


Avaliações histológica e imunoistoquímica da medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal de cães reagentes para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA

Histological and immunohistochemical evaluations of the bone marrow from femur and sternal manubrium of dogs reactive for leishmaniasis by DPP® and ELISA tests

Aline Oliveira de Magalhães¹ , Lucilândia Maria Bezerra¹ , Diego Pereira Araújo¹ , Bruna Siqueira Gomes de Lima¹ , Leandro do Prado Assunção¹ , Rodrigo Caldas Menezes² , Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura¹ 

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

²Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

*correspondente: vdmoura@ufg.br

Resumo

Como a medula óssea é um dos órgãos mais acometidos pela leishmaniose visceral canina (LVC), amostras desta são frequentemente colhidas para exames parasitológicos, sendo possível a ocorrência de alterações mielodisplásicas, com consequente anemia, leucopenia e trombocitopenia. Assim, este estudo teve como objetivo investigar alterações histológicas e imunoistoquímicas na medula óssea do fêmur e manúbrio esternal de cães reativos para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA. Para isso, 13 caninos da rotina epidemiológica para LVC realizada pela Diretoria de Vigilância de Zoonoses de Goiânia (DVZ), GO, Brasil, foram submetidos ao exame anatomopatológico. 46,2% e 53,9% das amostras de medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal apresentaram maior proporção da série vermelha, respectivamente. Além disso, havia variados graus de hiperplasia macrófagica, hemossiderose e emperipolese megacariocítica. Formas amastigotas de *Leishmania* spp. na medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal às avaliações histopatológica e imunoistoquímica foram observadas, com boa concordância entre essas, mas sem diferença na intensidade parasitária entre a medula óssea desses sítios anômicos. Conclui-se que a medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal de cães reativos para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA apresenta alterações histológicas decorrentes da doença, independente da presença ou intensidade do parasito, sendo hiperplasia de macrófagos, hemossiderose e emperipolese as principais alterações medulares nesses animais. Além disso, a medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal são úteis ao diagnóstico de LVC por métodos diretos.

Palavras-chave: alterações medulares; amastigotas; histopatologia; imunocoloração; leishmaniose visceral canina

Abstract

As the bone marrow is one of the most organs affected by canine visceral leishmaniasis (CVL), samples from this are frequently taken for parasitological tests, with occurrence of myelodysplastic changes, with consequent anemia, leukopenia, and thrombocytopenia. Thus, this study aimed to investigate the histological and immunohistochemical changes in the bone marrow of the femur and sternal manubrium of dogs reactive for leishmaniasis by DPP® and ELISA tests. For this, thirteen canines from the epidemiological routine for CVL carried out by the Directorate of Zoonosis Surveillance of Goiânia (DVZ), GO, Brazil, were subjected to anatomopathological examination. 46.2% of bone marrow samples from the femur showed a higher proportion of the red series, and 53.9% of bone marrow of the sternal manubrium evidenced a higher proportion of the red series. Also, there were varied macrophage hyperplasia, hemosiderosis, and megakaryocytic emperipolesis. Amastigote forms of *Leishmania* spp. in the bone marrow of the femur and sternal manubrium to histopathological and immunohistochemical evaluations were observed, with good agreement them, but without difference in the parasite intensity between the bone marrow of these anatomical sites. It was concluded that bone marrow of the femur and sternal manubrium of dogs reactive for leishmaniasis by DPP® and ELISA tests has histological changes resulting from the disease, regardless of the parasite presence or intensity, with macrophage hyperplasia, hemosiderosis, and emperipolesis being the main medullary changes in these animals. Also, the bone marrow of the femur and sternal manubrium are useful anatomical sites for the diagnosis of CVL by direct methods.

Keywords: amastigotes; canine visceral leishmaniasis; histopathology; immunostaining; medullary changes

Recebido : 13 de junho de 2022. Aceito: 5 de setembro de 2022. Publicado: 21 de setembro de 2022.



Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania infantum*, que ocorre em todo mundo, comumente em áreas tropicais e subtropicais, e acomete animais e humanos¹. No Brasil, no período de 1990 a 2018, foram confirmados 91.055 casos de LV em humanos, com média de 3.140 casos por ano. Já no estado de Goiás, no mesmo período, foram notificados 646 casos, com média de 22,28 casos por ano². Devido a expansão da urbanização, houve aumento no número de casos de LV no país e, ao mesmo tempo, aumento na incidência da doença em cães de grandes e médias cidades^{3,4}. O cão é o principal reservatório do parasita devido à proximidade com os humanos, e a transmissão ocorre principalmente pela picada de um mosquito flebotomíneo infectado⁵.

