



ADRIANA SILVA ALBUQUERQUE

**Padronização da técnica de imunocitoquímica no diagnóstico da
leishmaniose visceral canina**

**LAVRAS-MG
2019**



ADRIANA SILVA ALBUQUERQUE

**Padronização da técnica de imunocitoquímica no diagnóstico da
leishmaniose visceral canina**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras como
parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Ciências
Veterinárias, área de concentração
Patologia Animal, para obtenção do
título de mestre.

Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo

Orientador

Prof(a).Dra. Angélica T. Barth Wouters

Coorientadora

Prof(a). Dra. Mary Suzan Varaschin

Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Albuquerque, Adriana Silva.

Padronização da técnica da imunocitoquímica no diagnóstico da leishmaniose visceral canina : Standardization of the immunocytochemistry technique in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis / Adriana Silva Albuquerque. - 2019.

57 p.

Orientador(a): Djeison Lutier Raymundo.

Coorientador(a): Angélica T. Barth Wouters, Mary Suzan Varaschin.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Leishmaniose. 2. Imunocitoquímica. 3. Diagnóstico. I. Raymundo, Djeison Lutier. II. Wouters, Angélica T. Barth. III. Varaschin, Mary Suzan. IV. Título.

ADRIANA SILVA ALBUQUERQUE

**Padronização da técnica de imunocitoquímica no diagnóstico da
leishmaniose visceral canina**

Standardization of the immunocytochemistry technique in the diagnosis of
canine visceral leishmaniasis

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras como
parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Ciências
Veterinárias, área de concentração
Patologia Animal, para obtenção do
título de mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2019

Dr. Djeison Lutier Raymundo UFLA
Dr. Flademir Wouters UFLA
Dr. Luciana Sonne UFRGS

LAVRAS-MG

2019
DEDICATÓRIA

A todos os cães que deixaram esse mundo pela falta da oportunidade de cura,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Dou graças a Deus por ter colocado pessoas incríveis em minha vida, de ter nascido da mulher mais maravilhosa e guerreira que conheço, um exemplo de figura feminina, que me mostrou que tudo posso e que não há limite para os sonhos. Agradeço ao meu pai, homem trabalhador, de luta, que nunca mediu esforços por seus filhos. Aos dois, pai e mãe, dou graças pelos irmãos, com os quais tive uma infância fantástica e muito feliz.

Agradeço pela oportunidade do estudo, a qual meus pais não tiveram “sorte” de usufruir e por isso mesmo não mediram esforços para que eu tivesse esse direito! Que todos possam ter as mesmas oportunidades do aprender e que não seja cerceado nunca o privilégio de ensinar. Por isso, aos professores que passaram por minha vida muito obrigada!

Agradeço aos professores do SPV-UFLA, que além de mentores intelectuais, se tornaram orientadores também na vida! Meu orientador professor Djeison Raymundo, minhas coorientadora professora Angélica Wouters e professora Mary Suzan e professor Flademir Wouters, eu agradeço por cada ensinamento. Aos colegas pós-graduandos do laboratório agradeço pelo aprendizado e pela tolerância nos meus dias não muito bons.

Aos meus amigos Ivam Moreira e Matheus Reis, vocês foram meu norte na pós-graduação e me ofereceram ombro quando precisei, tenham minha eterna gratidão e amizade. Aos amigos Lucas Darakjan, Ana Cecília e Tauany Costa, agradeço todos os dias pelas vossas existências.

Aos estagiários e IC's, sempre digo que sem vocês o laboratório não anda. Muito obrigada pelo auxílio em tudo, em especial aos que estavam sempre por perto: Lucas Mesquita, Beatriz Vasconcelos, Ana Beatriz Souza, Vinícius Frota, Bruna Christina, Yara Evangelista e Maiky Firmino. Desejo todo sucesso a vocês.

À Universidade Federal de Lavras, que se tornou minha morada desde a graduação. Meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.” (Coríntios 13:1)

