

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO CITOLÓGICA DE LINFONODOS CANINOS
INFECTADOS POR *LEISHMANIA* SP.**

LUIZA VILLAÇA VEIGA OLIVÉ DE SOUZA

BELO HORIZONTE

2021

LUIZA VILLAÇA VEIGA OLIVÉ DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO CITOLÓGICA DE LINFONODOS CANINOS
INFECTADOS POR *LEISHMANIA* SP.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestrado em Ciência Animal

Área de concentração: Patologia Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Paes.

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo dos Santos Horta

BELO HORIZONTE

2021

S729c

Souza, Luiza Villaça Veiga Olivé de, 1990-
Caracterização citológica de linfonodos caninos infectados por *Leishmania sp.* / Luiza Villaça Veiga Olivé de Souza. – 2021.

Orientador: Paulo Ricardo de Oliveira Paes

Coorientador: Rodrigo dos Santos Horta.

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Patologia clínica

Bibliografia: f. 33 – 36.

1. Linfonodo - Teses - 2. Cães – Doenças - Teses - 3. Leishmaniose - Teses -
I. Paes, Paulo Ricardo de Oliveira – II. Horta, Rodrigo dos Santos - III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecário responsável Marcio Alves dos Santos – CRB3589/0
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

LUIZA VILLAÇA VEIGA OLIVÉ DE SOUZA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.

Aprovado(a) em 31 de maio de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Paulo Ricardo de Oliveira Paes - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Rubens Antônio Carneiro

Dr.(a). Cinthia Melazzo Andrade

Documento assinado eletronicamente por **Paulo Ricardo de Oliveira Paes, Professor do Magistério Superior**, em 01/06/2021, às 00:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Rubens Antonio Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 01/06/2021, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Cinthia Melazzo de Andrade, Usuário Externo**, em 01/06/2021, às 18:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0732643** e o código CRC **19623BA2**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer minha mãe, Andreia, por estar sempre presente em minha vida, me apoiando e dando o exemplo de mulher honesta, forte e trabalhadora, que com muito esforço sempre alcança seus objetivos. Ao meu pai, Raphael, pelo carinho, e suporte em meus estudos. Ao meu irmão, Gustavo, pelos conselhos e cuidado.

Agradeço ao Biel, por me apoiar nos momentos difíceis, por ser meu melhor amigo e companheiro de vida.

Agradeço aos meus colegas Mariah e Lucas, pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao professor Paulo Ricardo, meu orientador há 4 anos, que divide seu conhecimento e que me fez crescer, tanto pessoalmente quanto profissionalmente, muito obrigada!

RESUMO

As hiperplasias dos linfonodos são histologicamente classificadas de acordo com a região hipertrofiada, isto é, hiperplasia dos folículos linfáticos, paracórtex, cordões medulares ou seios medulares, ou ainda, por uma combinação de aumento destas quatro regiões; sendo que cada uma geralmente apresenta uma composição celular diferente. Os poucos trabalhos abordando as características histológicas dos linfonodos de cães portadores de *Leishmania* sp., apresentam algumas divergências, porém são unânimes em relatar a hiperplasia medular, por plasmocitose e/ou histiocitose, como o achado principal. Em áreas endêmicas desta enfermidade, o exame citológico do linfonodo canino é frequentemente utilizado como meio de diagnosticar a infecção, que é feita a partir da observação de formas amastigotas na amostra. O presente estudo analisou 50 amostras citológicas de linfonodo positivas para *Leishmania* sp., com o objetivo de associar as concentrações dos tipos celulares às regiões histológicas afetadas. Em 72% das amostras foi observada concentração aumentada dos tipos celulares dos cordões medulares; em 56% dos tipos celulares dos folículos linfáticos, e em 26% das células histiocíticas, sugerindo hiperplasia/hipertrofia medular, folicular e histiocítica, ou uma combinação destas. Esses resultados apresentaram pontos concordantes e divergentes com os relatados na histologia dos linfonodos da leishmaniose canina.

Palavras-chaves: Hiperplasia linfoide, citologia, amastigotas, LDU.

ABSTRACT

Lymph node hyperplasias are histologically classified according to the hypertrophied region, that consist in hyperplasia of the lymphatic follicles, paracortex, medullary cords, medullary sinuses, or by a combination of these four regions; each of these regions generally having a different cellular composition. The few studies addressing the histological characteristic of canine lymph nodes infected with *Leishmania* sp., present some divergences, but they are unanimous in reporting hyperplasia, due to plasmacytosis and / or histiocytosis, as the main finding. In endemic areas of this disease, cytological examination of the canine lymph node is often used as a means of diagnosing the infection, which is done by observing amastigotes in the sample. The present study analyzed 50 cytological lymph node samples positive for *Leishmania* sp., in order to associate the concentrations of cell types with histological regions. In 72% of the samples, an increased concentration of cell types was observed in the medullary cord; in 56% of the cell types of the lymphatic follicles, and in 26% of the histiocytic cells, suggesting medullary, follicular and histiocytic hyperplasia / hypertrophy, or a combination of these. These results showed points that agreed and diverg with those reported in the histology of canine leishmaniasis lymph nodes.

Keywords: Lymphoid hyperplasia, cytology, amastigotes, LDU.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Sinais clínicos mais frequentemente relatados em 50 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC), de acordo com a ficha clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os casos foram selecionados para a avaliação citológica dos linfonodos25
- Tabela 2** Resultados do exames sorológicos de 38 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC), atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e selecionados para a avaliação citológica do(s) linfonodo(s)25
- Tabela 3** Concentração de formas amastigotas de *Leishmania* sp., quantificadas em (LDU) de 50 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).....26
- Tabela 4** Concentração de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em citologia de linfonodo, quantificadas em LDU, e sua correlação com o resultado do exame sorológico ELISA de 38 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).26
- Tabela 5** Valores médios (desvio padrão), mínimos e máximos e porcentagem de amostras abaixo e acima dos valores de referência para a espécie (V.R.*), das concentrações dos tipos celulares observados na citologia de linfonodos de 50 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).26
- Tabela 6** Regiões possivelmente hiperplásicas do linfonodo de acordo com as concentrações aumentadas dos tipos celulares observados na análise citológica de 50 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).....28
- Tabela 7** Concentrações dos tipos celulares observados na citologia de linfonodos e sua correlação com presença/ausência de sinais clínicos de 50 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) e realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das estruturas básicas de um linfonodo (Tizard, 2014).	12
Figura 2. Tipos celulares possivelmente encontrados em um linfonodo sem alterações A- Pequeno linfócito; B- Centrócito; C- Linfoblasto; D-Centroblasto; E- Imunoblasto; F- Célula média macronucleolada G- Plasmócito; H-Célula Dendrítica APC; I- Macrófago (Comazzi e MaCneill, 2017).....	14

LISTA DE ABREVIATURAS

APC's – Células apresentadoras de antígenos, do inglês, *antigen presenting cells*.

ELISA – Ensaio imunoabsorção imunoenzimática

FDC's – Células dendríticas foliculares

H&E – hematoxilina-eosina

HV-UFGM – Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais

LDU – *Leishmania Donovan* Units

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

PAAF/ PAF – Punção Aspirativa por Agulha fina

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

Th- Linfócitos T auxiliares

V.R, - Valor de referência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Estrutura e Função dos linfonodos.....	11
2.2 Características citológicas dos tipos celulares dos linfonodos	15
2.3 Tipos de hiperplasia dos linfonodos	17
2.4 Leishmaniose Canina	19
2.5 Alterações dos linfonodos de cães infectados pela LVC	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Coleta de dados	23
3.2 Classificação dos sinais clínicos e raça.....	23
3.3 Exames sorológicos	24
3.4 Hemograma completo.....	24
3.5 Avaliação citológica	24
3.6 Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	38

1. INTRODUÇÃO

O sistema linfático consiste de órgãos e vasos linfáticos, que incluem os tecidos linfáticos difusos, linfonodos, baço, medula óssea e timo. Na maioria dos animais, a medula óssea e o timo constituem os órgãos linfáticos primários (ou centrais), já que fornecem as células precursoras linfoides que vão circular e residir nos órgãos linfáticos secundários (ou periféricos) (Ross e Pawlina, 2011; Valli et al., 2016).

Os linfonodos, distribuídos em regiões estratégicas do organismo, são órgãos linfáticos secundários de importância vital para o sistema imunológico. Através de sua estrutura e população celular singular, os antígenos que possam adentrar ao organismo, são monitorados efetivamente (Willard-Mack, 2006).

Os linfonodos são compostos por estroma (que incluem a cápsula e as trabéculas), região cortical (córtex), região medular (medula), vasos sanguíneos, vasos linfáticos e o sistema monocítico-fagocitário. No exame macroscópico do linfonodo, duas regiões são visíveis: o córtex (mais externo) e a medula (mais interna) (Fry e McGavin, 2012).

Estas estruturas, abrigam diferentes subconjuntos de linfócitos e células do sistema monocítico-fagocitário, e estão conectados por um sistema de vasos linfáticos que transportam a linfa, o líquido gerado a partir da drenagem dos interstícios teciduais (Ward et al., 2018).

As células linfoides, em uma amostra citológica de linfonodo sem alteração, geralmente contêm predomínio de pequenos linfócitos B e T, indistinguíveis morfológicamente entre si, apresentando concentrações maiores que 80%. Além dos pequenos linfócitos B e T, os outros oito tipos de células linfoides que podem ser observados, com as respectivas proporções, são os centrócitos (5-10%), centroblastos (1-5%), imunoblastos (1-5%), linfoblastos (<1%), células médias macronucleoladas (<1%), plasmócitos (<2%) e células Mott (<1%) (Comazzi e MaCneill, 2017).

Não há uma linha clara de divisão na citologia, entre o linfonodo normal e o linfonodo alterado. A diferenciação, porém, é discutível, já que sempre haverá algum grau de reatividade em um linfonodo aumentado (Blauvelt e Messick, 2020).

A hiperplasia do linfonodo ocorre quando a presença de antígenos alcança o órgão e estimula o sistema imunológico. Em muitos casos, as reações que causam a hiperplasia são localizadas,

entretanto, elas também podem ser sistêmicas e atingir todos os linfonodos, gerando uma linfadenomegalia generalizada (Blauvelt e Messick, 2020).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica e uma das principais causas de linfadenomegalia nos cães. O aumento dos linfonodos em cães infectados pela *Leishmania* sp. pode ser generalizado ou regional. Na histopatologia são observados dois principais tipos de alteração morfológica na linfadenopatia pela LVC. Pode ocorrer o aumento da área cortical, com proliferação celular nos folículos e, também aumento da zona medular do linfonodo, com a presença de plasmócitos e macrófagos (Lima et al. 2004; Giunchetti et al. 2008, Nelson e Couto, 2014, Valli et al. 2016).

Na citologia, as amostras de linfonodos infectados com as formas amastigotas de *Leishmania* sp. apresentam um predomínio de pequenos linfócitos, com possível aumento na concentração de linfócitos médios e grandes, além de intenso aumento na concentração de plasmócitos. Pode ser também observado um aumento da concentração de macrófagos, já que o sistema monocítico-fagocitário é ativado com a presença das formas amastigotas de *Leishmania* sp. Estas características citológicas são observadas principalmente em linfonodos hiperplásicos e nas linfadenites macrofágicas (Comazzi e MaCneill, 2017; Blauvelt e Messick, 2020).

