












Análises anatomopatológica e imuno-histoquímica do baço e linfonodo de cães soropositivos para leishmaniose em testes sorológicos

Anatomopathological and immunohistochemical analyses of the spleen and lymph node of dogs seropositives for leishmaniasis in serological tests

Aline Oliveira de Magalhães¹ , Lucilândia Maria Bezerra¹ , Diego Pereira Araújo¹ , Bruna Siqueira Gomes de Lima¹ , Leandro do Padro Assunção¹ , Eduardo de Paula Nascente¹ , Ana Paula Iglesias Santin¹ , Rodrigo Caldas Menezes² , Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura^{*1} 

¹Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brasil.

²Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Correspondente: vdmoura@ufg.br

Resumo

A leishmaniose canina (CanL) é uma zoonose causada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum*. O baço e os linfonodos sofrem alterações morfológicas durante o CanL. Esta pesquisa teve como objetivo realizar um estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico desses órgãos em cães reativos para leishmaniose aos testes de Imunoensaio Cromatográfico "Dual Path Platform" (DPP®) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Vinte e sete cães foram avaliados ao exame anatomopatológico, com 92,6% exibindo alterações à avaliação macroscópica, especialmente esplenomegalia e linfadenomegalia. Todos os cães apresentaram alterações no baço não relacionadas à carga parasitária, sendo a esplenite granulomatosa a alteração mais grave. Hiperplasia cortical e paracortical difusa e hiperplasia e hipertrofia dos cordões medulares foram observadas nos linfonodos. Formas amastigotas de *Leishmania* spp. foram encontradas no baço e linfonodo às avaliações histopatológica e imuno-histoquímica, com boa concordância entre os métodos ($k = 0,55$, $p = 0,00124$), mas não foi observada diferença na intensidade parasitária entre esses órgãos à imuno-histoquímica ($p = 0,23$). Conclui-se que baço e linfonodo de cães reativos para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA apresentam alterações histomorfológicas decorrentes da doença, independente da carga parasitária, assim como esses órgãos apresentam carga parasitária semelhante ao método imuno-histoquímico.

Palavras-chave: amastigota; histopatologia; imunocoloração; *Leishmania* spp.; tecido linfoide

Abstract

Canine leishmaniasis (CanL) is a zoonosis caused by the

Recebido

11 de maio de 2021.

Aceito

04 de agosto de 2021.

Publicado

25 de agosto de 2021.

www.revistas.ufg.br/vet

Como citar - disponível no site,
na página do artigo.

protozoan of the species *Leishmania infantum*. The spleen and lymph nodes undergo morphological changes during CanL. This research aimed to perform an anatomopathological and immunohistochemical study of these organs in dogs reactive to leishmaniasis in the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP®) and Enzyme Immunoabsorption Assay (ELISA). Twenty-seven dogs were evaluated for anatomopathological examination with 92.6% showing changes at gross evaluation, specially splenomegaly and lymphadenomegaly. All dogs showed changes in the spleen unrelated to the parasitic load, with granulomatous splenitis being the most severe change. Diffuse cortical and paracortical hyperplasia, and hyperplasia and hypertrophy of the medullary cords were observed in the lymph node. Amastigote forms of *Leishmania* spp. were found in the spleen and lymph node at histopathological and immunohistochemical evaluations, with good agreement between these evaluations ($k = 0.55$, $p = 0.00124$), but no difference was observed in the parasitic intensity of these organs at immunohistochemistry ($p = 0.23$). It was concluded that spleen and lymph node from dogs reactive to leishmaniasis on the DPP® and ELISA tests show histomorphological changes resulting from the disease, independent to the parasitic load, as well as these organs show similar parasitic load at immunohistochemical test.

Keywords: amastigote; histopathology; immunostaining; *Leishmania* spp.; lymphoid tissue

Introdução

A leishmaniose canina (CanL) é uma doença sistêmica e zoonótica^(1,2). O parasito causador da doença é transmitido principalmente pela picada de flebotomíneos infectados, que no Brasil são representados pelas espécies *Lutzomyia longipalpis*⁽³⁾ e *Lutzomyia cruzi*⁽¹⁾, transmitindo o protozoário da espécie *Leishmania infantum*⁽⁴⁾. O cão (*Canis familiaris*) desempenha papel importante na manutenção da doença, pois atua como reservatório doméstico para a leishmaniose visceral (LV) em áreas urbanas^(1,4,5).

Esses protozoários são parasitos intracelulares que infectam células do sistema mononuclear fagocítico no hospedeiro vertebrado⁽⁶⁾, e se disseminam principalmente para os linfonodos, baço, medula óssea e fígado⁽⁷⁾. Os sinais clínicos da doença resultam da interação do parasito com o sistema imune do hospedeiro, e cães suscetíveis à infecção desenvolvem sintomatologia clínica devido à acentuada resposta imune celular e humoral contra o parasito^(8,9).

A CanL é uma doença progressiva, que causa reação inflamatória crônica, composta por macrófagos, plasmócitos e linfócitos^(10,11), com remodelação e reparo tecidual⁽¹¹⁾.

Cães acometidos comumente desenvolvem linfadenomegalia^(10,12), esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, e lesões cutâneas⁽¹²⁾. O baço e os linfonodos estão entre os órgãos mais afetados na CanL, pois participam de respostas imunes específicas^(13,14), sendo sítios onde ocorre apresentação de antígenos^(14,15).

O baço é um órgão linfoide que influencia diretamente o resultado da infecção⁽¹⁶⁾. A polpa branca é dividida em bainha linfática periarteriolar (BLPA), folículos linfoides nodulares (FLN) e zona marginal (ZM). Na BLPA predominam linfócitos T e nos FLN linfócitos B⁽¹⁷⁾. A estrutura do tecido linfoide esplênico permite a movimentação e a diferenciação de linfócitos envolvidos nas respostas imunes, e possibilita a localização ideal das células de memória para resposta a antígenos. Entre as alterações esplênicas na CanL estão atrofia folicular, redução das delimitações do tecido linfoide⁽¹⁸⁾, hiperplasia e hipertrofia celular, reação inflamatória granulomatosa, alta infestação parasitária e fibrose⁽¹⁴⁾.