Resumo

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, parasito que infecta e se multiplica em células do sistema monocítico fagocitário de diversas espécies animais. São doenças enquadradas como negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e que afetam populações em diversos países. No Brasil já estão presentes em todas as regiões, causando prejuízos à saúde pública e onerações com tratamentos e prevenção. Antes associadas a áreas rurais, as leishmanioses hoje afetam também populações urbanas e os cães são considerados principais reservatórios da LV nesses ambientes. A transmissão do parasito se dá quando o inseto flebotomíneo ingere formas infectantes de leishmania ao realizar repasto sanguíneo em animais infectados, podendo transmitir esses parasitos em novo repasto. Para o diagnóstico da LV são utilizados o Teste Rápido Imunocromatográfico (TRI) para triagem e os testes sorológicos *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou Ensaio Imunoenzimático (EIE) e a Reação de Imunofluorescência direta (RIFI), além da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e o exame direto como confirmatórios. O exame direto, com a observação do parasito em amostras biológicas, é considerado teste padrão ouro, mas requer pessoal treinado para a identificação do protozoário na amostra. Métodos como a imunocitoquímica podem aumentar a acurácia dessa observação. O presente trabalho comparou 4 técnicas de preparação de amostras citológicas (*cellblock*, formol 10%, metanol e paraformaldeído/PBS) extraídas de medula óssea, pele e linfonodo, de 20 cães soropositivos para *Leishmania* sp., submetidas a protocolo de imunocitoquímica (ICQ). Com o protocolo de ICQ desenvolvido notou-se aumento de 15% de positivos em ICQ de medula óssea em relação ao exame citopatológico, de 30% na análise de linfonodos e de 5% para pele quando comparados aos exames citopatológicos, aumentando assim a eficiência do diagnóstico. As técnicas de fixação do material biológico apresentaram imunomarcagem satisfatórias com melhores resultados obtidos pela técnica de *cellblock* de agarose seguida pela fixação em formol a 10% e emblocamento em parafina, fixação em álcool metanol e por último a técnica de fixação em paraformaldeído/PBS.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused for protozoa of the genus *Leishmania*, a parasite that infects and multiplies in cells of the monocytic phagocytic system of several animal species. They are diseases framed as neglected by the World Health Organization (WHO) and affecting populations in several countries. In Brazil they are already present in all the regions, causing damages to the public health and wages with treatments and prevention. Previously associated with rural areas, leishmaniasis today also affect urban populations and dogs are considered the main LV reservoirs in these environments. The transmission of the parasite occurs when the phlebotomine insect ingests infectious forms of leishmania when performing blood ingestion in infected animals, being able to transmit these parasites in new ingestion. For the diagnosis of VL, the Rapid Immunochromatographic Test (TRI) for screening and the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) or Immunoenzymatic Assay (EIE) and the Direct Immunofluorescence Reaction (IFR) tests, in addition to the Polymerase Chain Reaction (PCR) and direct examination as confirmatory. Direct examination, with the observation of the parasite in biological samples, is considered gold standard test, but requires personnel trained in the identification of the protozoan in the sample. Methods such as immunocytochemistry may increase the accuracy of this observation. The present work compared 4 techniques for the preparation of cytological samples (cellblock, 10% formaldehyde, methanol and paraformaldehyde / PBS) extracted from bone marrow, skin and lymph node of 20 dogs seropositive to *Leishmania* sp., Submitted to an immunocytochemistry protocol (ICQ) . With the ICQ protocol, a 15% positive increase in bone marrow ICQ was observed in relation to cytopathological examination, 30% in lymph node analysis and 5% in skin when compared to cytopathological tests, thus increasing the efficiency of the diagnosis. The techniques of fixation of the biological material presented satisfactory immunostaining with better results obtained by the agarose cellblock technique followed by fixation in 10% formaldehyde and paraffin embedding, fixation in alcohol methanol and lastly the fixation technique in paraformaldehyde / PBS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Técnica de fixação de amostras biológicas. <i>Cellblock</i> de agarose em cassete histológico.....	28
Figura 2 - Técnica de fixação de amostras biológicas. Fixação em formol 10%, filtração (A) e acomodação em cassete histológico (B).....	29
Figura 3 - Técnica de fixação de amostras biológicas. Fixação em metanol e distensão lâmina histológica.	30
Figura 4 – Técnica de fixação de amostras biológicas. Fixação em paraformaldeído/PBS e distensão em lâmina histológica.....	30
Figura 5 - Cão 1 (A) e cão 4 (B). LVC. Exame físico – bom estado corporal	33
Figura 6 – Cão 3 (A) e cão 7 (B). LVC. Exame físico - alopecia e descamação cutânea em face.	34
Figura 7 – Cão 16 (A) e cão 7 (B). LVC. Exame físico - Crostas e ulcerações em porção distal de pina.....	34
Figura 8 – Cão 1 (A) e cão 16 (B). LVC. Exame físico - onicogribose.	34
Figura 9 – Cão 7 (A e B). LVC. Exame físico, palpação de linfonodo poplíteo (A) e linfonodo axilar em necropsia (B) de animal apresentando linfadenomegalia.	35
Figura 10 – Cão 14 (A) e cão 10 (B). LVC. Necropsia - baço aumentado de volume	35
Figura 11 - Medula óssea. ICQ. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp.em técnica de fixação por <i>cellblock</i> de agarose (A); em formol a 10% (B); álcool metanol (C) e paraformaldeído (D). (ICQ revelado com VECTOR®NovaRED e contra-corado com hematoxilina – Obj. 40x).	41
Figura 12 - Pele. ICQ. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp.em técnica de fixação por <i>cellblock</i> de agarose (A); em formol a 10% (B); álcool metanol (C) e paraformaldeído (D).(ICQ revelado com VECTOR®NovaRED e contra-corado em hematoxilina – Obj. 40x).	42