O presente estudo tem como objetivo caracterizar, através da citologia de linfonodos infectados por *Leishmania* sp., as possíveis alterações nas concentrações dos tipos celulares causados por este patógeno, e assim, avaliar a possibilidade de diagnosticar os diferentes tipos de hiperplasia linfóides por meio do exame citológico do linfonodo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura e Função dos linfonodos

Os linfonodos são órgãos constituídos por tecido linfoide e estão distribuídos em diferentes regiões do corpo. Estes órgãos, que possuem um formato ovalado, apresentam um lado convexo e o outro com uma reentrância, denominada hilo. Os linfonodos são responsáveis pela filtração da linfa originada da drenagem de áreas específicas do corpo (Junqueira e Carneiro, 2013; König e Liebich 2016; Valli et al. 2016).

A linfa é constituída do fluido intersticial pobre em proteínas que extravasam dos vasos e células do corpo. Caso um antígeno invada o organismo, ocorre uma resposta localizada, onde os mediadores inflamatórios e as células apresentadoras de antígeno (APC's, do inglês, *antigen presenting cells*) migram até o local, para iniciar o combate ao invasor. Os vasos linfáticos

captam estes componentes, junto com fluido intersticial e os transportam, pela linfa, através do fluxo linfático aferente (Von Adrian e Meppel, 2003).

A principal função do linfonodo é facilitar a interação entre as APC's, células sensíveis à antígenos (linfócitos B e T) e antígenos, para que ocorra uma resposta imune adequada. O sistema linfático permite que os patógenos sejam retirados dos tecidos e conduzidos pela linfa até o linfonodo. Os vasos sanguíneos, além de fornecer nutrição sanguínea para o órgão, transportam os linfócitos do tipo “*naive*”, que nunca entraram em contato com os antígenos, para os linfonodos. Estes sistemas em conjunto, permitem que o linfonodo filtre a linfa, removendo os antígenos, e retorne com linfócitos ativados para a circulação sanguínea (Tizard, 2014; Valli et al, 2016).

O linfonodo é envolto por uma cápsula composta principalmente por tecido conjuntivo irregular denso. As trabéculas se estendem da cápsula para o parênquima como septos irregulares, que são distribuídos por todo o córtex e medula. As trabéculas fornecem suporte para todo o linfonodo, além de carregar os vasos sanguíneos e os nervos (Press e Landverk, 2006; Ross e Pawlina, 2011).

O fluxo da linfa para o linfonodo acontece por meio dos vasos linfáticos aferentes. Já no interior do órgão, o fluxo segue pelo seio subcapsular, seios corticais e seios medulares, deixando o linfonodo por meio dos vasos linfáticos eferentes. Os vasos linfáticos aferentes adentram pela cápsula, por onde a linfa adentra no seio subcapsular, onde o linfonodo inicia o processo de filtração. A filtração no seio subcapsular, ocorre por meio dos macrófagos que formam, junto com as células endoteliais linfáticas, a parede do seio. Esses macrófagos projetam-se na luz do seio, realizando a captura de antígenos e a apresentação destes aos linfócitos do córtex. Após a passagem pelo seio subcapsular, a linfa percorre os seios corticais, que não são visíveis em coloração de hematoxilina-eosina (H&E), e os seios medulares, onde tem a filtração da linfa continua. A saída da linfa, acontece pelos vasos linfáticos eferentes localizados no hilo do linfonodo (Junqueira e Carneiro, 2013; Press e Landverk, 2006; Ross e Pawlina, 2011; Valli et al. 2016).

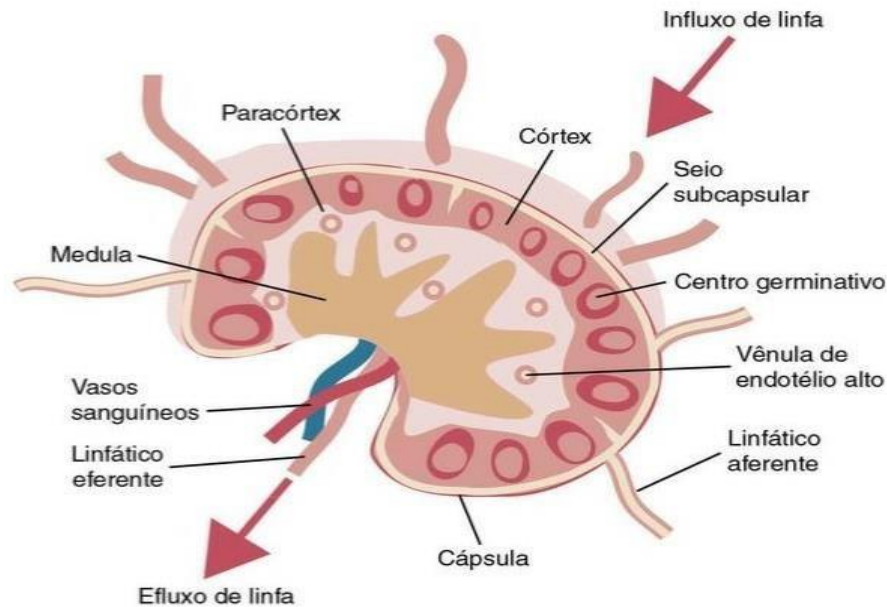


Figura 1. Esquema das estruturas básicas de um linfonodo (Tizard, 2014).

O parênquima do linfonodo pode ser dividido em região cortical, mais externa, que pode ser subdividido em córtex superficial e córtex profundo ou paracórtex, e pela região medular, mais interna (Konig e Liebich, 2016).

A região cortical superficial do linfonodo é constituída principalmente pelos folículos linfáticos, que podem ser primários ou secundários. Os folículos primários possuem apenas linfócitos B pequenos em repouso. Caso ocorra a interação entre um antígeno e os linfócitos B do folículo primário, a expansão celular se inicia e os centros germinativos são formados, transformando os folículos primários em folículos secundários (Willard-Mack, 2006; Konig e Liebich, 2016).

Os centros germinativos ficam rodeados pelos mesmos tipos celulares B que formam o folículo primário, e que foram deslocadas para a periferia do folículo, formando uma argola ao redor do centro germinativo. Esta região é denominada zona do manto. No centro germinativo, ocorre a proliferação dos centroblastos, que resultam na formação dos centrócitos. A região mais superficial do centro germinativo (próxima ao seio subcapsular), denominada zona clara, é composta predominantemente por centrócitos e macrófagos. A aparência “clara” se dá pelo citoplasma amplo dos macrófagos. Já a região mais profunda, mais próxima do paracórtex, é composta predominantemente pelos centroblastos, o que resulta na aparência “escura” na coloração H&E. Além dos centroblastos, centrócitos e macrófagos, são observados nos centros

germinativos, em menor concentração, os imunoblastos, células dendríticas APC's e raros pequenos linfócitos T auxiliares (Th) (Willard-Mack, 2006; Valli et al., 2016).

Os centrócitos se diferenciam em linfócitos B de memória e em precursores de plasmócitos. Estes, migram para a região medular e se transformam em plasmócitos, onde, se necessário, irão secretar anticorpos na linfa (Arpin et al., 1995; Willard-Mack, 2006).

Na área mais externa dos folículos linfáticos, há a presença de uma pequena área, chamada zona marginal, que é mais visível no baço do que no linfonodo. A zona marginal é mais proeminente na parte mais superficial do folículo, e se junta à zona do manto, também mais espessa na proximidade do seio subcapsular. A zona marginal é constituída basicamente pelas células médias macronucleoladas que, como os demais principais tipos linfoides do folículo, é de imunofenótipo B (Fournel et al., 1995).

A região do córtex superficial que não é composta por folículos, isto é, as áreas interfoliculares, é composta predominantemente por pequenas células T. O tipo celular T também predomina na área do córtex profundo, que normalmente não possui folículos linfáticos primários ou secundários. Embora não haja consenso sobre a denominação destas áreas, é possível agrupar as regiões interfoliculares e o córtex profundo nas denominações de paracórtex ou zona T. Independente da nomenclatura utilizada, estas regiões, além dos pequenos linfócitos T, contém células blásticas linfoides (linfoblastos e imunoblastos) e células dendríticas interdigitantes APC's (Willard-Mack, 2006; Valk e Meijer, 2012).

A região medular, localizada na parte mais profunda do linfonodo, é como um labirinto onde há a filtração da linfa, pelos seios medulares. Na amostra histológica, a medula do linfonodo é observada como um entremeado de áreas escuras e áreas mais claras. As áreas escuras são os cordões medulares, e as claras os seios medulares. Nos cordões medulares há a presença de plasmócitos, raros mastócitos e concentrações discretas de macrófagos e células T de memória. Ao atravessar o córtex, os seios perdem seu revestimento de células endoteliais e macrófagos intercalados e adquire um "revestimento" predominantemente composto por macrófagos. Desta forma, os seios medulares estão repletos de histiócitos/ macrófagos (Von-Andrian e Meppel, 2003; Valk e Meijer, 2012).

Como o organismo está em constante contato com diferentes tipos de antígenos, o linfonodo é estimulado grande parte do tempo, o que pode causar aumento de uma área e diminuição de outra,

que resulta na alteração da sua composição celular nos seus diferentes compartimentos (Valk e Meijer, 2012).

2.2 Características citológicas dos tipos celulares dos linfonodos

As células que predominantemente compõe os linfonodos são as células linfoides, células dendríticas foliculares APC's (FDC'S) e macrófagos (Ross e Pawlina, 2011; Valk e Meijer, 2012).

Em uma amostra citológica de linfonodo sem alterações, as células linfoides são compostas predominantemente (>80%) por pequenos linfócitos B e T, que são indistinguíveis morfológicamente entre si. Estes tipos celulares possuem núcleos arredondados ou com um discreto recuo, com diâmetro de 7 a 10 μm , cromatina condensada, nucléolo não visível, e um escasso citoplasma basofílico. Além dos pequenos linfócitos B e T, os outros oito tipos de células linfoides que podem ser observados, com as respectivas proporções, são: centrócitos (5-10%), centroblastos (1-5%), imunoblastos (1-5%), linfoblastos (<1%), células médias macronucleoladas (<1%), plasmócitos (<2%) e células Mott (<1%) (Comazzi e MaCneill, 2017).

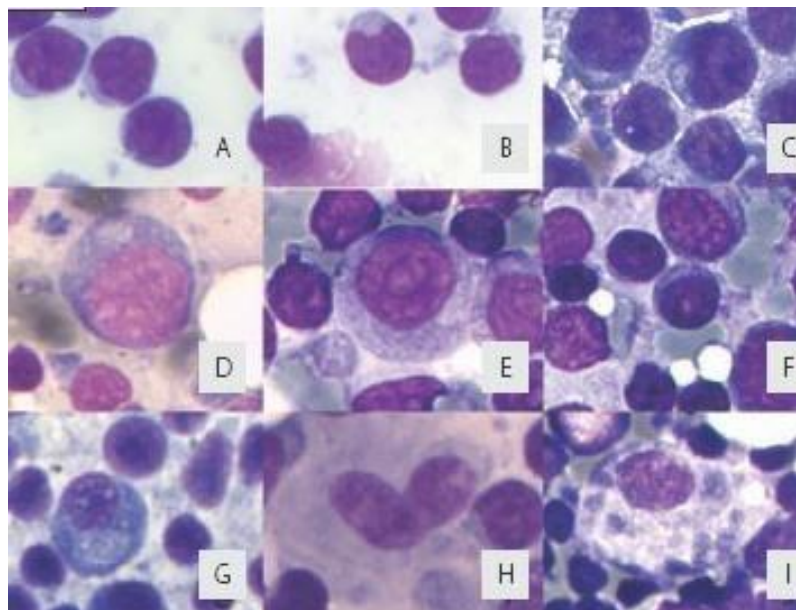


Figura 2. Tipos celulares possivelmente encontrados em um linfonodo sem alterações A- Pequeno linfócito; B- Centrócito; C- Linfoblasto; D-Centroblasto; E- Imunoblasto; F- Célula média macronucleolada G- Plasmócito; H-Célula Dendrítica APC; I- Macrófago (Comazzi e MaCneill, 2017).