A medula óssea e os linfonodos são os locais mais utilizados para a colheita de amostras⁵ voltadas ao diagnóstico parasitológico direto da leishmaniose visceral canina (LVC), principalmente em animais assintomáticos^{6,7}. Os sinais clínicos mais comuns da doença incluem onicogrifose, lesões cutâneas, linfadenomegalia, esplenomegalia, baixo escore corporal⁸⁻¹¹ e anemia^{7,10,12-14}. Adicionem-se, ainda, sinais como epistaxe, aumento do tempo de coagulação sanguínea, hematúria, aplasia medular e trombocitopenia^{7,15,16}.

Na LVC, a medula óssea apresenta alta parasitemia, sendo que no início da infecção não há alterações na produção das séries branca e vermelha, mas, com a progressão da doença, ocorre redução da produção celular e, conseqüentemente, transtornos hematológicos, os quais decorrem de alterações como hiperplasia de macrófagos, hipoplasia de eritrócitos e aplasia medular¹⁶. Em humanos com LV foram descritas alterações mielodisplásicas, incluindo anemia¹⁶⁻¹⁷, desencadeada pelo sequestro de hemácias no baço, por citocinas pró-inflamatórias que inibem a síntese de eritropoetina, e por mecanismos imunológicos¹⁶.

A maior parte dos estudos de LVC utiliza órgãos como baço, linfonodo e medula óssea para a identificação e quantificação do parasita. Entretanto, há poucos estudos acerca das alterações histomorfológicas na medula óssea de cães portadores da doença¹⁶, bem como não foi encontrado estudo comparativo quanto a intensidade parasitária em diferentes sítios anatômicos de medula óssea nesses animais. Dessa forma, este estudo teve como objetivo realizar análises histopatológica e imunoistoquímica da medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal de cães reagentes para leishmaniose aos testes DPP® e 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 13 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 a eutanásia e exame anatomopatológico.

Para averiguação dos dados epidemiológicos foram consideradas as variáveis sexo, idade e raça. No que tange 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). Quanto a raça, consideraram-se cães sem raça definida (SRD) e com raça definida (CRD). Também foram consideradas variáveis referentes a sinais clínicos da LVC, incluindo onicogrifose, alopecia, descamação, úlcera oral, coloração de mucosa oral^{18, 19} e escore corporal (escala de 1-5 pontos: 1 - caquético, costelas visíveis, sem camada de gordura, mostrando proeminências ósseas palpáveis, recuo abdominal evidente, com perda de massa muscular; 2 - escore corporal baixo, animais magros, com costelas palpáveis, mínima cobertura de gordura, proeminências ósseas palpáveis, reentrância abdominal visível na região do flanco e mínima gordura abdominal; 3 - escore corporal médio, escore ideal, costelas palpáveis com pequena cobertura de gordura, recuo abdominal bem proporcionado e camada mínima de gordura abdominal; 4 - sobrepeso, 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, gordura acentuada, abdômen distendido, com gordura exagerada e depósitos de gordura nas regiões lombar, da face e dos membros)²⁰.

De acordo com os sinais clínicos apresentados, os cães foram classificados em assintomáticos (sem sinais clínicos) ou sintomáticos (com sinais clínicos compatíveis com LVC)²¹. Ao exame macroscópico foram avaliadas alterações referentes a esplenomegalia e linfadenomegalia (regional ou generalizada). No exame necroscópico, as amostras da medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal foram colhidas e fixadas em formalina a 10% tamponada e neutra, durante 48 horas²², e sequencialmente transferidas para solução alcoólica a 70%. As amostras do manúbrio esternal foram descalcificadas com solução de EDTA, água destilada e hidróxido de sódio, o que não foi necessário às amostras de medula do fêmur, que eram colhidas imediatamente após a quebra mecânica do osso em sua extensão e exposição da medula²³. Em seguida, todas as amostras de medula óssea foram submetidas a

processamento histológico e inclusão em parafina^{22,24}.

Avaliação histopatológica

Dos blocos parafinados com as amostras da medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal foram confeccionados cortes histológicos à espessura de 5 µm, os quais distendidos sobre lâminas histológicas e corados com hematoxilina e eosina (HE)²². As alterações histomorfológicas na medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal foram analisadas de acordo com descrições adaptadas de Momo et al.¹⁶, incluindo as variáveis proporção das séries vermelha e amarela, hiperplasia de macrófagos (ausente, discreta, moderada ou acentuada), presença de macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania infantum* (ausente, discreta, moderada ou acentuada), hemossiderose e emperipolese megacariocítica.

