMAYO, C. O.; CARVALHO, M. S. L.; BREDT, A.; BOFIL, M. I. R.; RODRIGUES, R. M. R.; SILVA, A. D.; CORTEX, M. F. C.; ROMERO, G. A. S. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** . v. 43, n. 4, p. 396-399, 2010 .

CARVALHO, A. A.; MACÊDO, E. L.; VERÇOSA, B. L.; SILVA, S. M. M.; CARVALHO, S. M., COSTA, F. A. L. Caracterização histopatológica e imunoistoquímica da nefropatia da leishmaniose visceral experimental em hamster. **Revista Clínica Veterinária**, v. 71, p. 60-64, 2007.

CHUNG, H. L.; HOEPPLI, R.; FENG, L. C. Histopathological observations in twelve cases of canine leishmaniasis in Peiping. **Chinese Medical Journal**, v. 3, p. 212-223, 1940.

CHURG, J.; BERNSTEIN, J.; GLASSOCK, R.J. **Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Disease**. 2ed. New York:Igaku-Shoin, 1985, 541p.

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

CONFER, A. W.; PANCIERA, R. J. In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. Sistema Urinário. 2 ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998, p. 231.

COSTA, F. A.L.; GUERRA, J. L.; SILVA, S. M. M. S.; KLEIN, R. P.; MENDONÇA, I. L.; GOTO, H. CD4+ T cells participate in the nephropaty of canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1455-1458, 2000.

COSTA, F. A. L. Patologia e imunopatogenia da nefropatia da leishmaniose visceral canina. São Paulo: USP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2001. 129 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).

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, p. 677-684, 2003.

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, S. M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune-response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 636-643, 2007.

COUSER, W. G. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 13, suplemento 1, p. 10-15, 1998.

CRMV - DF - Conselho Regional de Medicina Veterinária do Distrito Federal, 2006. *Circular nº 014/2006*.

DAY, M. J. Immune-mediated renal and reproductive disease. In: DAY, M. J. **Clinical immunology of the dog and cat**. 1ed. Iowa: Iowa State University Press. 1999. p. 171-180.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose Visceral urbana (no homem e no cão) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, v. 7, p. 75-87, 1955.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral Leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 49-212, 1962

DEDET, J. P. Les leishmanioses en Afrique du Nord. **Bulletin de l'institut Pasteur**, v.77, p.49-82, 1979.

DE LUNA, R.; FERRANTE, M.; SEVERINO, L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; GRADONI, L.; LUCISANO, A.; PERSECHINO, A. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis associated anemia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, p. 213-216, 2000.

DENEROLLE, P. Leishmaniose canina: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). **Pratique Médicale et Chirurgicale de L'Animal de Compagnie**, v. 31, p.137-145, 1996.

DIAS M.L.; CASTRO, M. B.; BARROS, R. M. Estudo histopatológico do sistema nervoso central de animais com Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal.

Jornada Nacional de Iniciação Científica – 62ª Reunião Annual da SBPC. Natal RN, 2010.

DIBARTOLA, S. P. Renal amyloidosis. In: OSBORNE, C. A., FINCO, D. R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. 1 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, p.400-415.

DONATIEN, A.; LESTQUARD , F. Notes sur la leishmaniose viscerale canine. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, v.28, p.426-431, 1935.

DUARTE, M. I. S.; SILVA, M. R.; GOTO, H.; NICODEMO, E. L.; AMATO NETO, V. Interstitial nephritis in human Kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 531-537, 1986.

DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (Calazar). In: FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.1215-1227.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 28, p. 36-44, 2000.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; BONELLO, F. L.; CIARLINI, P. C.; GONÇALVES, M. E.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V. Avaliação líquórica de cães, com e sem sintomatologia neurológica, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. **Veterinária Notícias, Uberlândia**, v. 11, n. 2, p. 61-69, 2005.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: NA UPDATE. **Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum**, Barcelona, 1999. p. 6-10.

FILLIT, H. M.; ZABRISKIE, J. B. Cellular immunity in glomerulonephritis. **The American Journal of Patology**, v. 109, n. 2, p. 227-243, 1982.

FORRESTER, S. D.; LEES, G. E. Renal manifestations of polysystemic diseases. In: OSBORNE, C. A., FINCO, D. R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. 1 ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1995. p.491-504.

GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D.; SERRANO, F. J.; ALONSO, C.; NIETO, C. G. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 18, n. 12, p.617-623, 1996.