Os linfonodos também são acometidos na CanL⁽¹⁴⁾ e a linfadenomegalia é um sinal clínico comum⁽¹¹⁾. De suas três porções, a região cortical possui folículos linfoides com predomínio de células B; a paracortical não possui folículos e é composta por linfócitos T; e a medular contém cordões medulares e linfócitos B. Ainda, todas as regiões podem apresentar células reticulares, raros plasmócitos e macrófagos⁽¹⁹⁾. Linfonodos de cães com CanL exibem hiperplasia e hipertrofia das regiões cortical e medular, inflamação granulomatosa^(7,20) e fibrose⁽²¹⁾.

Considerando a participação do baço e dos linfonodos na resposta imune da CanL, este estudo teve como objetivo realizar estudo histomorfológico e imuno-histoquímico do baço e linfonodo de cães reativos para leishmaniose aos testes Dual Path Platform (DPP®) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Material e Métodos

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG), Goiânia, GO, Brasil, sob protocolo número 061/19. Foram utilizados 27 cães reagentes para leishmaniose aos testes imunocromatográfico rápido Dual Path Platform (DDP® - Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), provenientes da rotina de vigilância epidemiológica para LVC realizada pela Diretoria de Vigilância em Zoonoses do Município de Goiânia (DVZ), GO, Brasil. Conforme recomendado pelo Ministério da Saúde, após positividade aos testes DPP® e ELISA e consentimento de seus respectivos tutores, os cães foram submetidos à eutanásia e encaminhados ao Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, (SPA/EVZ/UFG), Goiânia, GO, para exame anatomopatológico.

Para a tabulação dos dados epidemiológicos foram consideradas as variáveis sexo, idade e raça. Quanto a idade os animais foram classificados em jovens (até dois anos de idade), adultos (de três a sete anos de idade) ou idosos (acima de oito anos de idade) e, quanto à raça foram divididos em sem raça definida (SRD) e com raça definida (CRD), conforme informações cedidas pela DVZ. Variáveis relacionadas aos sinais clínicos de

CanL também foram consideradas na avaliação macroscópica, incluindo onicogribose, alopecia, descamação, úlcera oral, úlcera nasal^(22,23) e escore corporal (escala de 1 a 5 pontos: 1- caquético, costelas visíveis, sem cobertura de gordura, apresentando proeminências ósseas palpáveis, evidente recuo abdominal com perda de massa muscular; 2 - baixo escore corporal, animais magros, costelas facilmente palpáveis com cobertura mínima de gordura, proeminências ósseas facilmente palpáveis, recuo abdominal visível na região do flanco e gordura abdominal mínima; 3 - corpo médio, escore ideal, costelas palpáveis com pequena camada de gordura, recuo abdominal bem proporcionado e camada mínima de gordura abdominal; 4 - excesso de peso, costelas difíceis de serem palpadas com moderada cobertura de gordura, recuo abdominal mínimo ou ausente, abdômen arredondado com moderada cobertura de gordura, 5- obesidade, difícil palpação de costelas, acentuados depósitos de gordura, abdômen distendido com depósitos de gordura exagerados e depósitos de gordura na região lombar, face e membros⁽²⁴⁾. De acordo com as lesões externas e internas na avaliação macroscópica, os cães foram classificados como assintomáticos ou sintomáticos⁽¹⁷⁾.

Alterações relacionadas à esplenomegalia e linfadenomegalia (regional ou generalizada) também foram avaliadas no exame necroscópico. Avaliações histomorfológica e imunohistoquímica foram realizadas nas amostras de baço e linfonodo axilar fixadas em formalina tamponada neutra a 10% por 48 horas⁽²²⁾ e, sequencialmente, mantidas em álcool 70% até o processamento histológico e inclusão em parafina.

Avaliação histopatológica

Dos blocos parafinados contendo amostras de baço e linfonodo foram confeccionados cortes histológicos à espessura de 5 µm, os quais distendidos sobre lâminas histológicas e corados por hematoxilina e eosina (HE)⁽²²⁾.

No baço foram consideradas a organização estrutural do tecido linfoide e a formação de granuloma, conforme adaptado de Silva et al.⁽²⁵⁾. Para isso, atribuíram-se os escores zero (0 - organizado), com folículos linfoides apresentando todas as regiões estruturais desenvolvidas e delineadas, incluindo bainha linfocitária periarteríolar distinta, centro germinativo, zona do manto e zona marginal; um (1 - ligeiramente desorganizado), quando havia folículos linfoides com redução na definição de uma região ou discreta desorganização de qualquer estrutura do nódulo linfático, e discreta hiperplasia ou rarefação da polpa branca; dois (2 - moderadamente desorganizado), com polpa branca evidente, porém, com regiões pobremente definidas ou indistintas, e moderada hiperplasia linfoide; três (3 - acentuadamente desorganizado), tecido linfoide indistinto ou pouco diferenciado da polpa vermelha, com fibroplasia e acentuada hiperplasia folicular; e quatro (4 - granulomas bem definidos), em amostras com o tecido linfoide acentuadamente desorganizado, com limites estabelecidos pela proliferação de fibrose e células epitelioides.

As amostras esplênicas classificadas com escores três e quatro foram submetidas à coloração de Tricrômico de Masson, visando identificar e delimitar a formação da fibrose no parênquima esplênico. Também no baço foram consideradas as variáveis espessura da cápsula esplênica, periesplenite de acordo com o tipo do infiltrado inflamatório, hemossiderose, hematopoiese extramedular e macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* spp.

Na avaliação do linfonodo foram adotados os critérios adaptados de Toplu and Aydo-

gan⁽²⁶⁾, sendo consideradas as variáveis hiperplasia difusa cortical e paracortical; hiperplasia folicular com centro germinativo reativo em região cortical; hiperplasia e hipertrofia de macrófagos em seios subcapsulares e medulares; hiperplasia e hipertrofia dos cordões medulares; espessamento capsular; tipo de infiltrado inflamatório capsular; presença ou ausência de macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania* spp.; e edema em cordões e seios.