Avaliação imunoistoquímica

Para a análise imunoistoquímica, cortes histológicos de 4 µm foram dispostos sobre 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 HRP, em duas etapas, com a incubação sequencial de HiDef Detection™ Amplifier (Mouse/Rabbit), seguida de HiDef Detection™ HRP Polymer Detector (HiDef Detection HRP Polymer System; Cell Marque, Rocklin, CA). Para a visualização da reação foi utilizado o cromógeno DAB, de acordo com as recomendações do fabricante. As lâminas foram contraincubadas com hematoxilina de Harris, desidratadas em etanol absoluto, clarificadas em xilol e montadas com lamínulas e resina sintética. Como controle positivo da reação foram utilizadas duas amostras de tecido canino acentuadamente parasitadas com formas amastigotas de *Leishmania* spp. e, como controle negativo, duas outras amostras sabidamente não infectadas 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 400x e auxílio de uma grade óptica de 1 mm² e um contador manual de células. Em seguida, para cada animal foi obtida a média dos macrófagos parasitados em cinco campos e atribuídos os escores de intensidade parasitária, os quais: ausente (quando não observadas formas amastigotas), discreto a moderado (0,2 a dez macrófagos parasitados), e acentuado (mais de dez macrófagos parasitados)⁵.

Análises estatísticas

Para as variáveis sexo, idade, raça, classificação clínica e alterações histomorfológicas da medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal foi empregada estatística descritiva. Para a análise de concordância quanto ao número de casos positivos aos exames histopatológico e imunoistoquímico foi utilizado o teste não paramétrico Kappa, ao nível de significância de 5%, sendo, em seguida, aplicado o escore excelente (0,8 < k ≤ 1), muito bom (0,6 < k ≤ 0,8), bom (0,4 < k ≤ 0,6), razoável (0,2 < k ≤ 0,4) ou péssimo (k ≤ 0,2), para determinar o grau de concordância entre os exames. Já para a comparação da intensidade parasitária entre a medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal foi aplicado o teste de Mann-Whitney, considerando o nível de significância de 5%. Para isso, foram utilizadas planilhas Excel 2016 e o software R®, versão R 4.0.0, incluindo as bibliotecas *irr* (versão 0.84) e *stats* (versão 3.4.4).

Resultados

Dos 13 cães reagentes para leishmaniose aos testes de DDP® e ELISA incluídos neste estudo, 61,5% (n=8) eram jovens, 23,1% (n=3) adultos e 15,4% (n=2) idosos. Quanto ao gênero, 69,2% (n= 9) eram fêmeas e 30,8% (n=4) machos. Quanto a raça, 76,9% (n=10) era de raça definida e 23,1% (n=3) sem raça definida.

Na avaliação das alterações clínicas, 92,3% (n=12) dos animais apresentaram mucosa oral hipocorada, 76,9% (n=10) alopecia e descamação cutânea, 53,9% (n=7) onicogribose e 7,7 % (n=1) úlcera oral. Na avaliação de escore corporal, 76,9% (n= 10) dos cães exibiram escore corporal médio, 15,4% (n=2) baixo escore corporal e 7,7% (n=1) sobrepeso. Dos 13 animais deste estudo, 92,3% (n=12) eram sintomáticos e 7,7% (n=1) assintomáticos. Na avaliação macroscópica 100% (n=13) dos animais apresentaram esplenomegalia, 92,3% (n=12) linfadenomegalia generalizada e um cão exibiu linfadenomegalia localizada.

Avaliação histopatológica

À avaliação histomorfológica das amostras da medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal, quanto a proporção das séries vermelha e amarela no fêmur, 46,2% (n=6) dos cães apresentaram maior proporção da série

vermelha, 46,2% (n=6) proporção semelhante das séries vermelha e amarela, e 7,7% (n=1) maior proporção da série amarela (Figura 1). Na medula óssea do manúbrio esternal, 53,9% (n=7) apresentaram maior proporção da série vermelha e 46,2% (n=6) a mesma proporção das séries

vermelha e amarela. O resultado da avaliação das variáveis hiperplasia de macrófagos na medula óssea (Figura 1), macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania* spp. (Figura 2) é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das variáveis hiperplasia de macrófagos na medula óssea e macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania* spp. na medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal, de acordo com intensidade