Os centrócitos são células B foliculares, que possuem tamanho pequeno à médio, núcleos com diâmetros de 10 a 14 μm , núcleo clivado, com cromatina densa, nucléolo não proeminente e citoplasma claro em quantidade moderada (Comazzi e MaCneill, 2017).

Os centroblastos também são células B foliculares, porém possuem tamanho intermediário à grande, núcleos com 14 a 21 μm de diâmetro, redondos, discretamente excêntricos, com padrão de cromatina finamente pontilhado e nucléolos múltiplos proeminentes frequentemente localizados na periferia, além de citoplasma intensamente basofílico em quantidade moderada e com ocasionais vacuolizações (Comazzi e MaCneill, 2017).

Os imunoblastos são células B e T grandes, não sendo diferenciadas entre si pela morfologia. Possuem núcleos redondos com mais de 28 μm de diâmetro, apresentando padrão de cromatina finamente pontilhado, nucléolo único central proeminente e citoplasma abundante intensamente basofílico apresentando ocasionais vacúolos (Comazzi e MaCneill, 2017).

Os linfoblastos também são células B ou T indistinguíveis morfologicamente entre si, porém são pequenas, com diâmetro nuclear de 7 a 14 μm , apresentando margens irregulares, padrão de cromatina fino, nucléolo pouco evidente, e citoplasma escasso e claro (Comazzi e MaCneill, 2017).

As células médias macronucleoladas são células B da zona marginal, possuem núcleo redondo apresentando um diâmetro de 10 a 14 μm , nucléolo único central proeminente e citoplasma abundante intensamente basofílico (Fournel et al., 1995; Comazzi e MaCneill, 2017).

Os plasmócitos e as células *Mott* estão localizados nos cordões medulares. Os plasmócitos possuem um pequeno núcleo redondo excêntrico com cromatina condensada. Seu citoplasma intensamente basofílico possui um halo perinuclear claro, a zona de Golgi. As células *Mott*, são plasmócitos ativados, e além de um pequeno núcleo centralizado, possui em seu citoplasma grandes vacúolos chamados de corpúsculos de Russel (Blauvelt e Messick, 2020).

Os macrófagos são células grandes com citoplasma abundante e pálido, que contém detritos fagocitados e corpúsculos apoptóticos de linfócitos, já que durante os processos de diferenciação e proliferação celular, um grande número de linfócitos sofre apoptose. Seus núcleos são grandes e com um padrão de cromatina fino (Hollowood e Goodlad, 1998; Fry e McGavin, 2012; Valk e Meijer, 2012; Valli et al., 2016).

As APC's capturam o antígeno e apresentam às células B. Este tipo celular, é difícil de reconhecer em microscopia de luz, sendo melhor reconhecida por microscopia eletrônica e pela imunohistoquímica (Valk e Meijer, 2012).

2.3 Tipos de hiperplasia dos linfonodos

As principais causas de aumento dos linfonodos são a estimulação antigênica (linfonodo hiperplásico ou reativo), inflamação (linfadenites neutrofílica, macrófágica, histiocitose, granulomatosa, piogranulomatosa e eosinofílica), e neoplasia (primária ou metastática). Apesar destes processos, muitas vezes acontecerem simultaneamente, a avaliação citológica e histopatológica geralmente permite a diferenciação entre estas causas (Blauvelt e Messick, 2020).

A hiperplasia dos linfonodos é definida como um aumento regional ou generalizado deste órgão, por causa desconhecida ou inespecífica. A hiperplasia é uma reação reativa benigna, não neoplásica, à um estímulo imune, e pode envolver as regiões cortical, medular ou ambas. A hiperplasia cortical pode ocorrer tanto pelo aumento da concentração das células B localizadas nos folículos linfáticos, quanto pelo aumento das células T da região paracortical, sugerindo uma resposta humoral ou mediada por células, respectivamente (Valli et al., 2016).

Os tipos de hiperplasia são categorizados segundo a área de maior aumento tecidual do linfonodo. Esta forma de classificação é a mais utilizada e importante pois, através dela pode-se, na maioria dos casos, diferenciar os casos neoplásicos dos hiperplásicos. Os principais tipos de hiperplasia, segundo a área de proliferação tecidual são as hiperplasias folicular, paracortical, medular (plasmocitose/ mastocitose) e sinusal (histiocitose), podendo ser observadas de forma isolada ou em combinações (Ashton-Key et al. 2016; Fry e McGavin, 2012).

Histologicamente, os principais critérios para diferenciar a hiperplasia linfoide do linfoma são a preservação da arquitetura normal e a uniformidade dos tipos celulares e padrões de cromatina. Na arquitetura da hiperplasia, os seios medulares são preservados, enquanto no linfoma, o seio é tomado ou destruído pela neoplasia avançada. Uma das diferenciações mais difíceis é entre a hiperplasia folicular e o linfoma folicular e, nesses casos, a decisão deve-se basear nas mudanças da arquitetura e nas características celulares, de acordo com o histórico e sinais clínicos (Valli et al., 2016).

A hiperplasia folicular é, possivelmente, o tipo de reação mais observada no linfonodo. Esse tipo de hiperplasia é caracterizado pelo aumento dos folículos linfáticos secundários, com proeminentes centros germinativos. No entanto, a hiperplasia folicular é frequentemente

acompanhada de hiperplasia paracortical e plasmocitose nos cordões medulares (Ashton-Key et al., 2016).

A hiperplasia folicular geralmente é causada devido à desafios de antígenos que estimulam uma resposta das células B. Ela pode ocorrer em linfonodos regionais responsáveis pela drenagem de uma área inflamada ou pode envolver, nos casos de doenças sistêmicas, um grande número de linfonodos (Fry e McGavin, 2012; Ashton -Key et al., 2016).

Na inflamação aguda, a hiperplasia pode ser difusa, ocultando a arquitetura normal do linfonodo nos primeiros 10 dias. Após esse período, há o restabelecimento da arquitetura, com expansão dos folículos secundários por aumento dos centros germinativos, que apresentam numerosas figuras de mitose. Posteriormente, os precursores de plasmócitos gerados nos folículos podem migrar para os cordões medulares, onde se desenvolvem em plasmócitos secretores de anticorpos. Deste modo, a expansão folicular pode gerar uma atrofia do paracórtex e uma concomitante hiperplasia dos cordões medulares (plasmocitose). Após aproximadamente 10 dias, os folículos secundários podem apresentar um esgotamento de linfócitos e de células mitoticamente ativas. O resultado é um centro germinativo pálido, constituído principalmente por estroma e células precursoras. Duas semanas após o fim do estímulo antigênico, os cordões medulares originalmente constituídos de plasmócitos, também se esgotam (Valli et al., 2016; Frye McGavin, 2012).

A hiperplasia paracortical, constituída principalmente por linfócitos T, é raramente observada no exame histológico de rotina. Ela acomete principalmente os bovinos e suínos. Nestes casos, a presença de múltiplos nódulos paracorticais podem causar a atrofia dos folículos linfáticos do córtex superficial. Na hiperplasia paracortical, além dos pequenos linfócitos T, podem ser observados as FDC's e macrófagos (Fry e McGavin, 2012; Valli et al., 2016).

A hiperplasia dos plasmócitos (plasmocitose) geralmente ocorre em conjunto com a hiperplasia de células B, como acima descrito. Geralmente, em enfermidades que requerem uma resposta à estímulos antigênicos com produção de anticorpos, como na erliquiose, leptospirose e leishmaniose, sua presença é maior. No exame histopatológico, a ausência de células binucleadas, megacariocíticas e atípicas ajuda a diferenciar, junto com a ausência de invasão do córtex, a hiperplasia dos plasmócitos da neoplasia destas células (Valli et al., 2016). No exame citológico, o número de plasmócitos, pode variar de nenhum à mais de 5 a 10% em algumas áreas da lâmina. Se a concentração de plasmócitos for intensa, o plasmocitoma deve ser considerado

como um diagnóstico diferencial, considerando as mesmas alterações descritas na histologia, exceto a invasão cortical (Comazzi e MaCneill, 2017; Blauvelt e Messick, 2020).

A hiperplasia dos macrófagos é principalmente resultante da proliferação dessas células nos seios medulares, mas pode ocorrer por agregação celular em qualquer região do linfonodo, já que este tipo celular se encontra em todo o órgão, isto é, nas regiões cortical e medular (Valli et al., 2016). Na citologia, os macrófagos podem ocasionalmente representar mais de 2% da população, particularmente se há uma hiperplasia dos macrófagos nos seios medulares, isto é, uma hiperplasia sinusal (Blauvelt e Messick, 2020).

A histiocitose sinusal deve ser diferenciada de outras origens da hiperplasia de macrófagos. Nestes casos, deve-se analisar os locais que os linfonodos realizam a drenagem, e se estes possuem algum tipo de lesão que acarretaria na presença destes histiócitos. Na doença cutânea com descamação e lesão da pele, denominada linfadenopatia dermopática, por exemplo, além da hiperplasia de plasmócitos, pode ocorrer aumento de macrófagos, onde este tipo celular pode apresentar um pigmento marrom-preto (grânulos de melanina) fagocitados. Os eosinófilos, neutrófilos e mastócitos também podem estar presentes nestas situações (Valli et al., 2016; Comazzi e MaCneill, 2017).

Quando a agregação de macrófagos ocorre no parênquima, usualmente utiliza-se termos como “inflamação granulomatosa”, “linfadenite granulomatosa” e “infiltrado de macrófagos”, com o termo “granulomatoso” devendo ser utilizado apenas se houver evidências de macrófagos epitelioides (Valli et al., 2016).

2.4 Leishmaniose Canina

A leishmaniose é uma zoonose causada pelos protozoários flagelados *Leishmania* sp. Das zoonoses causadas por protozoários, a leishmaniose é possivelmente a segunda de maior importância no Brasil, depois da malária, e uma das seis endemias mais importantes no mundo. Nos cães, a *Leishmania* sp. pode causar doença cutânea, muco-cutânea e visceral (Lainson e Shaw 1978; Nelson e Couto, 2014).

A leishmaniose cutânea e muco-cutânea são doenças localizadas no sistema tegumentar e podem ser causadas por diferentes espécies *Leishmania* sp. (Nelson e Couto, 2014; Valli et al., 2016).

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica e é acometida por parasitos do complexo *Leishmania donovani*, que foram classificados em quatro espécies diferentes com base em eletroforese enzimática, sendo reconhecidas a *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* e *L.*

archibaldi. Morfologicamente, estas espécies são indistinguíveis. A *L. donovani* acomete apenas os humanos, e a *L. infantum* e a *L. chagasi* podem causar a Leishmaniose nos humanos e em cães (Michalick e Genaro, 2005; Lukes et al. 2007).

Os hospedeiros vertebrados da leishmaniose são principalmente os mamíferos, com alguns casos relatados em répteis (Lainson e Shaw, 1978). Os cães, no meio urbano, são os principais hospedeiros e responsáveis pela transmissão aos humanos. Embora outras formas de transmissão potenciais e hospedeiros reservatórios tenham sido identificados, a falta de estudos impede a compreensão da importância destes na transmissão da leishmaniose (Quinel e Courteny, 2009).