Avaliação imuno-histoquímica (IHQ)

Para a análise imuno-histoquímica, cortes histológicos de 4 µm foram dispostos em lâminas histológicas silanizadas (StarFrost®) e submetidos a desparafinização em xilol e reidratação em concentrações decrescentes de etanol. A recuperação antigênica foi realizada em tampão de citrato de sódio, pH 6,0, a 95 °C, por 30 minutos, em banho-maria. A peroxidase endógena foi bloqueada por imersão das secções em peróxido de hidrogênio a 30% e água destilada na proporção de 1:10, por 10 minutos. Para bloqueio de ligações inespecíficas às proteínas, as secções foram incubadas em reagente *background block* (Cell Marque, Rocklin, CA), por 12 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados por 18 h, em temperatura entre 2-8 °C, com anticorpo policlonal anti-*Leishmania*, diluído à concentração de 1:1000 em diluente de anticorpo (Diamond; Cell Marque, Rocklin, CA). Para a amplificação dos sinais foi utilizado o kit HiDef Detection HRP Polymer System, em duas etapas, com a incubação sequencial de HiDef Detection™ Amplifier (Mouse e Rabbit), seguida de HiDef Detection™ HRP Polymer Detector (HiDef Detection HRP Polymer System; Cell Marque, Rocklin, CA). Para a visualização das formas amastigotas de *Leishmania* spp. foi utilizado o cromógeno DAB diluído em água destilada e ureia, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram contracoloradas com hematoxilina de Harris, desidratadas em etanol absoluto, clarificadas em xilol e cobertas com resina sintética e lamínula histológica. Como controle positivo da reação foram utilizadas duas amostras de tecido canino acentuadamente parasitadas com formas amastigotas de *Leishmania* spp.

Para a avaliação da intensidade parasitária, os macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania* spp. foram contados em cinco campos com maior densidade de células parasitadas, à ampliação de 40x e auxílio de uma grade óptica de 1 mm² e um contador manual de células. Em seguida, para cada animal foi obtida a média de macrófagos parasitados em cinco campos e atribuídos os escores de intensidade parasitária, a saber: ausente (quando não observadas formas amastigotas), discreto a moderado (0,2 a 10 macrófagos parasitados), e acentuado (mais de 10 macrófagos parasitados)⁽²²⁾.

Análise estatística

Para as variáveis sexo, idade, raça, classificação clínica e alterações histomorfológicas do baço e linfonodo foi empregada estatística descritiva. Para a análise de concordância quanto ao número de casos positivos aos exames histopatológico e imuno-histoquímico foi utilizado o teste não paramétrico Kappa, ao nível de significância de 5%, sendo, em seguida, aplicado o escore excelente ($0,8 < k \leq 1$), muito bom ($0,6 < k \leq 0,8$), bom ($0,4 < k \leq 0,6$), razoável ($0,2 < k \leq 0,4$) ou péssimo ($k \leq 0,2$), para determinar o grau de concordância entre os exames. Para a comparação da intensidade parasitária entre baço e linfonodo foi aplicado o teste de Mann-Whitney, considerando o nível de significância de 5%. Para isso, foram utilizadas planilhas eletrônicas Excel 2016 e o

software R, incluindo as bibliotecas "irr" e "stats".

Resultados

Entre os 27 cães reativos para leishmaniose nos testes DPP® e ELISA, 51,9% (n = 14) dos animais eram jovens, 25,9% (n = 7) adultos e 22,2% (n = 6) idosos. Em relação ao sexo, 66,7% (n = 18) eram fêmeas e 33,3% (n = 9) machos. Além disso, 51,9% (n = 14) eram cães de raça pura e 48,1% (n = 13) sem raça definida. À avaliação macroscópica 77,8% (n=21) dos cães apresentaram descamação cutânea, 55,5% (n=15) onicogribose e 48,1% (n=13) alopecia. Além disso, um cão apresentou úlcera nasal e outro úlcera oral, o que representa 3,7% para cada uma dessas alterações. Para a variável escore corporal, 14,8% (n=4) dos animais apresentaram baixo escore corporal, 51,8% (n=14) médio escore corporal e 11,1% (n=3) discreto sobrepeso. O escore corporal não foi estabelecido em seis animais. De acordo com as lesões à avaliação macroscópica, 7,4% (n = 2) dos cães foram assintomáticos e 92,6% (n = 25) sintomáticos.

À avaliação macroscópica 81,5% (n = 22) dos animais apresentavam esplenomegalia e 22,2% (n = 6) algum grau de nodulação esplênica (Figura 1). Além disso, 63,0% (n = 17) dos cães apresentaram linfadenomegalia generalizada, um cão apresentou linfadenomegalia axilar e outro linfadenomegalia axilar e mandibular.

Avaliação histopatológica

A avaliação histomorfológica das amostras esplênicas evidenciou 100% (n = 27) dos cães com algum grau de desorganização da arquitetura do baço (Tabela 1) e, entre estes, 18,5% (n = 5) desenvolveram granulomas com evidência de fibrose confirmada à coloração de Tricrômico de Masson (Figura 1).

Acrescente-se que, 55,6% (n = 15) dos animais apresentaram periesplenite com celularidade variada (Tabela 1), 66,6% (n = 18) espessamento da cápsula esplênica (Figura 2) e 88,8% (n = 24) hematopoiese extramedular, caracterizada pela evidenciação de megacariócitos no parênquima esplênico. Além disso, 92,6% (n = 25) dos cães apresentavam algum grau de hemossiderose esplênica e em 14,8% (n = 4) havia macrófagos esplênicos parasitados por *Leishmania* spp. (Figura 2). Duas das cinco amostras classificadas ao escore quatro exibiram formas amastigotas de *Leishmania* spp. no citoplasma de macrófagos.