Amostras	n	D%	n	M%	n	A%
Fêmur - Hiperplasia de macrófagos (n=13)	4	30,8	3	23,1	6	46,1
Fêmur - Macrófagos com amastigotas de <i>Leishmania</i> (n=8)	3	23,1	2	15,4	3	23,1
Manúbrio esternal - Macrófagos (n=13)	5	38,5	6	46,1	2	15,4
Manúbrio esternal - Macrófagos com amastigotas (n=4)	2	15,4	0	0	2	15,4

n – Número de casos; Intensidade: D – discreta, M – moderada, A – acentuada; % – porcentagem

Das amostras de medula óssea do fêmur, 84,6% (n=11) apresentaram algum grau de hemossiderose e 15,4% (n=2) na medula óssea do manúbrio esternal. Foi observada

emperipolese megacariocítica em 92,3% (n=12) das amostras de medula óssea do manúbrio esternal e 53,85% (n=7) da medula óssea do fêmur (Figura 1).

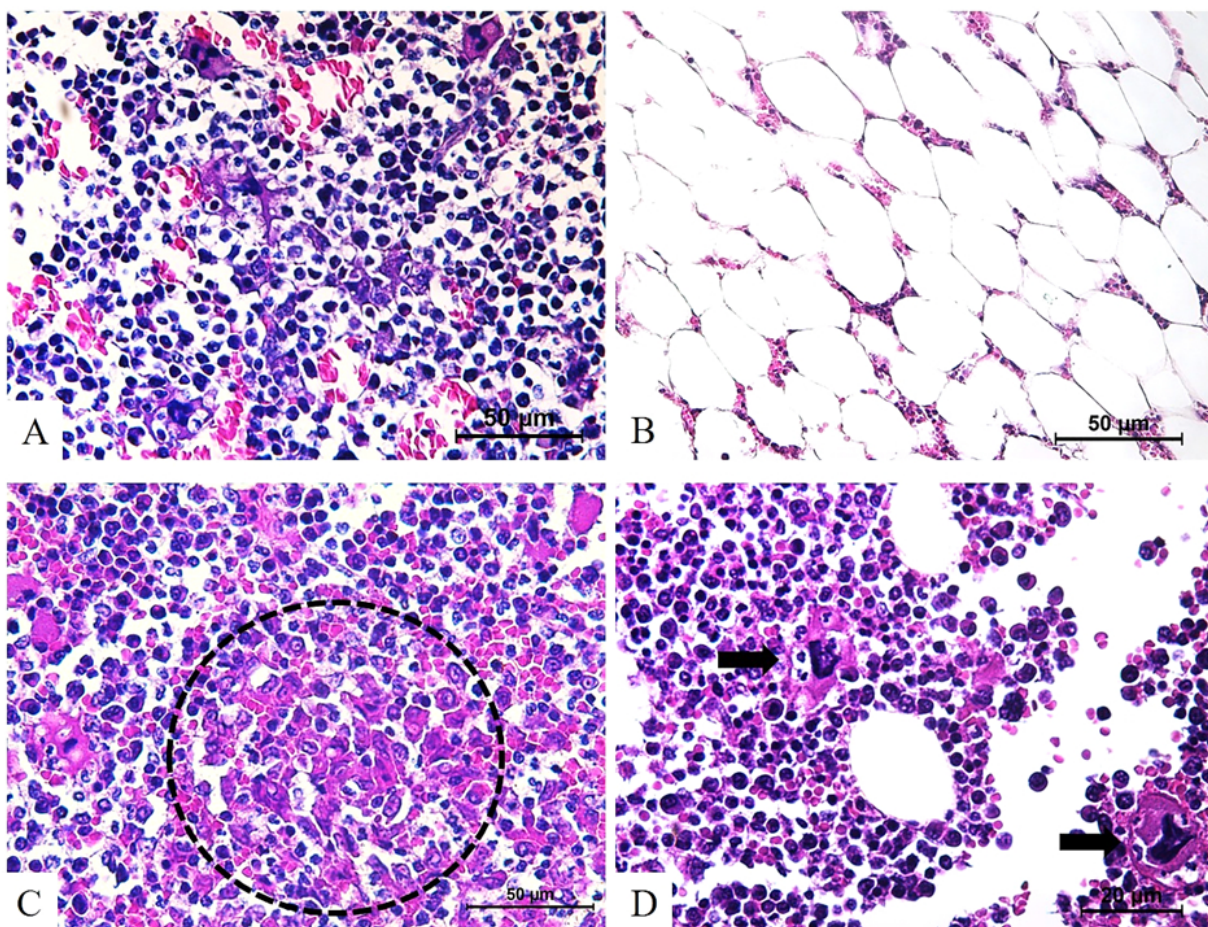


Figura 1. Fotomicrografias da medula óssea de cães reagentes para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA. A) Maior proporção vermelha e B) Maior proporção amarela, HE. C) Acentuado infiltrado de macrófagos (área pontilhada), HE. D) Emperipolese megacariocítica (setas), HE.