O primeiro caso de leishmaniose no Brasil foi em 1913, em Boa Esperança- MT (Alencar et al. 1991) e, atualmente, todas as regiões do Brasil são afetadas pela doença, exceto a região sul (BRASIL, 2006),

Os principais sinais clínicos da leishmaniose canina são a prostração, perda de peso, poliúria, polidipsia, vômitos, diarreia, epistaxe, inapetência, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, uveíte, petéquias, icterícia, febre e lesões dermatológicas variadas (Nelson e Couto, 2014).

O suspeita de LVC baseia-se nos sinais clínicos, exames laboratoriais, que podem apresentar anemia, linfopenia, leucocitose, trombocitopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, azotemia e aumento das atividades enzimáticas. O achado de formas amastigotas no exame citológico de linfonodos, medula óssea e lesões de pele, fornece um diagnóstico definitivo. A citologia de aspirados de linfonodo ou *imprint* de lesões cutâneas é o método mais rápido e prático para o diagnóstico da leishmaniose canina. O exame sorológico testando as concentrações de anticorpos podem ser realizados de diferentes formas como, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), teste de aglutinação direta, teste de aglutinação rápida e citometria de fluxo. Entretanto, a possibilidade de reação cruzada nestes testes com outras infecções por protozoários pode ocorrer. Exames moleculares de PCR também podem ser realizados em sangue total, medula óssea e amostras de linfonodos (Nelson e Couto, 2014; Travi et al., 2018).

A *Leishmania* sp. é um protozoário intracelular obrigatório e multiplica-se nas células do sistema monocítico-fagocitário. No organismo de vertebrados, a *Leishmania* sp. encontra-se na forma amastigota, sendo constituída por uma capsula ovalada a arredondada, apresentando 1,5-3,0 a 2,0-6,5 µm de tamanho, a depender da espécie. A estrutura interna da forma amastigota é constituída por um núcleo único e um cinetoplasto. Em corantes do tipo Romanovsky, a cápsula

exibe uma coloração discretamente basofílica, enquanto o núcleo e o cinetoplasto apresentam coloração policromatófílica-arroxeadas (Lainson e Shaw 1978; Michalick e Genaro, 2005).

Ao adentrar o organismo, as formas infectantes são fagocitadas por células do sistema monocítico-fagocitário. Nos macrófagos, estas são diferenciadas nas formas amastigotas, que se multiplicam e disseminam pela corrente sanguínea e linfática, infectando sistemicamente o hospedeiro. Os linfonodos, o baço e a medula óssea são os principais órgãos infectados (Ikeda-Garcia e Marcondes, 2007).

A prevenção e controle da leishmaniose é a melhor forma de evitar a proliferação da doença sendo que, exames diagnósticos na população canina de áreas endêmicas devem ser realizados sistematicamente afim de se identificar os cães positivos e realizar o seu tratamento. Já os cães negativos, devem ser vacinados. O uso de repelentes em diferentes formatos, como coleiras e produtos químicos, é a melhor forma de se evitar a contaminação, sendo estes utilizados diretamente nos animais ou no ambiente (Miró et al., 2017).

2.5 Alterações dos linfonodos de cães infectados pela LVC

A LVC é uma das principais causas de linfadenomegalia nos cães de regiões endêmicas, possivelmente devido ao acúmulo das células fagocíticas mononucleares neste órgão. Entretanto, existem poucos estudos acerca das alterações histopatológicas resultantes desta infecção (Tafari et al., 2000; Lima 2004; Xavier, 2006; Giunchetti et al. 2008; Nelson e Couto, 2014; Malla Mahahan 2006; Barros 2011).

Tafari et al. (2000), relataram um caso de leishmaniose canina assintomática na região de Belo Horizonte- MG, no qual observaram hiperplasia cortical e medular como a principal alteração do exame histológico dos linfonodos. Entretanto, outro relato de leishmaniose canina assintomática, também em Belo Horizonte- MG, realizado por Xavier et al. (2006), constatou que as regiões foliculares e medulares do linfonodo se apresentavam substituída pela presença de grande concentração de macrófagos.

Em um estudo com trinta cães de Belo Horizonte- MG, infectados por leishmaniose, Lima et al. (2004) observaram, no exame histológico dos linfonodos, inflamação crônica subcapsular em 91% dos casos, hiperplasia folicular em 82%, hiperplasia de macrófagos dos seios medulares em 100% e hiperplasia dos macrófagos dos cordões medulares em 98% dos casos, não observando diferença significativa dos achados histológicos com a condição assintomática (10 cães), oligossintomática (10 cães) e sintomática (10 cães). Sendo a principal característica

histológica dos linfonodos dos cães avaliados, a presença de macrófagos, independente da condição clínica do animal. As formas amastigotas foram observadas nos exames histológicos dos linfonodos em 58% dos casos.

Em outro estudo realizado na cidade de Belo Horizonte- MG, Alves et al. (2008) avaliaram 18 cães, sendo 6/18 livres de infecção por *Leishmania* sp., 6/18 infectados *Leishmania* sp. assintomáticos e 6/18 infectados *Leishmania* sp. sintomáticos. Os autores relataram a hipertrofia dos cordões e seios medulares como o principal achado do exame histológico dos linfonodos, com concentrações aumentadas principalmente de plasmócitos, além das células linfoides médias e grandes e macrófagos, sendo este achado presente tanto nos cães assintomáticos, quanto nos sintomáticos. Um achado menos observado, foi a linfadenite crônica de macrófagos nos seios medulares.

Já Giunchetti et al. (2008), apesar de também avaliar cães de Belo Horizonte- MG, relataram resultados diferentes dos estudos anteriormente mencionados. Segundo Giunchetti et al. (2008), que avaliou 34 cães, sendo 26 infectados com *Leishmania* sp., observou na avaliação histológica do córtex do linfonodo que, 50% dos cães assintomáticos apresentaram hipertrofia cortical moderada ou intensa, enquanto, ao contrário, 70% dos casos sintomáticos resultaram em atrofia cortical. Na região medular, todos os cães assintomáticos resultaram em hiperplasia moderada ou intensa desta região do linfonodo, com o mesmo achado sendo observado em 60% dos cães sintomáticos. Sendo esta hiperplasia medular principalmente plasmocitária. Os autores não observaram correlação entre a carga parasitológica dos linfonodos e a sintomatologia.

Diversos estudos, tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana, demonstraram a presença de concentrações intensas de plasmócitos nos cordões medulares possivelmente devido à ativação dos folículos linfáticos e consequente proliferação nos centros germinativos de células precursoras deste tipo celular, que migram para a região medular do linfonodo (Moreira et al., 2010; Barros 2011).

Não foi encontrado na literatura pesquisada, artigos científicos sobre as características dos linfonodos em exames citológicos. Não obstante, em capítulos de livros, Comazzi e MaCneill (2017) e, Blauvelt e Messick (2020) descrevem que na análise citológica de linfonodos infectados por *Leishmania* sp. são observados concentrações variáveis dos diferentes tipos celulares, ainda que haja um predomínio de pequenos linfócitos. A presença de concentrações discretamente aumentadas de linfócitos médios e plasmócitos é geralmente a característica de maior relevância.

A presença de macrófagos apresentando ou não figuras de fagocitose de formas amastigotas de *Leishmania* sp., pode ocorrer em concentrações variáveis.

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo obter através da citologia de linfonodos infectados por *Leishmania* sp., as possíveis alterações nas concentrações dos tipos celulares causados por este patógeno afim de elucidar e avaliar a possibilidade de diagnosticar os diferentes tipos de hiperplasia linfoides por meio do exame citológico do linfonodo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo de 50 amostras citológicas de linfonodos de animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFGM), e diagnosticados com Leishmaniose Visceral Canina (LVC), no período compreendido entre janeiro de 2016 a janeiro de 2020. As amostras foram selecionadas aleatoriamente, dentro daquelas que atenderam os requisitos de inclusão, até atingir a quantidade de 50 amostras.

Os critérios de inclusão utilizados foram amostras citológicas de linfonodos superficiais, coletadas a partir da técnica de punção por agulha fina (PAAF/ PAF), apresentando mais de 80% de células íntegras e presença de uma ou mais formas amastigotas de *Leishmania* sp.

3.1 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada no Módulo de Gestão Veterinária utilizado pelo HV-UFGM. As fichas de atendimento, selecionadas a partir do levantamento baseado nos critérios de inclusão deste estudo, foram acessadas e informações acerca dos sinais clínicos, raça, idade, exames sorológicos e hemograma dos animais foram coletados e tabelados. Estes dados encontram-se nos anexos.

3.2 Classificação dos sinais clínicos e raça

Os sinais clínicos foram separados em diferentes grupos, de acordo com a sua localização e origem. A presença de apatia, prostração, anorexia e perda de peso foi classificada como emagrecimento/prostração. Pacientes apresentando vômitos, diarreia e alteração na consistência das fezes, foram classificados como apresentando alterações no trato gastrointestinal. Cães com qualquer sintomatologia do sistema tegumentar como dermatite, seborreia seca/oleosa, onicogribose e descamação da pele foram classificados no grupo de alterações dermatológicas. Cães com lesões oculares diversas foram incluídos no grupo de alterações oftalmológicas. Os

pacientes apresentando epistaxe e/ou secreção nasal, foram inseridos no grupo de alterações do trato respiratório e cães apresentando sinais de incontinência, poliúria/ polidipsia foram classificados no grupo de alterações do trato urinário.

3.3 Exames sorológicos

Dos 50 cães selecionados para este estudo, 76,0% (38/50) realizaram os seguintes exames sorológicos; reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). No RIFI, o ponto de corte situa-se no título igual a 1:40 e, no ELISA, a partir da densidade óptica média acrescida de três desvios-padrões de um grupo controle negativo (BRASIL, 2006). Nos demais 24,0% (12/50) o diagnóstico foi exclusivamente obtido no exame citológico.

3.4 Hemograma completo

Dos 50 casos selecionados para este estudo, em 88,0% (44/50) foi realizado o hemograma. Os valores de referência para a análise do hemograma foram os propostos por Jain (1993).

3.5 Avaliação citológica

As lâminas obtidas pela técnica de PAF/PAAF foram resgatadas do laminário do Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG. Foram selecionadas as lâminas com mais de 80% de células íntegras, e com presença de uma ou mais formas amastigotas de *Leishmania* sp. Estas, foram avaliadas utilizando o microscópio Nikon E200 biocular no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFMG.

Foi realizado um diferencial celular de 1.000 células em cada amostra citológica selecionada. Foram identificados os tipos celulares seguindo os critérios morfológicos descritos por Commazi e MacNeill (2017), apresentados no quadro 1 deste estudo. A concentração de formas amastigotas de *Leishmania* sp. foi classificada segundo Stauber (1955) em *Leishmania Donovan* Units (LDU) como LDU baixo (1-2 amastigotas/1.000 células nucleadas), LDU médio (3-24 amastigotas/1.000 células nucleadas) e LDU alto (25-616 amastigotas/1.000 células nucleadas).

3.6 Análise estatística

No presente estudo foi realizada análise estatística do tipo paramétrica, utilizando a correlação de Pearson. Foi considerado correlação significativa quando o valor $p < 0,05$. A partir deste último, foi analisado o valor r para análise da força de correlação. Quando $r < 0,3$, a correlação

foi considerada fraca, $r=0,3$ a $0,7$ correlação moderada e $r>0,7$ correlação forte. A análise estatística de todos os dados encontra-se no anexo.

Quadro 1. Tipos celulares presentes no linfonodo canino, com suas respectivas descrições morfológicas e valores de referência (VR)*.