GENARO, O. Leishmaniose Visceral canina experimental. 1993. 202 p. Belo Horizonte, UFMG). Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas. Dissertação (Doutorado em Parasitologia)

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; CORREA-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. 121, n. 1, p. 23-33, 2007.

GODOY, P. Sistema Urinário. In: FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 421-480.

GONÇALVES, R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; RASO, R.; TAFURI, W. L. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.45, n.3, p.153-8, 2003.

HOMMEL, M. The genus *Leishmania*: Biology of the parasite and clinical aspects. **Bulletin de L'Institute Pasteur**. v.75, n.5, p.5-102, 1978.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 34-32, 2007.

JONES, T.; HUNT, R.; KING, N. Depósitos minerais e pigmentos. **Patologia Veterinária**. 6 ed. São Paulo:Manole, 2000, p. 68.

KAYE, P.M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C.R.. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**. v. 201, p. 239–253, 2004.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H. K.; HELMERHORST, F.M. Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog. I Infection, clinical disease and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 74-79, 1984.

KONDO, K. R. J. Análise Histomorfométrica da matriz extracelular do linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. 2008. p 51. Minas Gerais Universidade Federal de Viçosa. Dissertação (Mestrado)

KOUTINAS, A. F.; SCOTT, D. W.; KONTOS, V., LEKKAS, S. Skin lesions in canine leishmaniasis (kala-azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. **Veterinary Dermatology**, v. 3, n. 3, p. 121-130, 1993.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHE M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, p.376-383, 1999.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil **Ciência Rural**, Santa Maria v. 7, n. 3, p. 907-910, 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO. Adaptação, dano e morte celular. In: Robbins & Cotran. **Patologia -Bases patológicas das doenças**. 7 ed. Saunders Elsevier, 2005, p. 41.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.;CAMPINO, L.; ROMAO, P.; CORTES, S.; ROLAO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; CAPELA, M.J.R.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibodies response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 79, p. 273-284, 2001.

LEIVA, M.; LLORET, A.; PENA, T.; ROURA, X. Therapy Of Ocular And Visceral Leishmaniasis In Cat. **Veterinary Ophthalmology**. v. 8, n. 1, p. 71-75, 2005.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-Leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 36, p. 485–489. 2003

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

LIMA, W. G. Leishmaniose Visceral Canina: estudo quantitativo e comparativo da expressão do receptor do complemento do tipo 3 (cr3 – cd11b/cd18) com alguns aspectos histológicos e parasitológicos do baço, fígado e linfonodos de cães naturalmente infectados com *leishmania (leishmania) chagasi*. 2007. p 111. Belo Horizonte. UFMG. Tese (Doutorado em Patologia Geral)

LISTE- BURILLO, F.; PÉREZ, F. M. G.; LIESA, J. P.; FABIÀN M. C. A. Iron status and anemia in canine leishmaniasis. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 3, p. 171-176, 1994.

MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 50-58, 2007.

MALLA, N.; MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis – some recent concepts. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 267-274, 2006.

MACIANTI, F.; FALCONE, M. L.; GIANNELI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 13-21, 1995.

MARCONDES, J. S.; FEITOSA, F. L. F.; IKEDA-GARCIA, F. A.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; FEITOSA, M. M. Avaliação do proteinograma sérico de cães com e sem sintomas neurológicos, naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v. 13, n. 1, p. 20-24, 2006.

MARTINEZ-MORENO, A.; MARTINEZ-CRUZ, M. S. BLANCO, A. HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.51, n.1-2, p.49-59. 1993.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F. J.; ACOSTA, I., HERNÁNDEZ, S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 209-220, 1995.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; TOLEDO, L. M.; JUNIOR, G. G.; MOMEN, H.; PACHECO, R. S.; SABROZI, P.C.; SOUZA, M.A.; JUNIOR, F. B. R.; TRAMONTANO, N. C. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349-357, 1985.

MELO F. A. Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados. 2005. p. 93. Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa. Dissertação (Mestrado).

MELO, F.; AMARAL, M.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.; ANDRADE, M.; MICHALICK, M.; RASO, R.; TAFURI, W.; 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.

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R.O.; MACHADO, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 162, p. 248-256, 2009.

METZE, K. Distúrbios da circulação. In: FILHO, G. B. **Bogliolo – Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 97.

MOLLEDA, J. M.; NOVALES, M.; GINEL, P. J.; FERNANDEZ, A. AND LOPEZ, R. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. **Israel Journal of Veterinary Medicine**. n. 48, p. 173 -178, 1993.