Avaliação imunoistoquímica

Como à coloração de HE (Figura 2A), na técnica de imunoistoquímica (Figura 2B) foi observada variada imunomarcação das formas amastigotas de *Leishmania*

spp. nas amostras de medula óssea do fêmur e manúbrio esternal de cães reagentes para leishmaniose aos testes de DPP® e ELISA (Figura 2), havendo 76,9% (n=10) de imunomarcação na medula óssea do fêmur e 38,5% (n=5) na medula óssea do manúbrio esternal.

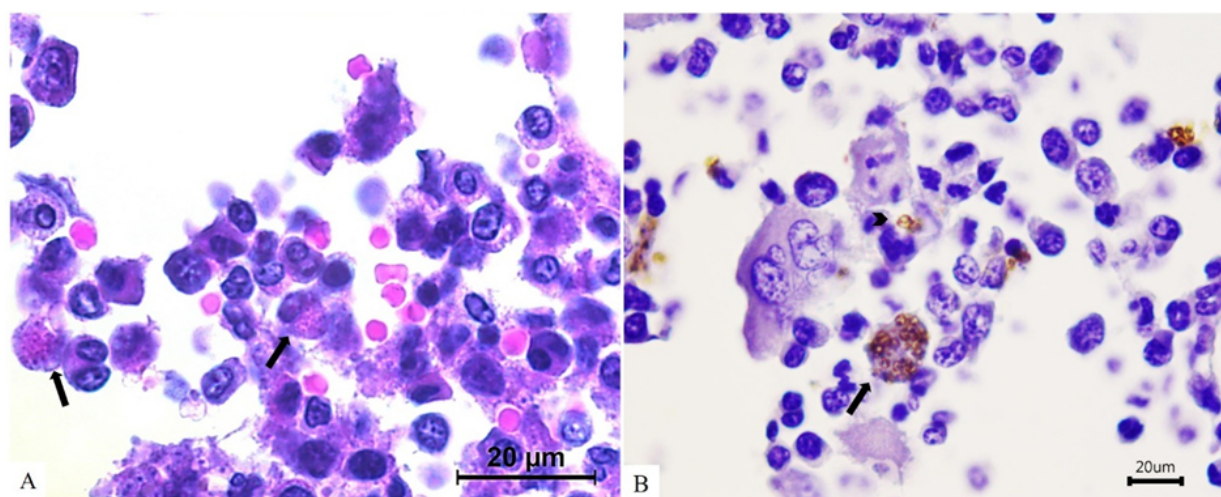


Figura 2. Fotomicrografias da medula óssea do fêmur de cães reagentes para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA. A) Macrófagos contendo formas amastigotas de *Leishmania* spp. (setas), HE. B) Imunomarcação de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no citoplasma de macrófagos (setas) e livres na amostra (cabeça da seta), IHQ, anti-*leishmania*.

Na análise de concordância dos resultados quanto ao número de casos positivos aos exames histopatológico (n=8, maior número de amostras positivas entre a medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal à coloração de HE) e imunoistoquímico (n=10, maior número de amostras entre a medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal ao teste imunoistoquímico) da medula óssea, foi constatada

boa concordância ($k=0,60$; $p=0,00125$). Na avaliação da intensidade parasitária no fêmur e manúbrio esternal pela técnica de imunoistoquímica foram observados animais com os escores ausente, discreto a moderado e acentuado. Não houve diferença na comparação da intensidade parasitária entre fêmur e manúbrio esternal à avaliação imunoistoquímica ($p=0,18$) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos escores e comparação das médias de intensidade parasitária na medula óssea do fêmur e manúbrio esternal

Amostra	n	A %	n	LM %	N	Ac%	Média ($p=0,18$)
Fêmur	3	23,1	8	61,5	2	15,4	4,44 ^a
Manúbrio esternal	8	61,5	3	23,1	2	15,4	3,41 ^a

n – Número de casos, A% - porcentagem de ausente, DM% - porcentagem de discreto a moderado, Ac% - porcentagem de intenso. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si.

Discussão

Dos cães desta pesquisa, a maioria era sintomática, apresentando alterações cutâneas, onicogribose, mucosas hipocoradas e linfadenomegalia generalizada, as quais comumente descritas na LVC^{9-11,18,19}.

Todos os animais desta pesquisa exibiram hiperplasia de macrófagos na medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal em diferentes graus de intensidade.