Tipo celular	Morfologia celular e concentração
Pequenos Linfócitos	Diâmetro nuclear de 7 a 10 μm , cromatina nuclear condensada sem visualização de nucléolos e citoplasma escasso moderadamente basofílico. (VR>80%)
Centrócitos	Diâmetro nuclear de 10 a 14 μm , núcleo clivado, cromatina nuclear condensada sem visualização de nucléolos e discreta concentração de citoplasma moderadamente basofílico. (VR= 5 a 10%)
Centroblastos	Diâmetro nuclear de 14–21 μm ; núcleos arredondados excêntricos; cromatina nuclear fina, nucléolos múltiplos frequentemente periféricos e concentração moderada de citoplasma intensamente basofílico ocasionalmente apresentando vacúolos. (VR= 1 a 5%)
Imunoblastos	Diâmetro nuclear igual ou maior que 28 μm ; núcleo arredondado com cromatina fina, nucléolo único proeminente e citoplasma abundante intensamente basofílico ocasionalmente apresentando vacúolos. (VR= 1 a 5%)
Linfoblastos	Diâmetro nuclear de 7–14 μm ; núcleo irregular apresentando cromatina fina nucléolos podendo ou não estar visíveis e citoplasma escasso e discretamente basofílico. (VR<1%)
Células Médias Macronucleoladas	Diâmetro nuclear de 10–14 μm ; núcleos redondos, nucléolo único central e citoplasma abundante e intensamente basofílico. (VR <1%)
Plasmócitos	Diâmetro nuclear de 7–14 μm ; halo perinuclear visível, núcleo redondo com cromatina condensada e citoplasma intensamente basofílico. (VR<2%)
Células Mott	Plasmócitos apresentando concentração intensa de vacúolos citoplasmáticos (corpúsculos de Russell). (VR<1%)
Macrófagos	Células ovaladas a alongadas apresentando pleomorfismo moderado de forma e tamanho, frequentemente apresentando figuras de fagocitose e citoplasma discreto a moderadamente basofílico. (VR<2%)
Células inflamatórias	Neutrófilos (VR <5%), eosinófilos (VR<3%) e mastócitos (VR<3%).

* Adaptado pela autora com dados extraídos de Comazzi e Macneill (2017).

4. RESULTADOS

A idade média dos cães avaliados foi de 4,2 anos, com idade mínima de 3 meses e máxima de 14 anos. Na distribuição racial foram observados animais sem raça definida (SRD) (38,0%), Rotweiller (8,0%), Pug (8,0%), Sharpei (4,0%), Schnauzer (4,0%), Labrador (4,0%), Fox Paulistinha (4,0%) e mais 15 raças (30,0%). Não foi observada nenhuma correlação significativa entre a idade e a raça com as demais variáveis estudadas.

Tabela 1 Sinais clínicos mais frequentemente relatados em 50 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC), de acordo com a ficha clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os casos foram selecionados para a avaliação citológica dos linfonodos

SINAIS CLÍNICOS	PRESENÇA	AUSÊNCIA
Emagrecimento/ prostração	54%	46%
Alterações dermatológicas	52%	48%
Sinais do trato gastrointestinal	22%	68%
Sinais do trato urinário	16%	44%
Sinais do trato respiratório	8%	92%
Alterações oftalmológicas	6%	94%

As alterações clínicas mais frequentemente relatadas no estudo foram emagrecimento/ prostração (54,0%) e alterações dermatológicas (52,0%) (tabela 1). Além destas, foram observadas alterações gastrointestinais (22,0%), alterações dos tratos urinário (16,0%), respiratório (8,0%) e alterações oftalmológicas (6,0%).

Tabela 2 Resultados do exames sorológicos de 38 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC), atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e selecionados para a avaliação citológica do(s) linfonodo(s).

RESULTADO	ELISA	RIFI	ELISA +RIFI
Reagente	84,2% (31/38)	89,5% (34/38)	84,2% (32/38)
Não reagente	7,9% (4/38)	10,5% (4/38)	5,3% (2/38)
Indeterminado	7,9% (3/38)	0,0% (0/38)	-
Divergentes	-	-	10,5% (5/38)

Dos exames sorológicos realizados, o ELISA obteve em 84,2; 7,9 e 7,9% dos casos, resultados reagente, não reagente e indeterminado, respectivamente. No RIFI; 89,5 e 10,5% dos casos resultaram em reagente e não reagente, respectivamente (tabela 2).

Nos 31 casos ELISA reagente, o RIFI também foi realizado e apresentou resultados positivos em 100% destes casos. Entretanto, dos 34 casos RIFI reagente, em 5,9% (2/34) o ELISA foi não reagente e em 2,9% (1/34), indeterminado.

Quatro casos resultaram em ELISA não reagente, sendo que em 50,0% (2/4) o RIFI foi reagente, com diluições de 1:40 e 1:80, e em 50,0% (2/4) o RIFI foi não reagente.

Quatro casos resultaram em RIFI não reagente. Destes, em 50,0% (2/4) o ELISA também foi não reagente e em 50,0% (2/4) indeterminado. Nos três casos ELISA indeterminado, 33,3% (1/3) apresentaram o RIFI reagente, com diluição de 1:160, e 66,7% (2/3) não reagente.

Tabela 3 Concentração de formas amastigotas de *Leishmania* sp., quantificadas em (LDU) de 50 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

	LDU		
	Baixo	Médio	Alto
Casos	28,2% (14/50)	20,5% (10/50)	51,3% (26/50)

O LDU quantificado nas amostras citológicas resultou em classificação baixa, média ou alta em 28,2; 20,5 e 51,3% das amostras, respectivamente (tabela 3).

Tabela 4 Concentração de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em citologia de linfonodo, quantificadas em LDU, e sua correlação com o resultado do exame sorológico ELISA de 38 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

ELISA	LDU		
	BAIXO	MÉDIO	ALTO
Reagente	22,6% (7/31)	19,3% (6/31)	58,1% (18/31)
Não reagente	50,0% (2/4)	25,0% (1/4)	25,0% (1/4)
Indeterminado	75,0% (2/3)	25,0% (1/3)	0,0% (0/3)

Na associação dos resultados do ELISA e LDU, das amostras reagentes no ELISA; 22,6; 19,3 e 58,1% resultaram em LDU baixo, médio e alto, respectivamente. Nas amostras não reagentes, os respectivos valores foram de 50,0; 25,0 e 25,0%, enquanto nas amostras indeterminadas foram de 75,0; 25,0 e 25,0% (tabela 4).

Tabela 5 Valores médios (desvio padrão), mínimos e máximos e porcentagem de amostras abaixo e acima dos valores de referência para a espécie (V.R.*), das concentrações dos tipos celulares observados na citologia de linfonodos de 50 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Tipo Celular	V.R. (%)	Média (DP) (%)	Valor Mínimo (%)	Valor Máximo (%)	Abaixo do V.R.* (%)	Acima do V.R.* (%)
Pequenos Linfócitos	>80	74,0 (±14,6)	28,8	98,0	64,0	-
Centrócitos	5-10	11,8 (±14,3)	0,2	31,3	16,0	54,0
Centroblastos	1-5	0,8 (±1,4)	0,0	8,8	66,0	2,0
Imunoblastos	1-5	0,2 (±0,6)	0,0	3,1	96,0	0,0
Linfoblastos	<1	0,2 (±0,3)	0,0	3,1	-	4,0
Células Médias Macronucleoladas	<1	1,0 (±1,4)	0,0	7,6	-	34,0
Plasmócitos	<2	7,1 (±7,7)	0,0	37,8	-	72,0
Células Mott	<1	0,2 (±0,4)	0,0	2,2	-	8,0
Macrófagos	<2	1,1 (±1,2)	0,0	6,0	-	26,0
Neutrófilos	<5	3,2 (±2,9)	0,0	14,7	-	20,0
Eosinófilos	<3	0,5 (±1,2)	0,0	6,0	-	6,0

*Commazzi e MacNeill (2017)

Na distribuição dos tipos celulares do linfonodo, o pequeno linfócito, que é o tipo celular predominante em linfonodos normais, apresentou valor médio de 74,0%, isto é, abaixo dos valores de referência (V.R.) da espécie (>80%), com 64% das amostras apresentando concentrações abaixo dos V.R. (tabela 5).

Dos principais tipos celulares linfoides observados no centro germinativo dos folículos linfáticos (C.G.), a média da concentração de centrócitos, de 11,8%, esteve acima dos V.R. (5-10%), com mais da metade das amostras (54,0%) resultando em concentração acima dos V.R., enquanto as concentrações médias de centroblastos (0,8%) e imunoblastos (0,2%) apresentaram valores médios abaixo dos V.R. (1-5%), com 66,0 e 96,0% das amostras abaixo dos V.R., respectivamente (tabela 5). Já a célula média macronucleolada, o tipo celular predominante na zona marginal do folículo linfático, resultou em um valor médio (1,0%) discretamente acima dos V.R. (<1%), com aproximadamente 1/3 das amostras (34,0%) acima dos V.R. O linfoblasto, que pode ser T ou B, foi observado em pequena proporção (0,2%), estando acima dos V.R. em apenas duas amostras (4,0%).

Já nos tipos celulares observados principalmente na região medular do linfonodo, apenas os plasmócitos resultaram em concentração média (7,1%) acima dos V.R. (>2%), com quase 3/4 das amostras (72,0%) acima dos V.R. As células Mott resultaram em 8,0% dos casos acima dos V.R. (tabela 5).

Os macrófagos, apresentaram concentrações acima dos V.R. em 26,0% dos casos. Os neutrófilos resultaram em 20,0% e o eosinófilos em 6,0%, das amostras acima dos V.R. (Tabela 5).

Na análise estatística, foi observada uma correlação moderada entre a concentração de centroblastos e de imunoblastos ($r=0,538$), e de centroblastos e plasmócitos ($r=0,552$). De modo semelhante, observou-se uma correlação moderada entre as concentrações de macrófagos e neutrófilos ($r = 0,364$).

Tabela 6 Regiões possivelmente hiperplásicas do linfonodo de acordo com as concentrações aumentadas dos tipos celulares observados na análise citológica de 50 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Região com aumento da concentração celular	Tipos Celulares Aumentados	Proporção (%)
Sem Alteração	Nenhum tipo celular aumentado	6,0
Folículos linfóides	Centrócitos e/ou Centroblastos e/ou Células Médias Macronucleoladas	14,0
Cordões medulares	Plasmócitos e/ou Eosinófilos e/ou Célis Mott	24,0
Macrófagos	Macrófagos	4,0
Folículos linfóides e Cordões medulares	Centrócitos e/ou Centroblastos e/ou Células Médias Macronucleoladas e Plasmócitos e/ou Eosinófilos e/ou Célis Mott	28,0
Folículos linfóides e Macrófagos	Centrócitos e/ou Centroblastos e/ou Células Médias Macronucleoladas e Macrófagos	4,0
Cordões medulares e Macrófagos	Plasmócitos e/ou Eosinófilos e/ou Célis Mott e Macrófagos	4,0
Folículos linfóides, Cordões medulares e Macrófagos	Centrócitos e/ou Centroblastos e Células Médias Macronucleoladas e Plasmócitos e/ou Eosinófilos e/ou Célis Mott e Macrófagos	16,0

Na classificação citológica dos linfonodos, apesar da forma amastigota de *Leishmania* sp. estar presente em todas as amostras; 6,0% destas (3/50), resultaram em concentrações celulares linfóides sem aumento. Uma destas, apresentou concentrações acima dos V.R. de neutrófilos. Nos linfonodos que apresentaram aumento da concentração de ao menos um tipo celular, a hiperplasia ocorreu nas regiões cortical, medular e cortical/medular em 14,0; 24,0 e 44,0% das amostras, respectivamente (Tabela 6).