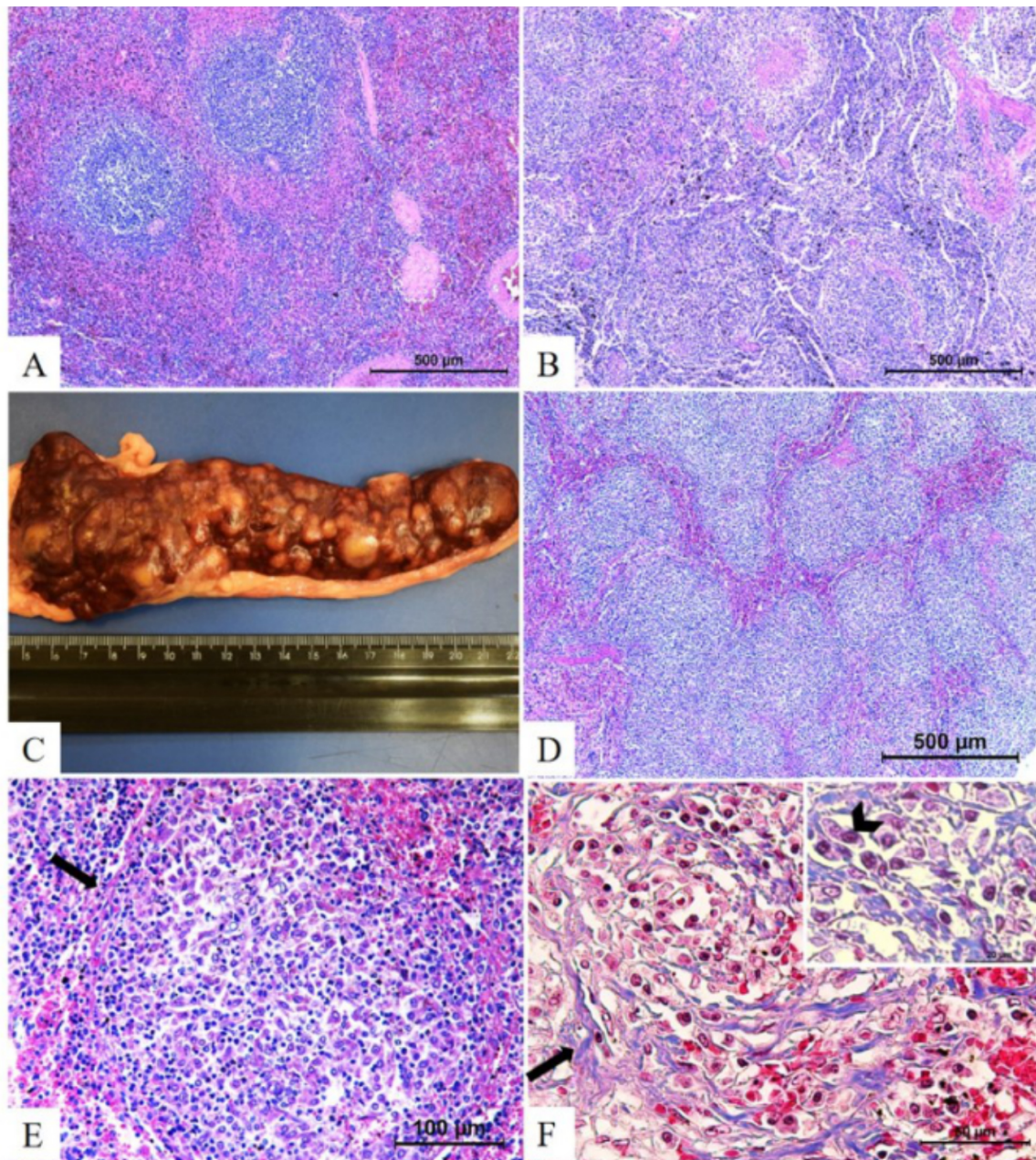


Figura 1. Baço de cães reagentes para CanL aos testes DPP® e ELISA. A) Tecido linfoide em escore dois de desorganização. Regiões foliculares discretamente desorganizadas e com pouca evidência e delimitação das regiões linfoides. HE. B) Tecido linfoide em escore três de desorganização. Microarquitetura esplênica difusamente desorganizada, com estruturas de folículo linfoide indistintas da polpa vermelha. HE. C) Aspecto macroscópico de um baço exibindo esplenomegalia e superfície nodular difusa. D) Tecido linfoide em escore quatro de desorganização. O parênquima esplênico exibe granulomas bem definidos. HE. E) Granuloma esplênico em maior aumento, evidenciando infiltrado de linfócitos, plasmócitos e células epitelioides delimitados por fibrose (seta). HE. F) Granuloma esplênico com evidência de células epitelioides (cabeça da seta) e fibras colágenas (seta). Tricrômico de Masson.

Tabela 1. Escores de desorganização do tecido linfoide esplênico e periesplenite no baço de cães reagentes para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA

Parâmetros	Frequência	%
Escores de desorganização do tecido linfoide esplênico	27	100.0
Escore 0	0/27	0.0
Escore 1	fev.-27	7.4
Escore 2	14/27	51.9
Escore 3	jun.-27	22.2
Escore 4	mai.-27	18.5
Periesplenite	15/27	55.6
Linfócitos, plasmócitos e macrófagos	dez.-27	44.4
Linfócitos, plasmócitos e macrófagos com amastigotas	fev.-27	7.4
Linfócitos e plasmócitos	jan.-27	3.7

As alterações histomorfológicas no linfonodo incluíram hiperplasia cortical e paracortical difusa (96,3%, n = 26), hiperplasia folicular com centro germinativo reativo na região cortical (55,6%, n = 15), hiperplasia e hipertrofia de macrófagos no seio subcapsular (70,3%, n = 19), hiperplasia e hipertrofia de macrófagos medulares (88,9%, n = 24) e hiperplasia e hipertrofia dos cordões medulares (100%, n = 27). Além disso, 22,2% (n = 6) dos linfonodos apresentaram espessamento capsular devido à fibrose e 85,2% (n = 23) espessamento devido à fibrose e infiltrado inflamatório capsular. Entre aqueles com infiltrado capsular, 59,3% (n = 16) eram do tipo linfoplasmocítico e 25,9% (n=7) do tipo linfoplasmocítico e macrófágico. Ainda, 18,5% (n = 5) dos linfonodos apresentavam macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania* spp. e 40,7% (n=11) edema de cordões e seios. A Figura 3 ilustra as principais alterações histomorfológicas no linfonodo de cães reativos para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA.