Esse achado também foi descrito por Momo et al.¹⁶, que consideraram a hiperplasia difusa de macrófagos como granulomas difusos sem formação nodular típica. Contudo, achados semelhantes foram considerados apenas hiperplásicos, tendo que a medula óssea não exibia células epitelioides e infiltrado linfoplasmocitário delimitados por tecido fibroso, que se referem a alterações histomorfológicas que sustentam a classificação de granulomas, a exemplo do que já foi amplamente descrito

e caracterizado no baço^{25,26} e no fígado²⁷.

A maioria dos cães deste estudo apresentou mucosas hipocoradas e hemossiderose na medula óssea. Esses achados são descritos em casos de LVC e relacionados à anemia imunomediada e hipergamaglobulinemia decorrentes da progressão da doença^{15,16,28}. Em humanos com LV, a anemia se justifica por diversos fatores, incluindo aumento esplênico, aumento do volume plasmático, hiperplasia retículo-endotelial, hemólise, eritropoiese irregular e anemia autoimune²⁹. Nesse contexto, pondera-se que mecanismos semelhantes possam ocorrer em casos de LVC e acabem por desencadear alterações como mucosas hipocoradas e hemossiderose, a exemplo do observado neste estudo.

Também foi observada emperipolese megacariocítica na maioria das amostras de medula óssea deste estudo, caracterizada pela inserção ativa de uma célula no citoplasma de outra, mas de origem não fagocítica. Nesse caso, neutrófilos foram observados no citoplasma de megacariócitos, principalmente na medula óssea do manúbrio esternal. Destaque-se que emperipolese megacariocítica foi descrita em casos de LVC^{16,30}, mas a causa para sua ocorrência permanece incerta, sendo necessários estudos adicionais para confirmar sua relação com a infecção por *Leishmania* spp.¹⁶. Por outro lado, esse fenômeno é comum em distúrbios hematolinfóides e mieloproliferativos³¹, os quais descritos na LV em humanos e em casos de outros parasitas intracelulares, como *Trypanosoma* spp., porém, sem mecanismo definido^{32,33}.

A avaliação histopatológica possibilita examinar as alterações morfológicas na medula óssea de cães infectados com *Leishmania* spp. e, semelhante à imunoistoquímica, permite a visualização e a contagem das formas amastigotas do parasita³⁴. Os resultados desta pesquisa evidenciaram que, na análise qualitativa por imunoistoquímica da medula óssea do fêmur e manúbrio esternal, há maior número de casos positivos em relação à histopatologia, mas sem diferença estatística. Esse dado contrasta o descrito na literatura sobre a relevância do teste de imunoistoquímica em relação à técnica de histopatologia para identificar as formas amastigotas de *Leishmania* spp.^{12,34-36}. Nesse contexto, Toplu et al.¹⁸ destacam que a técnica de imunoistoquímica é mais sensível e específica para detectar amastigotas quando comparada à citopatologia e histopatologia, e descrevem a imunomarcagem de amastigotas em macrófagos na medula óssea em casos de LVC⁸. Em contrapartida, a boa concordância de positividade da LVC às técnicas de histopatologia e imunoistoquímica observada nesta pesquisa, direciona à utilidade de ambas as técnicas para o diagnóstico direto da doença.

Como não foi observada diferença entre a medula óssea do fêmur e do manúbrio esternal quanto à intensidade parasitária, pondera-se que ambos

compreendem órgãos úteis ao diagnóstico da LVC. Nesse âmbito, Paparcone et al.⁷ também descrevem que não há diferenças significativas na celularidade e no grau de parasitismo na medula óssea colhida de diferentes locais para diagnóstico direto da LVC, o que foi ainda ratificado por Xavier et al.¹² em estudo comparativo de técnicas de diagnóstico da doença.

Conclusões

A medula óssea do fêmur e manúbrio esternal de cães soropositivos para leishmaniose aos testes DPP® e ELISA desenvolve alterações histomorfológicas decorrentes da doença, as quais independem da presença ou intensidade do parasito, sendo hiperplasia de macrófagos, hemossiderose e emperipolese as principais alterações medulares. Além disso, a medula óssea do fêmur e o manúbrio esternal constituem sítios anatômicos úteis ao diagnóstico da LVC por métodos diretos.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

À Diretoria de Vigilância em Zoonoses de Goiânia (DVZ), GO, Brasil, por ceder os animais ao estudo e pela assistência 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 Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, pelo apoio técnico.