Nas amostras com aumento da concentração das células da área cortical, 14,0%, foi restrito às células dos folículos linfóides. Nas amostras com aumento da concentração das células medulares, em 24,0% este foi restrito aos cordões medulares. Os macrófagos, que podem estar presentes em todas regiões do linfonodo, teve sua concentração aumentada individualmente em apenas 4,0% dos casos (Tabela 6).

Nas amostras com aumento concomitante da concentração das células corticais e medulares, em 28,0% dos casos, este aumento foi observado, nos folículos e cordões medulares em conjunto, e em 16,0% dos casos, foi observado aumento dos tipos celulares dos folículos, cordões medulares e macrófagos. (Tabela 6).

Além do diferencial celular, foi observada a presença de figuras de mitose em 38% das amostras. A presença de figuras de mitose apresentou correlação estatística com a concentração de centroblastos ($r = 0,534$) e macrófagos ($r = 0,453$).

No hemograma de 44 animais, 79,5% (35/44) apresentaram anemia. Sendo 28,6% (10/35) anemia discreta; 57,2% (20/35) anemia moderada e 14,3% (5/35) anemia intensa. Em 13,6% dos casos, observou-se leucopenia, em 6,8% leucocitose e em 47,7% trombocitopenia.

Tabela 7 Concentrações dos tipos celulares observados na citologia de linfonodos e sua correlação com presença/ausência de sinais clínicos de 50 cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) e realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Variável	Resultado	Células foliculares Aumentadas	Células foliculares diminuídas	Plasmocitose	Histiocitose
Emagrecimento/ prostração	Ausente	40,6%	62,5%	44,4%	53,8%
	Presente	59,4%	37,5%	55,6%	46,2%
Alterações dermatológicas	Ausente	40,6%	50,0%	50,0%	38,5%
	Presente	59,4%	50,0%	50,0%	61,5%
Anemia	Discreta	18,6%	25,0%	27,3%	27,2%
	Moderada	51,8%	37,5%	51,5%	45,5%
	Intensa	14,8%	12,5%	3,0%	18,2%
Normocitemia	-	14,8%	25,0%	18,2%	9,1%
LDU	Baixo	21,9%	37,5%	16,7%	0,0%
	Médio	18,7%	25,0%	16,7%	15,4%
	Alto	59,4%	37,5%	66,6%	84,7%

Nos casos com aumento da concentração de células foliculares, assim como nos casos com plasmocitose, houve predomínio de animais apresentando emagrecimento/ prostração, que foi de 59,4 e 55,6% dos casos, respectivamente (tabela 7). Já nos casos com concentração diminuída das células foliculares e histiocitose, houve um predomínio de animais sem apresentar esta sintomatologia, de 62,5 e 53,8%, respectivamente.

Nos casos com as alterações celulares descritas na tabela 7, a presença de alterações dermatológicas foi observada em 50,0 e 61,5% dos cães, da mesma forma que a anemia moderada foi o grau de anemia mais frequentemente observada, variando de 37,5 a 51,8%.

Nos casos com concentração aumentada de células foliculares, plasmocitose e histiocitose, o LDU alto foi predominante, variando de 59,4 a 84,7% (tabela 7). Já nos casos com concentração diminuída de células foliculares o LDU baixo foi predominante (37,5%)

5. DISCUSSÃO

Segundo Galego-Solano et al. (2009), o diagnóstico da leishmaniose canina muitas vezes precisa ser realizado de forma integrada entre os diferentes métodos diagnósticos, uma vez que não existe um exame que seja ao mesmo tempo 100% sensível e 100% específico.

No presente estudo, quatro casos apresentaram resultados não reagente no ELISA, sendo que, destes, dois apresentaram diluições no RIFI baixas (1:40/ 1:80) e dois apresentaram RIFI não reagente (<1:40). Segundo Fonseca (2013), após um curto período do início da infecção pela *Leishmania* sp., não é possível detectar níveis de anticorpos superiores ao ponto de corte dos exames sorológicos, sendo esta uma possível justificativa para os resultados obtidos nos exames sorológicos do presente estudo.

O método de pesquisa direta (parasitológico) é citado como um método padrão ouro no diagnóstico da *Leishmania* sp. já que fornece um resultado definitivo (Laurenti, 2009; Rodrigues et al., 2013). Não foi possível diferenciar no presente estudo a sensibilidade e especificidade da pesquisa direta de *Leishmania* sp., devido à ausência de casos falso negativos nas amostras analisadas. Entretanto, apenas 28,2% dos casos avaliados apresentaram carga parasitária baixa (LDU baixo), com a maioria dos animais apresentando concentrações de amastigotas moderadas e altas (71,8%), o que permite um diagnóstico rápido e apurado.

O predomínio de pequenos linfócitos observado no presente estudo (74,0%), foi descrito por Comazzi e MaCneill (2017) e Blauvelt e Messick (2020) como padrão nas avaliações citológicas do linfonodo de cães infectados por *Leishmania* sp. Apesar de predominantes, a concentração média de pequenos linfócitos esteve abaixo do limite inferior (80%) descrito por Comazzi e MaCneill (2017) para cães saudáveis, sendo que quase 2/3 dos casos (64,0%) apresentaram esta característica citológica. A diminuição na proporção de pequenos linfócitos pode ser atribuída ao aumento da concentração dos outros tipos celulares do linfonodo, que ocorreram de diversos modos, isto é, com aumento dos tipos celulares corticais e/ou medulares. Nos três casos apresentando concentrações celulares sem aumento (6,0%), um deles apresentou concentração acima dos V.R. de neutrófilos. Neste caso não foi possível verificar a causa do

aumento da concentração, isto é, linfadenite neutrofílica ou contaminação do sangue periférico na amostra.

A literatura científica a respeito dos achados histológicos de linfonodos de cães portadores de *Leishmania* sp. é escassa, e os seus resultados são controversos (Tafari et al., 2000; Lima et al. 2004; Xavier et al., 2006; Alves et al., 2008; Giunchetti et al. 2008). Enquanto Lima et al. (2004) relataram a hiperplasia de macrófagos nos seios subcapsulares, medulares e cordões medulares como o principal achado e a presença de hiperplasia cortical em 82% dos casos; Alves et al. (2008) relataram como principal achado a hiperplasia medular causada por plasmocitose, histiocitose e aumento da concentração de células linfoides médias e grandes. Tanto Lima et al. (2004), quanto Alves et al. (2008), não observaram diferença estatística entre os achados histológicos dos linfonodos de cães sintomáticos e assintomáticos.

Já Giunchetti et al. (2008), relataram padrões histológicos diferentes para os linfonodos de cães sintomáticos e assintomáticos, particularmente na região cortical, onde os cães assintomáticos tendem a apresentar hiperplasia folicular e os cães sintomáticos atrofia folicular. Na região medular, os cães sintomáticos e assintomáticos apresentaram tendência à plasmocitose.

No presente estudo, a possível hiperplasia dos cordões medulares, representada basicamente por plasmocitose, foi observada em 72% dos casos, sendo que, nestes casos; 55,6% dos animais apresentavam emagrecimento/ prostração e 50,0% apresentavam alterações dermatológicas. Estes achados, são semelhantes aos observados por Alves et al. (2008) e Giunchetti et al. (2008), que descreveram a plasmocitose como o achado mais frequentemente observado na histologia, tanto nos casos sintomáticos, quanto nos assintomáticos.

Entretanto, a frequência de plasmocitose observada no presente estudo não foi observada por Lima et al. (2004), que relataram a histiocitose como o principal achado histológico. No presente estudo, a histiocitose foi observada em 26,0% dos casos, sendo que, de forma isolada, isto é, sem aumento concomitante das concentrações dos tipos celulares foliculares e dos cordões, em apenas 4,0% do total de casos ou 15,4% dos casos de histiocitose.

No presente estudo foi observado LDU alto em 84,2% dos casos com histiocitose, enquanto a mesma faixa de LDU foi observada em 59,4 e 66,6% dos casos com hiperplasia dos tipos celulares foliculares e plasmocitose, respectivamente, e em apenas 37,5% dos casos com diminuição dos tipos celulares foliculares. Não encontramos justificativa para esta variação, mesmo porque, Giunchetti et al. (2008) não observaram associação da LDU com a

sintomatologia, embora tenham observado diferença entre a condição cortical e a sintomatologia. Não obstante, acreditamos que este achado deva ser estudado com uma casuística maior.

Quanto a variação dos tipos celulares foliculares, concentrações aumentadas de centrócitos e/ou centroblastos foram observadas na maioria das amostras (62,0%), sendo que em 14,0% de forma isolada e em 48,0% associada a hiperplasia das células dos cordões medulares e/ou histiocitose. Este resultado está de acordo ao de Lima et al. (2004), que relataram hiperplasia folicular em 82,0% dos linfonodos dos cães com leishmaniose.

Ademais, no presente estudo, nos casos com hiperplasia das células foliculares, 59,4% apresentaram emagrecimento/ prostração, enquanto 37,5% dos casos com diminuição dos tipos celulares foliculares apresentaram esta alteração clínica; sendo este, distinto do relatado por Giunchetti et al. (2008), que observaram predomínio de hiperplasia e atrofia folicular nos casos assintomáticos e sintomáticos, respectivamente. Não encontramos justificativa para esta discrepância nos resultados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar a possibilidade de associar os resultados dos exames citológicos e histológicos do linfonodo, já que é um tema que, apesar de pouco explorado na Medicina Veterinária, vem ganhando notoriedade, principalmente na citologia oncológica.

Apesar da literatura sobre as características histológicas dos linfonodos de cães portadores de leishmaniose ser escassa, os achados citológicos do presente estudo, com hiperplasia em 72,0; 56,0 e 26,0% dos tipos celulares dos cordões medulares, folículos linfáticos e histiócitos, respectivamente, apresentou pontos de concordância e divergência com os trabalhos existentes que, entre si, já apresentam resultados conflitantes. Com isto, ficou clara a necessidade da comparação entre os mesmos casos na análise citológica e histológica, para que nosso objetivo seja alcançado. Não obstante, acreditamos que este foi um passo significativo para novas pesquisas sobre o tema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, J.E. e DIETZE, R. *Leishmaniose visceral (calazar)*. In: VERONESI, R.: Doenças infecciosas e parasitárias, 1991.
- ALVES, C.F.; AMORIM, I.F.G; MOURA E.P.; RIBEIRO, R.R; ALVES, F.C., MICHALIK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L, TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. *Expression of IFN, TNF, IL-10 and TGF in lymph nodes associate with Leishmania chagasi*. Veterinary Immunology and Immunopathology , 2009, p. 349–358.
- ARPIN, C.; DECHANET, J.; KOOTEN, C.V.,; MERVILLE,P.; GROUARD, G; BRIERE,F; BANCHEREAU, J; LIU, Y.L. *Generation of memory B cells and plasma cells in vitro*. Science, 1995, v. 268, p. 720-722.
- ASHTON-KEY, M.; WRIGHT, P.; WRIGHT, D. *Diagnostic Lymph Node Pathology*. 3ed. London, CRC Press, 2016.
- BARROS, R.M. *Caracterização Histopatológica da Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal*. (Dissertação de Mestrado), Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 103p.
- BLAUVELT, C.M. E. MESSICK, J.B. IN: COWELL, R.L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H. *Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos*. São Paulo, Med. Vet. 5ed., 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília. 2006.
- COMAZZI, S.; MACNEILL, A.L. Cytology of lymphoid tissues. In: BARGER, A.M.; MACNEILL,A.L. *Small animal cytologic diagnosis*. 1. ed. New York: CRC Press, 2017. p. 522-601.
- FONSECA, A.M. *Diagnóstico de leishmaniose visceral utilizando proteínas de leishmania infantum com função desconhecida* .– Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. (Dissertação Mestrado), 2013.
- FOURNEL, J. P. MAGNOL, T. MARCHAL, L. CHABANNE, P. A. BRYON T. E. P. FELMAN, T. *An Original Perifollicular Zone Cell in the Canine Reactive Lymph Node: a Morphological, Phenotypical and Aetiological Study*. J. Comp. Path., 1995.
- FRY, M.M.; E McGAVIN, M.D. *Pathologic basis of veterinary disease*, 5ed, Penny rudolph: missouri, 2012. p.742-770.
- GIUNCHETTI RC, MARTINS-FILHO O., CARNEIRO C.M., MAYRINK W, MARQUES M.J., TAFURI, W.L., *Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis*. Vet Immunol Immunopathol 2008, v.121, p. 23-33.