Figura 13 – Linfonodo. ICQ. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. em técnica de fixação por *cellblock* de agarose (A); em formol a 10% (B); álcool metanol (C) e paraformaldeído (D). (ICQ revelado com VECTOR®NovaRED e contra-corado em hematoxilina – Obj. de 40x).....43

Gráfico1 – Dados sobre exames citopatológicos para pesquisa de leishmania realizados no SPV-UFLA entre os anos de 2013 e 2018.....35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1– Resultados da intensidade de formas amastigotas de *Leishmania* sp. por amostra biológica avaliada em lâmina citológica de 20 cães sororreagentes para *Leishmania* sp.....37
- Tabela 2–Resultados dos exames citopatológico e de imunocitoquímica de amostras biológicas de 20 cães sororreagentes para *Leishmania* sp.38
- Tabela 3– Quantidade de formas amastigotas de *Leishmania* sp. observadas em lâminas de imunocitoquímica de diferentes amostras biológicas de 20 cães sororreagentes para *Leishmania* sp.39
- Tabela 4– Média de células nucleadas observadas em lâminas de imunocitoquímica de diferentes amostras biológicas de 20 cães sororreagentes para *Leishmania* sp. 44
- Tabela 5– Coeficiente de correlação entre quantidade de células nucleadas e formas amastigotas de *Leishmania* sp.45

LISTA DE ABREVIATURAS

µm	Micrômetros
Cm	Centímetros
CP	Citopatológico
EIE	Ensaio imunoenzimáticos
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ICQ	Imunocitoquímico
IL	Interleucina
LVC	Leishmaniose visceral canina
LV	Leishmaniose visceral
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
°C	Grau Celsius
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RIFI	Imunofluorescência indireta
RPM	Rotação por minuto
Sp	Espécie
SPV	Setor de Patologia Veterinária
T1	Técnica 1
T2	Técnica 2
T3	Técnica 3
T4	Técnica 4
Th	T helper
TRI	Teste rápido imunocromatográfico
UFLA	Universidade Federal de Lavras

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivos Gerais.....	18
2.2	Objetivos específicos	18
3.	JUSTIFICATIVA	19
4.	REVISÃO DE LITERATURA	21
4.1	Leishmaniose visceral	21
4.1.1	Aspectos epidemiológicos.....	22
4.1.2	Ações de vigilância e controle no Brasil	23
4.1.3	Patogênese.....	23
4.1.4	Diagnóstico	24
5.	MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1	Delineamento do estudo	26
5.2	Exame físico dos animais.....	26
5.3	Coleta de amostras para citologia e imunocitoquímica.....	27
5.4	Tratamentos das amostras.....	27
5.5	Técnicas de fixação de amostras de células em lâminas histológicas.....	28
5.5.1	Emblocamento em gel de agarose (<i>cellblock</i>) (T1)	28
5.5.2	Fixação em formol 10% (T2).....	29
5.5.3	Fixação em metanol (T3)	29
5.5.4	Fixação em solução de paraformaldeído (T4)	30
5.6	Técnica de imunocitoquímica	31
5.7	Análise estatística	32
6.	RESULTADOS	33
6.1	Exame físico	33
6.2	Exame citopatológico	35

6.2.1	Coleta de dados retrospectivos de exames citopatológicos	35
6.2.2	Exames citopatológicos (CP)	36
6.3	Exames de imunocitoquímica (ICQ)	37
6.4	Estatística	45
7.	Discussão.....	47
8.	Conclusão	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		51
ANEXO A.....		56
ANEXO B.....		57