Contribuições do autor

Conceituação: A. O. de Magalhães, L. M. Bezerra e V. M. B. D. de Moura. *Investigação*: A. O. de Magalhães, L. M. Bezerra, D. P. Araújo, B. S. G. de Lima e R. C. Menezes. *Metodologia*: A. O. de Magalhães, V. M. B. D. de Moura, L. do P. Assunção e R. C. Menezes. *Análise formal*: L. do P. Assunção. *Validação*: L. do P. Assunção. *Redação (esboço original)*: Aline Oliveira de Magalhães. *Supervisão*: V.M. B. D. de Moura. *Redação (revisão e edição)*: V. M. B.D. de Moura e R. C. Menezes.

Referências

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis; 2016. 375p.
2. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral. 2020. [acessado em 2020 jul 20]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>. Português.
3. Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Reis LES, et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. Plos Neglected Tropical Diseases. [Internet]. 2011 ago [acessado em 2020 jun 25], 5(8):e1291. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/jour->

nal.pntd.0001291

4. Castro-Júnior JG, Freire ML, Campos SPS, Scopel KKG, Porrozzi R, Silva ED, et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP®) and PCR assays. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. [Internet]. 2014 maio [acessado em 2020 jun 28]; 56(3): 225-229. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000300008>

5. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral; 2014.[acessado em 2020 jul 20];120 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visce_ral_1edicao.pdf. Português

6. Menezes RC, Madeira MF, Ferreira LC, Barbosa CJLF, Miranda LHM, Figueiredo FB. Cell-block immunohistochemistry of bone marrow aspirates: a novel tool to improve the diagnosis of *Leishmania* infection in dogs. *Journal of comparative pathology*. [Internet]. 2016. Fev-Abr [acessado em 2020 jul 28]; 154(2-3):157-60. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.12.005>

7. Papparcone R, Fiorentino E, Cappiello S, Gizzarelli M, Grandoni L, Oliva G, Manzillo VF. Sternal aspiration of bone marrow in dogs: a practical approach for canine leishmaniasis diagnosis and monitoring. *Journal of Veterinary Medicine*. [Internet]. 2013.[acessado em 2020 jul 29]; 2013: 217314. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/217314>

8. Tafuri WL, Santos RL, Arantes RME, Gonçalves R, Melo MN, Michalik MSM, et al An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of immunological methods*. [Internet]. 2004, Set [acessado em 2020 jul 15]; 292(1-2):17-23. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.05.009>

9. Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog. II. Pathology. *Veterinary pathology*. [Internet]. 1984 Jan [acessado em 2020 jul 19]; 21(1):80-6. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1177/030098588402100114>

10.Lima WG, Michalick MSM, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*. [Internet]. 2004. Set [acessado em 2020 jul 26]; 92(1):43-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.04.007>.

11.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, abr [acessado em 2020 jul 26]; 10(4):e0123009. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123009>

12.Xavier SC, Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, LimaWG, 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 Veterinary Research*. [Internet]. 2006. 2:17. [acessado em 20 de jul de 2020]; 8;2:17. Available from: doi: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-17>

13.Tryphonas L, Zawidzka Z, Bernard MA, Janzen EA. Visceral Leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. [Internet]. 1977 jan [acessado em 2020 jul 30]; 41(1):1-12. Disponível em: Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

pmc/articles/PMC1277686/

14.Reis AB, Martins OAF, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. [Internet]. 2009 mar [acessado em 2020 jul 28]; 128(1-3):87-95. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>

15.Mahajan V, Marwaha RK. Case report immune mediated hemolysis in visceral leishmaniasis. *Journal of Tropical Pediatrics*. [Internet]. 2007 ago [acessado em 2020 jul 30]; 53(4):284–286. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/tropej/fmm018>

16.Momo C, Jacintinho APP, Moreira PRR, Munari DP, Machado GF, Vasconcelos RO. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Medicine International*. [Internet]. 2014 [acessado em 2020 jul 12] 2014: 5p. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/150582>

17.Solimando AG, Coniglio G, Desantis V, Lauletta G, Bavaro DF, Diella L, et al. A Challenging Case of Visceral Leishmaniasis. *Reports*. [Internet]. 2002 [acessado em 2020 ago 30]; 5(2):23. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/reports5020023>

18.Toplu N, Aydogan A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology research*. [Internet]. 2011 out [acessado em 2020 jul 29]; 109(4):1051-7. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2345-0>

19.Oliveira VC, Boechat VC, Mendes AAVJ, 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 abr [acessado em 2020 jul 20]; 12(4):e0175588. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175588>

20.Castro MC, Vieira AB, Santos MCS, Gershony LC, Soares AMB, Ferreira AMR. Escore de condição corporal como indicador do prognóstico de gatos com doença renal crônica. *Ciência Rural* [Internet]. 2010 fev [acessado em 2020 jul 20]; 40(2):365-370. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000010> .Português

21.Lima IS, Silva JS, Almeida VA, Leal GLJ, Souza PAN, Lorangeira DF, Moura-Neto JP, et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic White pulp. *Plos One*. [Internet]. 2014.fev [acessado em 2020 jul 28]; 3;9(2):e87742. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087742>

22.Boechat VC, Mendes AAVJ, Madeira MF, Ferreira LC, Figueiredo FB, Rodrigues FCC, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitology research*. [Internet]. 2016.jun [acessado em 2020 jul 20]; 115(6):2371-9. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4987-4>.