HOLLOWOOD, K.; GOODLAD, J.R. *Germinal Centre Cell Kinetics*. Journal of pathology. 1998, v. 185, p. 229–233.

IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, M. *Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina*. Clínica Veterinária, São Paulo, 2007, n. 71, p.34-42.

JAIN, N. C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.

JUNQUEIRA L.C.; E CARNEIRO, J. *Histologia básica*, 12ed. Guanabara Koogan Ltda: Rio de Janeiro, 2013, p. 520-526.

KONIG e LIEBICH, *Texto e Atlas da Anatomia dos Animais Domésticos*, 2016.

LAINSON R, SHAW J.J. *Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America*. Nature, 1978; v.273, p. 595—600.

LAURENTI, M. D. *Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina*. Boletim Epidemiológico Paulista, v.6, n.67, p.13-23, 2009.

LIMA, W.G.; MICHALICKB, M. S. M.; MELOB M.N, TAFURIA, L.W, TAFURIA,W.L *Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes*. Acta Tropica, v.92 , 2004, p.43–53.

LUKES, J. MAURICIO, I.L.; DUJARDIN, J.C.; SOTERIADOU, K; DEDET,J. P.; KUHL, K. WILBER ,K; TINTAYA, Q.; JIRKU, M, CHOCHOLOVA, E; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNIK, M. *Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy*, PNAS, 2007, v. 104, n. 22 p. 9375–9380.

MALLA, N.; MAHAJAN, R C. *Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts*. Indian Journal of Medical Research; New Delhi, 2006, v. 123, ed. 3, p. 267.

MICHALICK, M.S.M., GENARO, O. *Leishmaniose visceral americana*. In: Neves, D.P. (ed.). Parasitologia humana. 11. ed. São Paulo: Atheneu; 2005, p. 56 - 72.

MIRO, G; PETERSEN, C., CARDOSO, L., BOURDEAU, P., BANETH, G., SOLANO-GALLEGO, L, PENNISI, M.G., FERRER, L, OLIVA, G. *Novel areas for preventions and control for canine leishmaniosis*. Trends in parasitology, september 2017, v. 33, n. 9

MOREIRA, P.R.R., VIEIRA, L.M., DE ANDRADE, M.M.C. *Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis*. Parasitol Res, 2010, v. 107, p. 605–613.

NELSON, R. W.; COUTO, G. *Small animal internal medicine*, 5 ed. St. Louis: Elsevier Inc., 2014.

PAWLINA, J.W.; Ross, M.H. | *Histologia Texto e Atlas – Correlações com Biologia Celular e Molecular*, 7ª ed. Minnesota, 2011.

PRESS C.M.L. e LANDVERK, T.. *Immune system*. In: Eurell, J.A.; FRAPPIRER, B.L. Dellman's textbook of veterinary histology. Blackwell Publishing, p.134- 152, 2006.

QUINNELL, RJ AND COURTENAY, O. *Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis*. *Parasitology* 2009, p. 1915 - 1934

RODRIGUES, R. D.; SOUZA, R. R.; GOMES, L. R.; SILVA JÚNIOR, L. M.; SILVA, A.L. D. A.; MEDEIROS, A. A. *Leishmaniose visceral canina – diagnóstico parasitológico: relato de caso*. *Vet. Not. Uberlândia*, 2013, v.19, n. 1, p. 1-6.

SCHIMMING, B.C. *Leishmaniose visceral canina – Revisão de literatura*. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 2012.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; *Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, 2009, v. 165, n.1-2, p.1–18..

STAUBER, L.A. *Resistance to the Khartoum strain of Leishmania donovani*. *Rice Inst. Pamphlet*. 1956, p. 80-96.

TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N.; *Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil*. *Veterinary Parasitology*, 2000 p. 203–212

TIZARD, I.A. *Imunologia veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

TRAVI, B.L.; SILVA, A.C.; TORRES, F.D.; MIRO, G. *Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2018.

VALK, P.V.D E MEIJER, C.J.L.M. *Histology for pathologists* 4ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2012.

VALLI, V. E; BIENZLE, D; MEUTEN, D.J. *Tumors of the Hemolymphatic, in: System Tumors in Domestic Animals*, 5 ed. USA: John Wiley & Sons, Inc. , 2016.

VON ANDRIAN, U.H.; MEMPEL, T.R. *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. *Nature reviews, Immunology*, v.3, 2003.

WILLARD-MACK, C. L.. *Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes*. *Toxicologic Pathology*, 2006, v. 34, n. 5, p.409–424.

XAVIER,S.C; CHIARELLI, I.M.; LIMA, WG; GONÇALVES, R; TAFURI, W.L. *Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.* Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2006, v.58, n.6, p.994-1000.

ZANETTE, M. F. *Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.* 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006. 92f.

ANEXOS

Anexo 1- Sinais clínicos, histórico e raça de cães positivos para Leishmaniose Visceral Canina atendidos no Hospital Veterinário UFMG.

Paciente	Raça	Sinais clínicos/histórico
Animal 01	Srd	Fezes pastosas, alopecia perianal, obesidade
Animal 02	Rotweiler	Emagrecimento progressivo, linfadenomegalia generalizada
Animal 03	Cane corso	Inapetência, linfonodo poplíteo e cervical aumentados
Animal 04	Pug	Linfadenomegalia generalizada e feridas cutâneas
Animal 05	Srd	Lesões no nariz, secreção ocular, emagrecimento, linfadenomegalia generalizada
Animal 06	Srd	Sangramento nasal, linfonodos cervicais e poplíteos aumentados.
Animal 07	Labrador	Linfonodos aumentados, descamação, seborréia seca
Animal 08	Sharpei	Tumor na córnea, azotêmico crônico, incontinente
Animal 09	Bull terrier	Linfadenomegalia, lesões de pele com alopecia e hiperqueratose
Animal 10	Srd	Prostração, linfonodo cervical superficial discretamente aumentado, desidratação.
Animal 11	Srd	Linfadenomegalia, emagrecimento progressivo, claudicação
Animal 12	Doberman	Emagrecimento, inapetência, polidipsia, ferida crônica com hiperqueratose
Animal 13	Srd	Fezes líquidas com sangue, vômitos
Animal 14	Rotweiler	Linfonodos aumentados, fezes pastosas com sangue, abdômen abaulado
Animal 15	Srd	Emagrecimento, inapetência,
Animal 16	Srd	Inapetência, diarreia, polidipsia, linfadenomegalia
Animal 17	Foxpaulistinha	Linfadenomegalia, discreto emagrecimento, lesões de pele com crostas
Animal 18	Srd	Animal muito prostrado
Animal 19	Bullterrier	Lesões de pele com prurido, febre, linfonodos cervicais e poplíteos aumentados
Animal 20	Golden retriever	Lesões de pele, emagrecimento progressivo, poliúria e polidipsia
Animal 21	Schnauzer	Prostrado, inapetente, vômito esporádico, linfonodo submandibular e cervical aumentado
Animal 22	Bluehillier	Dermatite com prurido, inapetência, prostração, linfadenomegalia generalizada
Animal 23	Srd	Vômito, prostração, inapetência, linfonodos submandibulares aumentados
Animal 24	Basset hound	Linfadenomegalia generalizada, apetite seletivo
Animal 25	Pug	Nódulos cutâneos, linfadenomegalia generalizada
Animal 26	Beagle	Linfadenomegalia generalizada e prurido
Animal 27	Rottweiler	Linfonodo poplíteo aumentado, fezes pastosas e sangramento pelo ânus
Animal 28	Pointer	Inapetência, sintomas neurológicos, carcinoma de células escamosas, linfonodo axilar aumentado
Animal 29	Schnauzer	Emagrecimento progressivo, dermatite, apetite seletivo, prostração, poliúria, polidipsia, linfadenom
Animal 30	Rottweiler	Descamação cutânea, linfadenomegalia generalizada.
Animal 31	Sharpei	Linfonodos poplíteos aumentados, polidipsia, febre
Animal 32	Srd	Feridas cutâneas
Animal 33	Srd	Feridas cutâneas
Animal 34	Srd	Sangramento nasal, vômitos, linfadenomegalia discreta
Animal 35	Srd	Ferida no lábio, linfonodos submandibulares aumentados
Animal 36	Labrador	Linfadenomegalia generalizada, apetite seletivo, prostração
Animal 37	Pug	Prostração, emagrecimento progressivo, epistaxe
Animal 38	Boxer	Lesões cutâneas, emagrecimento progressivo, linfadenomegalia
Animal 39	Cocker	Emagrecimento progressivo, linfonodos poplíteos aumentados, prostração
Animal 40	Srd	Linfonodos poplíteos aumentados, vômitos e anorexia
Animal 41	Foxpaulistinha	Emagrecimento progressivo, seborréia seca
Animal 42	Srd	Linfadenomegalia generalizada, úlceras perinasais
Animal 43	Dalmata	Lesões ulceradas na pele, linfonodo inguinal aumentado
Animal 44	Srd	Secreção nasal, diarreia crônica, linfadenomegalia generalizada
Animal 45	Srd	Linfonodos cervical e submandibular aumentados, feridas, polidipsia, apetite seletivo
Animal 46	Yorkshire	Linfonodos poplíteo e cervical aumentado, seborreia seca, secreção ocular
Animal 47	Srd	Emagrecimento progressivo, prostração, linfadenomegalia e lesão dermatológica no membro
Animal 48	Bulldog frances	Anorexia, desidratação
Animal 49	Pug	Vômitos, onicogrifose, inapetência
Animal 50	Pinscher	Prostração, apetite seletivo, linfadenomegalia

Anexo 2 - Exames sorológicos realizados em cães positivos para Leishmaniose Visceral Canina atendidos no Hospital Veterinário UFMG.