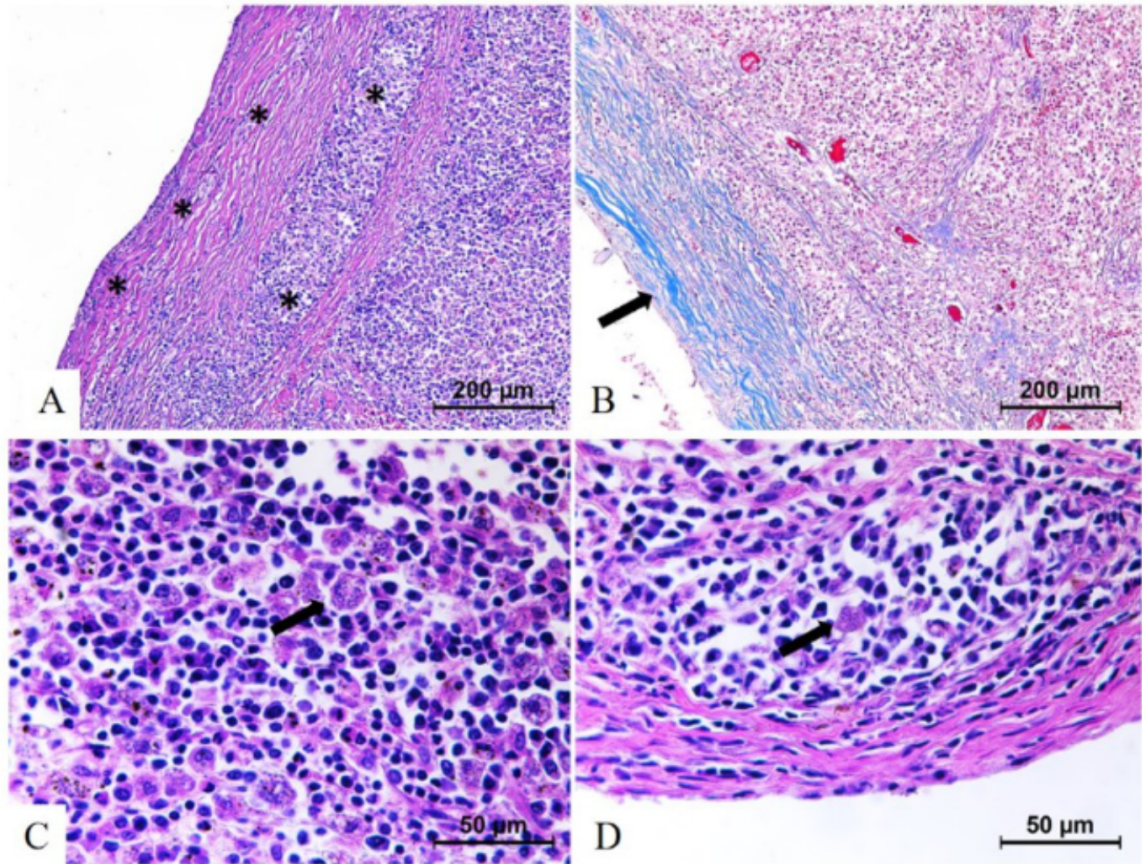


Figura 2. Fotomicrografias do baço de cães reativos para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA. A) Perisplenite. Cápsula esplênica espessada e intercalada com infiltrado inflamatório linfoplasmocítico e macrófagico (asteriscos). HE. B) Acentuada deposição de colágeno (fibrose) na cápsula esplênica (seta). Tricrômico de Masson. C) Formas amastigotas de *Leishmania* spp. no citoplasma de macrófagos do parênquima esplênico (seta). HE. D) Macrófagos próximos à cápsula, exibindo formas amastigotas de *Leishmania* spp. HE.

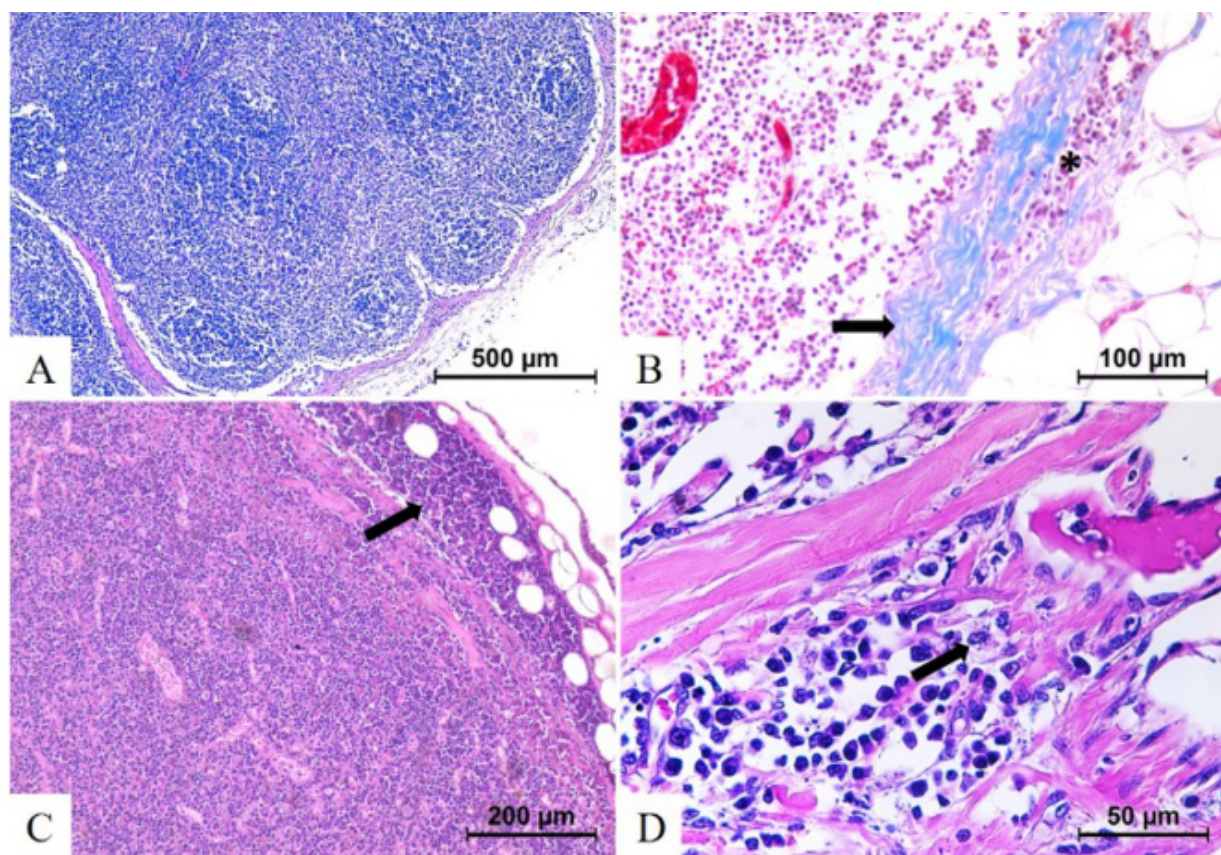


Figura 3. Fotomicrografia do linfonodo de cães reativos aos testes CanL para DPP® e ELISA. A) Hiperplasia cortical e paracortical difusa. HE. B) Espessamento capsular por fibrose (seta) e infiltrado inflamatório (asterisco). Tricrômico de Masson. C) Infiltrado inflamatório capsular (seta). HE. D) Formas amastigotas de *Leishmania* spp. no citoplasma de macrófagos (seta) na região cortical do septo interfolicular. HE.