23.Caputo LFG, Gitirana LB, Manso PPA. Capítulo 3. Técnicas histológicas. IN: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2 / Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010, p.89-188. Português. (<https://www.epsvj.fiocruz.br/publicacao/livro/conceitos-e-metodos-para-formacao-de-profissionais-em-laboratorios-de-saude-volum-2>) . Português

24.Nunes CS, Cinsa LA. Princípios Do Processamento Histológico De Rotina. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v. 8, n. único, p. 31-40, 2016. Português (<https://docs.bvsa->

lud.org/biblioref/2018/11/964830/2884-8890-1-sm.pdf)

25. Santana CC, Vassallo J, Freitas LAR, Oliveira GGS, Pontes-de-Carvalho LC, Dos-Santos WLC. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. *Parasite Immunology*. [Internet]. 2008 out [acessado em 28 jul 2020]; 30(10): 515-524. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x>

26. Silva AVA, Figueiredo FB, Menezes RC, Mendes-Junior AA, Miranda LHM, Cupolillo E. 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 neglected tropical diseases* [Internet]. 2018 abr [acessado em 2020 jul 20]; 12(4):e0006445. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445>

27. Tafuri WL, Tafuri WL, Barbosa AJA, Michalick MSM, Genaro O, França-Silva JC. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* [Internet]. 1996 abr ; 38(2):81-89. [acesso 25 de julho de 2020]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651996000200001>

28. Reis AB, Martins-Filho AO, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis Research in Veterinary Science. [Internet]. 2006 ago [acessado em 2020 jul 25]; 81:68-75. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.09.011>

29. Yarali N, Fişgin T, Duru F, Kara A. Myelodysplastic features in visceral leishmaniasis. *American Journal of Hematology*. [Internet]. 2002 out [acessado em 2020 jul 26]; 71:191-195. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1002/ajh.10200>

30. Manzillo VF, Restucci B, Pagano A, Gradoni, Oliva G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniasis. *The Veterinary Record*. [Internet]. 2006, maio [aces-

sado em 2020 jul 20]; 158:690-694. Disponível em: <http://dx.doi.org.ez49.periodicos.capes.gov.br/10.1136/vr.158.20.690>

31. Sable MN, Sehgal K, Gadage VS, Subramanian PG, Gujral S. Megakaryocytic emperipolesis: A histological finding in myelodysplastic syndrome. *Indian journal of pathology & microbiology*. [Internet]. 2009 out-dez [acessado em 2020 jul 26]; 52(4):599-600. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0377-4929.56153>

32. Anosa VO, Logan-Henfrey LL, Shaw MK. A light and electron microscopic study of changes in blood and bone marrow in acute hemorrhagic *Trypanosoma vivax* infection in calves. *Veterinary pathology*. [Internet] 1992 jan [acessado em 2020 ago 31]; 29(1):33-45. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1177/030098589202900105>

33. Cunin P, Nigrovic PA. Megakaryocyte emperipolesis: a new frontier in cell-in-cell interaction. *Platelets*. [Internet] 2020 aug [acessado em 2020 ago 30]; 31(6):700-706. Disponível em: doi:<https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1693035>

34. Menezes RC, Figueiredo FB, Wise AG, Madeira MF, Oliveira RVC, Schubach TMP, et al. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. [Internet]. 2013 jan [acessado em 2020 jul 28]; 51:206-211. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.02123-12>

35. Queiroz NMGP, Silveira RCV, Noronha ACFJ, Oliveira TMFS, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in skin. *Veterinary Parasitology*. [Internet]. 2011 maio [acessado em 2020 jul 28]; 178:1-8. Disponível em: doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.033>

36. Quintella LP, Cuzzi T, Madeira MF, Okamoto T, Schubach AO. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-con-firmed american tegumentary leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. [Internet]. 2009 abr [acessa-do em 2020 jul 28] 51(2): 83-86. Disponível em: doi:<https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000200005>