Paciente	ELISA	RIFI
Animal 01	Não se aplica	Não se aplica
Animal 02	Reagente	Reagente 1:80
Animal 03	Reagente	Reagente 1:320
Animal 04	Reagente	Reagente 1:640
Animal 05	Reagente	Reagente 1:80
Animal 06	Reagente	Reagente 1:640
Animal 07	Reagente	Reagente 1:160
Animal 08	Não Reagente	Não Reagente
Animal 09	Reagente	Reagente 1:80
Animal 10	Não Reagente	Não Reagente
Animal 11	Não Reagente	Reagente 1:40
Animal 12	Reagente	Reagente 1:320
Animal 13	Indeterminado	Reagente 1:160
Animal 14	Reagente	Reagente 1:160
Animal 15	Reagente	Reagente 1:80
Animal 16	Reagente	Não se aplica
Animal 17	Reagente	Reagente 1:160
Animal 18	Reagente	Reagente 1:40
Animal 19	Reagente	Reagente 1:640
Animal 20	Não se aplica	Não se aplica
Animal 21	Reagente	Reagente 1:640
Animal 22	Reagente	Reagente 1:320
Animal 23	Reagente	Reagente 1:320
Animal 24	Não se aplica	Não se aplica
Animal 25	Reagente	Reagente 1:640
Animal 26	Não se aplica	Não se aplica
Animal 27	Reagente	Reagente 1:320
Animal 28	Não se aplica	Não se aplica
Animal 29	Reagente	Reagente 1:320
Animal 30	Reagente	Reagente 1:80
Animal 31	Reagente	Reagente 1:640
Animal 32	Reagente	Reagente 1:320
Animal 33	Indeterminado	Não Reagente
Animal 34	Não se aplica	Não se aplica
Animal 35	Indeterminado	Não Reagente
Animal 36	Reagente	Reagente 1:640
Animal 37	Reagente	Reagente 1:80
Animal 38	Reagente	Reagente 1:1280
Animal 39	Não Reagente	Reagente 1:80
Animal 40	Não se aplica	Não se aplica
Animal 41	Reagente	Reagente 1:80
Animal 42	Reagente	Reagente 1:640
Animal 43	Não se aplica	Não se aplica
Animal 44	Reagente	Reagente 1:640
Animal 45	Reagente	Reagente 1:160
Animal 46	Não se aplica	Não se aplica
Animal 47	Reagente	Reagente 1:160
Animal 48	Não se aplica	Não se aplica
Animal 49	Reagente	Reagente 1:640
Animal 50	Não se aplica	Não se aplica

Anexo 3- Parâmetros hematológicos de cães positivos para Leishmaniose Visceral Canina atendidos no Hospital Veterinário UFMG.

Paciente	Hemácias (10 ⁹ /uL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Rubricitos (%)	Leucócito Total (/uL)	Metamielócito (/uL)	Bastonete (/uL)	Neutrófilos (/uL)	Linfócitos (/uL)	Monócitos (/uL)	Eosinófilos (/uL)	Plaquetas (/uL)
Animal 01	3	6,3	20	0	17200	0	1.032	15652	172	344	0	236.000
Animal 02	3,06	7,2	23	5	6940	0	138,8	15652	694	555,2	347	150.000
Animal 03	5,32	12,6	34	0	8890	0	0	17596	1866,9	622,3	800,1	254.000
Animal 04	3,7	8,01	22	0	11000	0	0	22284	550	990	0	38.000
Animal 05	3,38	6,81	22	0	35.050	0	0	32947	175,25	1577,25	350,5	10.900
Animal 06	4,09	6,84	26	0	11700	0	468	7722	2808	702	0	224.000
Animal 07	6,39	15,5	41	0	16500	0	0	10560	3135	660	2145	228.000
Animal 08	4,62	9,27	27	0	6350	0	0	5969	254	63,5	63,5	244.000
Animal 09	5,19	12,8	34	1	7760	0	0	7931,2	388	155	78	284.000
Animal 10	4,29	11,1	29	0	10700	0	107	8988	535	963	107	280.000
Animal 11	3,39	7,71	21	12	16016	0	0	10410,4	5285,28	320	0	83.000
Animal 12	3,15	7,54	21	0	15600	0	0	14976	468	156	0	392.000
Animal 13	6,19	16,7	46	2	15800	158	474	11534	1264	1738	632	296.000
Animal 14	3,47	7,64	26	0	7100	0	0	3195	1917	284	1704	240.000
Animal 15	4,42	11,3	31	0	14500	0	0	9715	2610	435	1015	252.000
Animal 16	3,35	7,82	24	0	6530	0	0	5615	587	326	0	92.000
Animal 17	5,61	12,1	35	0	11400	0	0	9120	912	1254	114	288.000
Animal 18	4,22	9,64	29	0	4190	0	0	2849	879	293	167	152.000
Animal 19	5,02	10,8	33	0	15100	0	0	10721	3171	906	302	144.000
Animal 20	2,97	4,96	19	0	7590	0	0	6375	1062	151	0	200.000
Animal 21	4,27	8,89	28	0	7570	0	0	5904	757	303	605	300.000
Animal 22	4,75	9,15	30	0	13000	0	260	11700	0	910	130	156.000
Animal 23	3,23	5,7	19	0	13800	0	0	1007	1932	1242	552	147.000
Animal 24	5,64	12,2	35	0	8840	0	0	6011	1856	442	530	252.000
Animal 25	3,21	6,86	22	0	12300	0	0	9471	2091	369	369	160.000
Animal 26	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Animal 27	5,84	12,6	39	0	15200	0	456	11856	1216	1672	0	232.000
Animal 28	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Animal 29	4,52	8,99	28	0	8300	0	83	7055	830	332	0	248.000
Animal 30	6,21	12,1	37	0	14200	0	0	11360	1562	568	710	275.000
Animal 31	5,41	10,5	32	0	6580	0	0	4211	2039	263	65	300.000
Animal 32	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Animal 33	5,46	12,2	37	2	25100	0	0	21335	1506	1757	502	280.000
Animal 34	2,36	4,93	15		1870	0	0	0	0	0	0	4.000
Animal 35	5,8	12,6	37	0	7950	0	0	4611	2941	159	238	222.000
Animal 36	2,92	6,29	20	0	14300	0	0	9009	3861	143	1144	255.000
Animal 37	4,29	8,62	28	0	9060	0	91	7429	997	453	91	112.000
Animal 38	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Animal 39	2,19	4,62	15	0	7450	0	0	6854	521	75	0	123.000
Animal 40	5,68	12,4	38	0	10500	0	0	7455	2520	525	0	136.000
Animal 41	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Animal 42	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Animal 43	4,55	8,22	25	0	4150	0	0	3029,5	747	83	291	21.000
Animal 44	5,51	9,75	31	0	4190	0	0	1885,5	1969,3	83,8	251,4	108.000
Animal 45	7,03	15,3	42	0	10100	0	101	5353	4040	202	404	148.000
Animal 46	4,13	6,25	25	0	4060	0	40,6	3329,2	406	284,2	0	104.000
Animal 47	5,03	12,5	38	0	6200	0	0	4836	434	372	496	164.000
Animal 48	1,55	4,6	15	0	7600	0	0	5776	1748	76	0	303.000
Animal 49	3,68	7,88	23	7	4350	44	305	3480	479	44	0	56.000
Animal 50	4,67	8,78	30	0	7060	0	0	6424,6	494,2	0	141	91.000

Anexo 4 - Diferencial celular de linfonodos caninos positivos para Leishmaniose Visceral Canina atendidos no Hospital Veterinário UFMG.

Paciente	Pequenos linfócitos	Centrócitos	Centroblastos	Linfoblastos	Imunoblastos	Macronucleoladas	Plasmócitos	Células Mott	Macrófago / Interdigital	Neutrófilos	Eosinófilos	L.D.U.	Figuras de mitose	Hemácias / campo
Animal 01	790	130	10	0	0	0	0	0	0	70	0	ALTO	0	8/campo
Animal 02	408	118	39	8	0	31	168	0	60	147	21	ALTO	4	120/campo
Animal 03	670	116	0	8	0	0	116	8	8	52	22	ALTO	0	20/campo
Animal 04	445	241	3	0	0	10	263	2	19	17	0	ALTO	1	25/campo
Animal 05	660	200	0	0	0	18	80	2	0	40	0	ALTO	0	14/campo
Animal 06	773	60	10	0	0	0	129	0	0	28	0	ALTO	0	45/campo
Animal 07	919	49	0	0	0	3	20	0	0	3	6	BAIXO	0	19/campo
Animal 08	853	90	6	6	0	0	32	0	0	13	0	BAIXO	0	13/campo
Animal 09	724	92	11	0	0	0	92	0	1	80	0	ALTO	0	62/campo
Animal 10	811	76	0	0	0	0	0	0	19	94	0	MÉDIO	0	56/campo
Animal 11	759	155	0	0	0	0	46	0	6	34	0	ALTO	0	33/campo
Animal 12	777	127	6	0	0	0	61	6	6	17	0	ALTO	0	66/campo
Animal 13	704	182	2	1	2	46	32	0	11	17	3	BAIXO	0	8/campo
Animal 14	700	160	20	0	0	20	20	0	0	20	60	alto	0	11/campo
Animal 15	712	154	24	0	4	8	36	4	4	22	32	MÉDIO	0	45/campo
Animal 16	652	152	0	11	0	76	11	22	33	43	0	ALTO	0	8/campo
Animal 17	980	9	0	0	0	0	6	0	5	0	0	baixo	0	22/campo
Animal 18	823	77	8	0	0	0	47	0	0	45	0	BAIXO	1	70/campo
Animal 19	754	100	4	1	0	10	90	1	20	20	0	alto	1	33/campo
Animal 20	572	260	0	8	0	0	108	12	40	0	0	ALTO	0	10/campo
Animal 21	716	235	0	0	0	0	20	0	0	29	0	MÉDIO	0	90/campo
Animal 22	607	105	13	0	0	13	118	0	26	118	0	ALTO	0	78/campo
Animal 23	651	248	16	0	3	45	8	0	0	25	4	BAIXO	0	5/campo
Animal 24	828	24	10	0	0	0	118	4	2	8	6	ALTO	0	22/campo
Animal 25	830	48	4	0	0	4	94	10	0	10	0	ALTO	0	5/campo
Animal 26	828	96	0	0	1	0	22	0	23	30	0	ALTO	0	22/campo
Animal 27	784	88	0	6	0	0	61	0	14	34	13	MÉDIO	1	48/campo
Animal 28	771	124	11	0	6	7	2	0	37	40	2	ALTO	1	31/campo
Animal 29	501	273	0	0	0	23	136	22	0	45	0	ALTO	0	84/campo
Animal 30	897	52	0	0	0	0	11	0	23	17	0	ALTO	0	36/campo
Animal 31	733	106	13	2	0	6	58	2	20	58	2	ALTO	1	87/campo
Animal 32	858	96	4	0	0	10	10	0	0	22	0	BAIXO	0	70/campo
Animal 33	817	64	8	3	2	20	18	6	10	51	1	MÉDIO	0	200/campo
Animal 34	760	105	22	0	0	0	80	0	31	2	0	ALTO	0	31/campo
Animal 35	830	110	0	0	0	0	0	0	10	40	10	BAIXO	0	80/campo
Animal 36	961	2	0	1	0	9	10	0	3	14	0	MÉDIO	1	27/campo
Animal 37	288	142	88	4	26	9	378	0	2	63	0	ALTO	2	16/campo
Animal 38	720	115	0	0	0	19	96	2	0	10	38	MÉDIO	0	48/campo
Animal 39	784	156	8	0	0	22	14	0	0	16	0	BAIXO	0	27/campo
Animal 40	804	80	12	0	0	0	72	8	8	16	0	ALTO	0	80/campo
Animal 41	666	242	3	0	3	5	12	0	17	52	0	BAIXO	1	25/campo
Animal 42	879	42	8	1	2	10	31	0	7	19	1	MÉDIO	1	28/campo
Animal 43	569	83	10	10	0	21	299	2	0	6	0	BAIXO	0	24/campo
Animal 44	877	47	2	2	0	6	40	7	11	8	0	ALTO	0	22/campo
Animal 45	850	69	2	6	0	8	25	4	6	25	5	BAIXO	0	61/campo
Animal 46	792	66	17	0	0	20	70	8	20	7	0	MÉDIO	1	27/campo
Animal 47	776	119	12	0	0	5	40	0	4	40	4	ALTO	1	33/campo
Animal 48	968	26	4	2	0	0	0	0	0	1	0	BAIXO	1	31/campo
Animal 49	408	313	8	0	31	8	195	4	5	4	2	ALTO	0	5/campo
Animal 50	768	65	5	0	5	0	140	1	27	11	0	ALTO	0	18/campo