MOREIRA, P. R. R.; VIEIRA, L. M.; ANDRADE, M. M. C.; BANDARRA, M. B. MACHADO, G. F.; MUNARI, D. P.; VASCONCELOS, R. O. Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. v. 107, n. 3, p. 605-613, 2010.

MOTTA, V. T. **Bioestatística**. 2 ed. Educ, 2006, p. 190.

MOURA, R. O. D.; PAULA, V. V.; SOARRES, M. J. V.; SILVA, S. M. M. S. Alterações renais em cães (*Canis familiaris*) soropositivos para leishmaniose: aspectos clínicos, laboratoriais e hisopatológicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 61-64, 2002.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v.82, n.5 , p.249-67, 2001.

NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; PENA, T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 133, p. 37-47, 2005.

NATAMI, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; BOUDOUMA, M.; GUESSOUSS-IDRRISSI, N.; RHALEM, A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. **Veterinary Research**. v.31, n.3, p.355-63, 2000.

NETO, R. T.; RODRIGUES, M. M. P.; AMORIM, R. L.; CONCEIÇÃO, L. G.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FRANCO, S. R. V. S. Histopathological pattern of exfoliative and ulcerative skin lesions in dogs with leishmaniasis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 667-676, 2008.

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

NIETO, C.G.; VIÑUELAS, J.; BLANCO, A.; GARCIA-ALONSO, M.; VERDUGO, S.G.; NAVARRETE, I., Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Veterinary Record Journal**. n. 139, p. 346–347, 1996.

NOGUEIRA J. L.; SILVA, M. V. M.; PASSOS, C. C.; AMBRÓSIO, C. E. A Importância Da Leishmaniose Visceral Canina Para A Saúde Pública: Uma Zoonose Reemergente **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária** Ano VII, n. 13, p. 12, 2009.

NOLI, N. Canine Leishmaniasis. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M.; VLEMMAST, J.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*L. infantum*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, n. 3-4, p. 227-237, 2005.

PENA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, p. 35-41, 2000.

PENA, M. T.; NARANJO, C; KLAUSS, G.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURAY, X.; DAVIDSONZ, M. G; DUBIELZIGY, R.R. Histopathological Features of Ocular Leishmaniosis in the Dog . **Journal of Comparative Pathology**. v.138, p. 32-39, 2008.

PEREIRA, F. E. L. Degenerações. Morte Celular. Alterações no interstício. In: FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 38-69.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRIC, R.; WAGENAR, 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.

PINELLI, E.; RUTTEN, P. M. G. V.; RUITENBERG, E. J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: NA UPDATE. **Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum**, Barcelona, 1999. p. 60-64.

PITTELLA & VASCONCELOS. In: Bogliolo – Patologia Geral. 3 ed. Cap. 5 Pigmentações e calcificações. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 94, 2004.

POLI, A.; ABRAMO, F.; MANCIANTI, F.; NIGRO, M.; PIERI, S.; BIONDA, A.B. Renal Involvement in canine leishmaniasis. **Nephron**, v. 57, p. 444-452, 1991.

PONTES De CARVALHO, L.; BARADO, R.; CARVALHO, E. M. Nature and incidence of erythrocyte-bound IgG and some aspects of the physiopathogenesis of anemia in american visceral leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 64, p. 495-502, 1986.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.713-732.

PUMAROLA, M.; BREVIK, L.; BADIOLA, J. J.; VARGAS, A.; DOMINGO, M., FERRER, L. Canine Leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v.105, p.279-286, 1991.

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. **Journal of Comparative Pathology**, v.132, p.145-152, 2005.

RIDLEY, D. S.; RIDLEY, M. J. The evolution of the lesion in cutaneous *leishmaniasis*. **Journal of Pathology**, v.141, p.83-96, 1983.

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*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, n.6, p.618-24, 2004.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H; GRIFFIN, C. E. Viral, rickettsial and protozoal skin diseases. In: **Muller & Kirk's, Small Animal Dermatology**. 6ed. Philadelphia: Saunders, 2001, p.517-542.

SANTANA, J. A. P.; LIMA, W. G.; OLIVEIRA, M. R.; SIMÕES, L. A.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. G. 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.; 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 , p. 515–524, 2008.

SANTA ROSA, I.C.A. & OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica veterinária**, ano II, n.11, p.24-28, 1997.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R. L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA. R. C. A.; BRITO, F. L. C.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. R.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalence of anti-*leishmania spp* antibodies in dogs from garanhuns, in the middle scrub zone (agreste) of pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 1, p. 41-45, 2010.