À técnica de IHQ foi constatada variada imunomarcção das formas amastigotas da *Leishmania* spp. nas amostras de baço e linfonodo dos cães reagentes para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA (Figura 4), havendo 22,2% (n=6) de imunomarcção esplênica e 37,0% (n=10) no linfonodo.

A análise de concordância quanto ao número de casos positivos aos exames histopatológico (n = 5, maior número de amostras positivas entre o baço e linfonodo) e imuno-histoquímico (n = 10, maior número de amostras entre baço e linfonodo) mostrou boa concordância (k = 0,55; p = 0,00124). A avaliação da intensidade parasitária no baço e linfonodo pela técnica de IHQ mostrou animais com escores ausente, discreto a moderado e acentuado. Além disso, a comparação da intensidade parasitária não diferiu entre baço e linfonodo à avaliação imuno-histoquímica (p = 0,23) (Tabela 2).

Os dados referentes à classificação dos escores de desorganização do tecido linfóide e intensidade parasitária na técnica de imunohistoquímica estão descritos na Tabela 3.

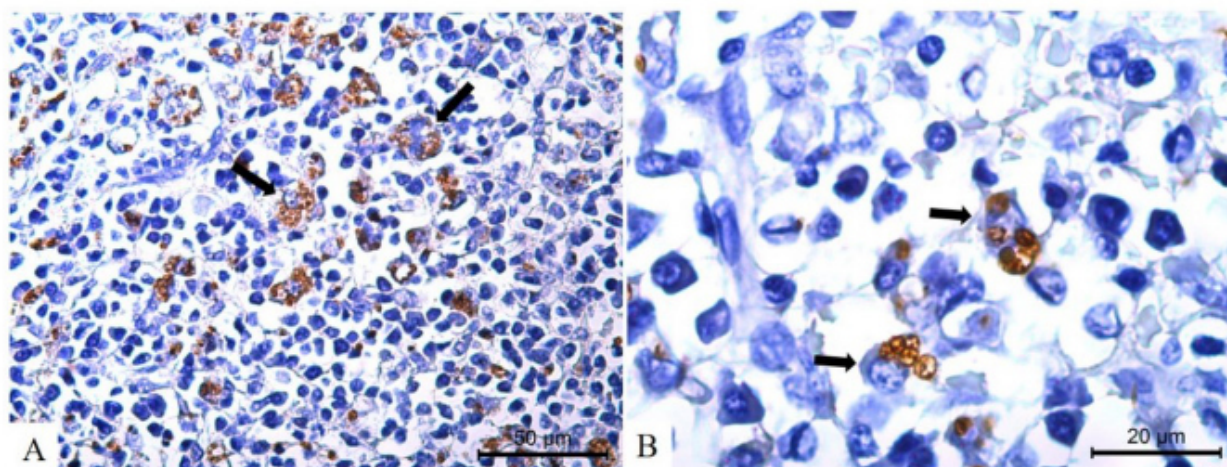


Figura 4. Fotomicrografias do baço e linfonodo de cães reativos para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA. Imunocoloração de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no citoplasma de macrófagos do baço (setas) (A) e linfonodo (setas) (B). IHC, anti-Leishmania.

Tabela 2. Distribuição dos escores e comparação das médias da intensidade parasitária no baço e linfonodo pela técnica de IHQ

Órgão	Intensidade Parasitária	n	%	Média (p=0,23)
Baço	Ausente	21/27	77.8	1.44 ^a
	Discreto a moderado	abr.-27	14.8	
	Acentuado	fev.-27	7.4	
Linfonodo	Ausente	17/27	63.0	3.55 ^a
	Discreto a moderado	ago.-27	29.6	
	Acentuado	fev.-27	7.4	

n - número de amostras; % - porcentagem; Média - de intensidade parasitária; As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 3. Escores de desorganização do tecido linfoide e frequência da intensidade do parasita

Escore	Frequência de casos positivos (%)	Discreto a moderado (%)	Acentuado (%)
0	0/27 (0)	0 (0)	0 (0)
1	0/27 (0)	0 (0)	0 (0)
2	3/27 (11.1)	2 (7.4)	1 (3.7)
3	1/27 (3.7)	1 (3.7)	0 (0)
4	2/27 (7.4)	1 (3.7)	1 (3.7)

Discussão

Vinte e quatro dos 27 cães reativos para CanL aos testes DDP® e ELISA eram sintomáticos, os quais apresentaram principalmente descamação esfoliativa, onicogrifose e alopecia. Estudos também mostraram que as lesões comuns na CanL^(22,23) incluem onicogrifose⁽¹²⁾ (Cavalcanti et al., 2015) e lesões cutâneas como descamação esfoliativa, úlceras e alopecia⁽²⁷⁾, além de baixo escore corporal^(7,10), este último não observado na maioria dos animais deste estudo. Assim, fatores como a resposta individual à doença e o grau de desenvolvimento das lesões sistêmicas podem mediar diretamente a progressão do CanL e refletir na perda de peso dos animais afetados. Esplenomegalia⁽¹²⁾ e linfadenomegalia^(7,10) também são descritos na maioria dos cães desta pesquisa.

Alterações nos tecidos linfoides são frequentes nas infecções por *Leishmania* spp., como o baço, que desempenha papel importante na CanL, pois possui componentes da resposta imune e atua na interação com o parasito, o que reflete alterações morfológicas⁽¹⁶⁾, conforme observado no baço dos animais desta pesquisa. Essas alterações incluem principalmente algum grau de desorganização da microestrutura do tecido linfoide devido a reações imunológicas contra o parasito⁽²⁵⁾.

Todos os animais deste estudo exibiram algum grau de desorganização estrutural esplênica, apresentando moderada desorganização do tecido linfoide na maioria dos casos, com regiões foliculares pouco evidentes ou hiperplasia de folículos linfoides. Ao mesmo tempo, casos com formação de granulomas bem definidos em associação ou não a formas amastigotas de *Leishmania* spp. foram observados, sem relação entre essas alterações e a presença ou intensidade do parasita. Nesse contexto, Santana et al.⁽¹⁶⁾ e Silva et al.⁽²⁵⁾ também descreveram alterações esplênicas em cães com CanL, incluindo atrofia ou hiperplasia do folículo linfoide, resultando na perda de definição das regiões foliculares. Por outro lado, alguns autores têm descrito a formação de granulomas frequentemente associada a carga parasitária^(12,16).