SILVA, F.L .; TAFURI , W.L .; OLIVEIRA, M.R.; TAFURI , W. G. L. Histopatologia e imunoistoquímica trato gastrintestinal em cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) chagasi* . *Relato de caso*, **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia**, v. 54, n.4, 2002.

SILVA, F. S. Patologia e Patogênese da Leishmaniose Visceral Canina. **Revista Tropica – Ciências Agrarias e Biologicas**. v.1, n. 1, p. 20, 2007.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniosis. A review based on 95 cases in Netherlands. **Veterinary Quartely**, v. 10, p. 1-16, 1988.

SOARES, M. J. V.; MORAES, J. R. E.; BORGES, V. P.; MIYAZATO, L. G., MORAES, F. R. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n.4, p. 579-593, 2005.

TAFURI, W. L.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; GENARO, O.; LEITE, V. H. R.; BARBOSA, A. J. A.; BAMBIRRA, E. A.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MAYRINK, W. Estudo, ao microscópio óptico e eletrônico, do rim de cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 3, p. 139-145, 1989.

TAFURI, W. L. Leishmaniose visceral em cães natural e experimentalmente infectados: histopatologia e estudo imunocitoquímico dos receptores do tipo 3 (CR3 - CD11b/CD18) e 4 (CD11c/CD18) do complemento e dos antígenos de histocompatibilidade da classe II no fígado e órgãos linfóides. 1995. p. 207 Belo Horizonte. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação (Doutorado).

TAFURI, W. L.; BARBOSA, A. J. MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C. MAYRINK, W. NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p.81-89, 1996.

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R., MELO, M. N. TAFURI, W. L. 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.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**. v. 292, p. 17-23, 2004.

TRYPHONAS, L.; ZAWIDZKA, Z.; BERNARD, M. A.; JANZEN, E. A.. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v.41, p.1-2, 1977.

VAN ALDERWEGEN, I. E.; BRUJIN, J. A.; HEER, E. T cells subsets in immunologically mediated glomerulonephritis. **Histology and Histopathology**, v. 12, p. 241-250, 1997.

VIÑUELAS, J.; ALONSO, M.G.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRÓN, C.; CARCCELÉN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. Meningeal leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 101, p. 23-27, 2001.

WARICH-EITEL, S.; RAUTHE, S.; ECK, M. Gastrale Leishmaniose. Ein seltener Gastritistyp. **Springer-Verlag**. v. 31, p. 205-207, 2010.

XAVIER, S. C.; CHIARELLI, I. M., *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.12, n.3, p.994-1000, 2006.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1999, p. 663

ZARAGOZA, C.; BARRERA,R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; DURÁN, E.; GONZÁLEZ, M.; MAÑÉ, M. C. SDS-PAGE and western blot urinary proteins in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 137-151, 2003.

ZATELLI, A.; BORGARELLI, M.; SANTILLI, R.; BONFANTI, U.; NIGRISOLI, E.; ZANATTA, R.; TARDUCCI, A.; GUARRACI, A. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n.5, p.558-561, 2003.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a Leishmaniose constitui um grave problema de saúde pública e representa um desafio para os profissionais da saúde. Os ciclos urbanos tem sido responsáveis pela expansão nos estados das regiões Centro-oeste e Sudeste. Fatores relacionados ao processo migratório, à ocupação desordenada das periferias das grandes cidades, à presença significativa do reservatório e do vetor e as altas densidades populacionais com baixa ou nenhuma imunidade à infecção contribuem para a rápida e extensa distribuição das leishmanioses. No Distrito Federal, a LV passou a constituir um grave problema de Saúde Pública desde 2005.

O cão serve como um excelente modelo para o estudo da LV em seres humanos, uma vez que a doença é causada pelo mesmo agente e com alterações semelhantes.

A maior preocupação e gravidade encontram-se na possibilidade de cães assintomáticos servirem de reservatório da doença, pondo em risco indivíduos que estão ao seu redor. O encontro de formas amastigotas de *Leishmania* nos órgãos de

animais assintomáticos, incluindo pele, mostrou a importância destes animais na epidemiologia da doença.

A inexistência de tratamento efetivo para a cura total da doença canina, e a polêmica sobre a eliminação indiscriminada de cães infectados, torna-se urgente à adoção de novas estratégias para o controle da enfermidade.

É inegável a importância de se obter um diagnóstico seguro quanto à positividade efetiva de cães em áreas endêmicas e não endêmicas de leishmaniose visceral.