A desorganização da arquitetura esplênica foi descrita em animais positivos para testes sorológicos e negativos para testes parasitológicos na investigação de CanL, sugerindo que a causa desse achado pode estar relacionada à resposta inflamatória prolongada no baço, com conseqüente redução da carga parasitária^(11,28). Ademais, um estudo que avaliou ratos infectados com *Leishmania donovani*, evidenciou alterações esplênicas estimuladas por altos níveis do fator de necrose tumoral (TNF), sem associação à carga parasitária⁽²⁹⁾. Embora não se tenha avaliado o TNF nesta pesquisa, pondera-se que essa hipótese possa justificar o fato de que todos os cães apresentaram alterações esplênicas, independente da presença ou intensidade do parasito.

Apesar da desorganização da arquitetura esplênica ser um importante achado neste estudo, amostras classificadas aos escores três e quatro apresentaram acentuada desorganização da polpa branca e formação de fibrose associada ou não à presença do parasito. Nesse sentido, Santana et al.⁽¹⁶⁾ descreveram a ruptura da arquitetura esplênica e formação de fibrose em decorrência da produção de uma teia reticular, visando prevenir ou retardar a progressão do parasito a outros tecidos^(16,30). Além disso, muitas amostras deste estudo apresentavam periesplenite, possivelmente devido à extensão da reação inflamatória esplênica do parênquima, associada ou não à presença do parasito nesses casos, o que também é frequentemente descrito nos casos de CanL, mas comumente relacionado à carga parasitária^(16,31,32).

Um número relevante de animais com linfadenomegalia foi observado neste estudo, sendo essa alteração frequente nos casos de CanL^(7,10). A avaliação histopatológica do linfonodo axilar evidenciou hiperplasia e hipertrofia das regiões medular e cortical, sem associação aos sinais clínicos, corroborando os achados de Lima et al.⁽¹⁰⁾. No entanto, a hipertrofia e hiperplasia de macrófagos nos seios capsulares e/ou medulares estão entre as alterações mais frequentes nos linfonodos de cães infectados por *Leishmania* spp.⁽²⁵⁾, conforme também observado neste estudo. Ainda, Lima et al.⁽¹⁰⁾ sugeriram que a hiperplasia e a hipertrofia nas zonas cortical e medular associadas a inflamação capsular crônica e difusa são frequentes e justificam a ocorrência de linfadenomegalia nos casos de CanL.

Também, a maioria das amostras de linfonodo deste estudo exibia espessamento capsular devido a infiltrado inflamatório linfoplasmocítico e macrófágico agregado à fibrose, um dado frequente nos casos de CanL⁽¹⁰⁾. Nesse contexto, Giunchetti et al.⁽³³⁾ descreveram que o infiltrado capsular é frequentemente composto por macrófagos, incluindo a presença de parasitos, porém, neste estudo, essas alterações não foram associadas à presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

A avaliação histopatológica foi utilizada para observar as alterações morfológicas e identificar formas amastigotas do parasito, sendo essa identificação também realizada por IHC. Os resultados da identificação em ambas as avaliações foram comparados e, na análise qualitativa, a imuno-histoquímica do baço e linfonodo expressou o melhor resultado numérico, mas sem diferença estatística. Esse dado corrobora o descrito por autores que apontam a técnica de IHQ como ferramenta complementar ao diagnóstico da CanL, por apresentar maior sensibilidade e especificidade^(21,26,27,33). Tafuri et al.⁽²⁷⁾ também relataram que a IHQ aumenta a eficácia dos testes de diagnóstico em 50% em comparação à avaliação histopatológica e a coloração de hematoxilina-eosina. Por outro lado, a boa concordância entre as avaliações histopatológica e imuno-histoquímica

observada neste estudo, inferindo semelhança entre os testes, pode se justificar pelo pequeno número de amostras, fato também citado por Xavier et al.⁽³⁴⁾, quando compararam os mesmos métodos de diagnóstico para avaliar a intensidade parasitária em cães com CanL.

Além disso, não foi observada diferença entre baço e linfonodo em relação à intensidade parasitária, indicando que ambos os órgãos são úteis ao diagnóstico da CanL. No entanto, não foram encontrados na literatura dados que ratificassem ou retificassem tal resultado em relação a esses órgãos. Contudo, Paparcone et al.⁽³⁵⁾ compararam diferentes locais de colheita da medula óssea para o diagnóstico de CanL e também não observaram diferença quanto à intensidade do parasito. Apesar disso, os autores mencionaram que embora o linfonodo seja igualmente rico em parasitos, principalmente em cães sintomáticos, o acesso ao tecido linfoide nesse órgão pode ser limitado, principalmente quando não há aumento de volume, o que comumente ocorre em animais em estágio inicial da doença ou naqueles assintomáticos crônicos.

Conclusões

Baço e linfonodo de cães reativos para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA desenvolvem alterações histomorfológicas decorrentes das reações imunológicas causadas pela doença, independente da presença do parasito e da carga parasitária. No baço, a desorganização do tecido linfoide em diferentes graus compreende a principal alteração, sendo a esplenite granulomatosa a lesão mais grave e, no linfonodo, prevalecem hiperplasia e hipertrofia dos cordões medulares e hiperplasia das regiões cortical e paracortical. Além disso, o baço e o linfonodo apresentam carga parasitária semelhante à avaliação imuno-histoquímica.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

À Diretoria de Vigilância de Zoonoses do município de Goiânia (DVZ), GO, Brasil, pelo fornecimento dos animais ao estudo e por todo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa. Ao Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos e ao Serviço de Anatomia Patológica, ambos do Instituto Nacional de Doenças Infecciosas Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, pelo apoio técnico nesta pesquisa.

Referências

1. Brasil, Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal. 2014. 120p.
2. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series. 2010. 186p.
3. Coura-Vital W, Leal CGA, Marques LA, Pinheiro AC, Carneiro M, Reis AB. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. PLoS One [Internet]. 2018 [cited 2020 Dec 10]; 13(12): e0208613. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208613>. English.
4. Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, Silva ES, et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS Negl Trop Dis. [Internet] 2013 [cited 2020 Dez 12]; 7(4):e2182. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002182>. English.
5. Oliveira VC, Boechat VC, Mendes Junior AAV, Madeira MF, Ferreira LC, Figueiredo FB, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. PLoS One [Internet]. 2017 [cited 2021 Jan 21]; 12(4):e0175588. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175588>. English.
6. Tafuri WL, Michalick MS, Dias M, Genaro O, Leite VH, Barbosa AJ, et al. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1989; 31(3):139–145.
7. Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Johnson AJ. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. II. Pathology. Vet Pathol. 1984; 21:80–86.
8. Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet Immunol Immunopathol. [Internet]. 2005 [cited 2021 Jan 21]; 106:151–158. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.08.024>. English.
9. Maia C, Campino L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. Journal Trop Med. [Internet]. 2012 [cited 2021 Jan 23]. 2012: 541571. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.08.024>. English.
10. Lima WG, Michalick MSM, Melo MN, Washington LT, Wagner LT. Canine visceral leishmaniasis: A histopathological study of lymph nodes. Acta Trop. [Internet]. 2004 [cited 2021 Jan 15]; 92:43–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.04.007>. English.
11. Silva LC, Castro RS, Figueiredo MM, Michalick MSM, Washington LT, Wagner LT. Canine

visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *International Jour Exp Pathol*. [Internet]. 2013 [cited 2021 Jan 04]; 94:133–143. Available from: <https://doi.org/10.1111/iep.12010>. English.

12. Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, Pereira LOR, Mestre GL, Ferreira ABR, Morgado FN, et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum* naturally infected dogs. *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2021 Jan 20]; 10(4):e0123009. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123009>. English.

13. Haley PJ. The lymphoid system: A review of species differences, *J. Toxicol. Pathol.* [Internet]. 2017 [cited 2021 Jan 11]; 30:111–123. Available from: <https://doi.org/10.1293/tox.2016-0075>. English.

14. Silva AV, Souza TL, Figueiredo FB, Mendes AAV, Ferreira LC, Filgueira COB, et al. Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum* -infected dogs. *Immun Inflamm Dis*. [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 10]; 8:127–139. (<https://doi.org/10.1002/iid3.285>). English.

15. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* [Internet]. 2005 [cited 2021 Jan 10]; 5:606-616. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri1669>. English.

16. Santana CC, Vassallo J, Freitas LAR, Oliveira GGS, Carvalho LCP, Santos WLS. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol.* [Internet]. 2008 [cited 2021 Jan 17]; 30:515–524. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x>. English.

17. Lima IS, Silva JS, Almeida VA, Junior FGL, Souza PAN, Laranjeira DF, et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2020 Jan 28]; 9(2):e87742. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087742>. English.

18. Silva JS, Andrade AC, Santana CC, Santos LQ, Oliveira CI, Veras PST, et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2020 Jan 26]; 7(1): e29103. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029103>. English.

19. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 13th ed. Guanabara Koogan; 2017. 568p.

20. Reis AB, Martins-Filho OA, Carvalho AT, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. [Internet]. 2009 [cited 2021 Jan 18]; 128:87–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>. English.

21. Menezes RC, Madeira MF, Ferreira LC, Barbosa Filho CJL, Miranda LHM, Figueiredo FB. Cell-block immunohistochemistry of bone marrow aspirates: A novel tool to improve the diagnosis

of leishmania infection in dogs. *J. Comp. Pathol.* [Internet]. 2016 [cited 2021 Jan 16]; 154:157–160. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.12.005>. English.

22. Boechat VC, Mendes Junior AAV, Madeira MF, Ferreira LC, Figueiredo FB, Rodrigues FC, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitol. Res.* [Internet]. 2016 [cited 2021 Jan 10]; 115:2371–2379. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4987-4>. English.

23. Souza CC, Barreto TO, Silva SM, Pinto AWJ, Figueiredo MM, Rocha OGF, et al. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol.* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jan 07]; 95:260–270. Available from: <https://doi.org/10.1111/iep.12080>. English.

24. Castro MCN, Vieira AB, Santos MCS, Gershony LC, Soares AMB, Ferreira AMR. Escore de condição corporal como indicador do prognóstico de gatos com doença renal crônica, *Cienc Rural.* [Internet]. 2010 [cited 2021 Jan 21]; 40:365–370. Available from: <https://doi.org/10.1590/s0103-84782010005000010>. Portuguese.

25. Silva AVA, Figueiredo FB, Menezes RC, Mendes-Junior AA, Miranda LHM, Cupolillo E, et al. Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of *Leishmania infantum*-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. *PLoS Negl Trop Dis.* [Internet]. 2018 [cited 2020 Jan 29]; 12(4):e0006445. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445>. English.

26. Toplu N, Aydogan A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. *Parasitol Res.* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jan 19]; 109:1051–1057. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2345-0>. English.

27. Tafuri WL, Santos RDL, Arantes RME, Gonçalves R, Melo MN, Michalick MSM, et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods.* [Internet]. 2004 [cited 2021 Jan 21]; 292:17–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.05.009>. Portuguese.

28. Vasconcelos TCB, Bruno SF, Miranda LHM, Silva FC, Belo VS, Figueiredo FB. Parasite load, iNOS and cytokine profiles, and histopathological aspects of *Leishmania infantum* infection in dogs with different clinical presentations. *Cienc Rural.* [Internet] 2019 [cited 2020 Jan 19]; 49(10): e20180984. Available from: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180984>. English.

29. Engwerda CR, Ato M, Cotterell SEJ, Mynott TL, Tschannerl A, Gorak-Stolinska PMA, et al. A role for tumor necrosis factor- α in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol.* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jan 18]; 161:429–437. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64199-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64199-5). English.

30. Alexandre-Pires G, Pais D, Correia M, Pina JAE. Leishmaniosis - A report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microsc Res*

Tech. [Internet]. 2006 [cited 2021 Jan 21]; 69:227–235. Available from: <https://doi.org/10.1002/jemt.20267>. English.

31. Tafuri WL, Tafuri WL, Barbosa AJA, Michalick MSM, Genaro O, França-Silva JC, et al. 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*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1996; 38:81–89. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651996000200001>.

32. Tryphonas L, Zawidzka Z, Bernard MA, Janzen EA. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. Can J Comp Med. 1977. 41:1–12.

33. Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis, Vet Immunol Immunopathol. [Internet]. 2018 [cited 2021 Jan 06]; 121:23–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.07.009>. English.

34. Xavier SC, Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. BMC Vet Res. [Internet]. 2006 [cited 2021 Jan 19]; 2:17. Available from: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-17>. English.

35. Paparcone R, Fiorentino E, Cappiello S, Gizzarelli M, Gradoni L, Oliva G, et al. Sternal Aspiration of Bone Marrow in Dogs: A Practical Approach for Canine Leishmaniasis Diagnosis and Monitoring. J Vet Med. [Internet]. 2013 [cited 2021 Jan 27]; 2013:e217314. Available from: <https://doi.org/10.1155/2013/217314>. English.