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por protozoários e de importância mundial. No Brasil o agente causador da LV é *Leishmania infantum* e os vetores são insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomia* sp., sendo *L. longipalpis* o de maior importância. Os casos de LV no País vêm aumentando nas últimas décadas, tanto em humanos quanto em cães, que constituem o principal reservatório (ALVAR et al., 2004, BRASIL, 2017). As leishmanioses possuem caráter crônico e acometem pessoas de todas as idades e sexo, porém crianças e idosos são mais suscetíveis (BRASIL, 2017). A Organização Mundial da Saúde estimou em 2015 300.000 novos casos/ano de LV, com mais de 20.000 mortes em todo o mundo (WHO, 2015). *Leishmania* é um parasito intracelular do sistema fagocítico mononuclear, que promove supressão reversível e específica da imunidade celular. Dessa forma permite a multiplicação descontrolada do protozoário e a disseminação em seu hospedeiro. Possui tropismo por órgãos como baço, medula óssea, linfonodos e fígado. Pacientes com leishmaniose podem não apresentar sintomas e, quando os apresentam, observam-se febre baixa e persistente, hepatomegalia, esplenomegalia, caquexia, aumento dos níveis de gamaglobulina e pancitopenia (MARZOCHI et al., 1985). Nos cães observa-se doença de caráter insidioso, que pode ser subclínica ou com manifestações clínicas dependentes da resposta imunológica de cada animal (GONTIJO; MELO, 2004).

Segundo as recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), o diagnóstico da leishmaniose em humanos deve ser feito a partir de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaios imunoenzimáticos (EIE), podendo se lançar mão de testes rápidos imunocromatográficos para triagem. Na RIFI, com resultado expresso em diluições, são aceitas como positivas diluições a partir de 1:80. O diagnóstico parasitológico, porém, é o método de certeza, por se basear na observação do parasito no material colhido de punções de baço, fígado, linfonodo, medula óssea ou escarificação da pele. O diagnóstico da doença canina é semelhante ao realizado em humanos, podendo ser baseado no exame sorológico, com utilização de testes rápidos para triagem e, como confirmatórios, o ELISA ou parasitológico (BRASIL, 2017). A PCR é uma importante ferramenta diagnóstica, porém por ser dispendiosa, não é a preferência em ações da Vigilância em Saúde. Cães subclínicos podem ter resultado negativo nos testes

sorológicos (ASSIS et al., 2010) além de poder haver reação cruzada com tripanossomíases (*T. cruzi*) na RIFI e no ELISA, sendo a PCR o teste mais confiável nesses casos (TRONCARELLI et al., 2009). Esta, porém, nem sempre é acessível em relação ao preço e à disponibilidade. O teste citopatológico é uma alternativa rápida e de baixo custo para visualização direta do parasito em amostras obtidas de tecidos (SANTOS, 2011) e a sensibilidade desse teste pode ser aumentada associando técnicas de imunomarcção em amostras citológicas (imunocitoquímica), desde que sejam utilizadas técnicas e marcadores adequados (FOWLER; WHITNEY, 2008).

Animais positivos para *Leishmania* sp. possuem recomendação, por parte do Ministério da Saúde, de serem encaminhados para eutanásia como medida de controle da doença porém, em portaria publicada em 2016, por meio de nota técnica, o Ministério da Agricultura, juntamente com o Ministério da Saúde, liberaram o uso do fármaco Miltefosina para tratamento da LVC (BRASIL, 2016). O licenciamento do uso da Miltefosina para o tratamento de cães corroborou a importância de diagnósticos mais precisos, a fim de que os tutores possam optar pela terapia medicamentosa e para o acompanhamento da evolução do tratamento.

A padronização de métodos de coleta, confecção de lâminas citológicas e protocolo de imunocitoquímica podem servir de opção complementar para testes sorológicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Padronização do exame de imunocitoquímica para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina (LVC).

Avaliação da efetividade da imunocitoquímica como método complementar ao exame sorológico no diagnóstico da LVC.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar técnicas de fixação de células em lâminas de vidro;
- Comparar intensidade de parasitismo em diferentes amostras biológicas (medula óssea, linfonodo e pele);
- Relacionar *status* clínico à intensidade de parasitismo

3. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses, doenças transmitidas por vetores, constituem um grande desafio para a saúde pública e o cão ainda é considerado principal reservatório urbano da LV (ALVAR et al., 2004, BRASIL, 2017). No Brasil a quantidade de cães domiciliados cresce a cada ano e segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2013, ano do último senso realizado no país também dedicado à população urbana animal, o país tem cerca de 52,2 milhões de cães, ocupando o segundo lugar no cenário mundial em população canina (IBGE, 2013). Como a recomendação por parte do Ministério da Saúde como uma das medidas do programa de controle da doença é a eutanásia dos cães positivos (BRASIL, 2016), adequadas técnicas de diagnóstico são primordiais.

No ano de 2016 o Ministério da Saúde recebeu 3.626 notificações de casos de LV em humanos, com 275 mortes registradas em todo o País (BRASIL, 2016). Dados sobre a infecção e o número de cães submetidos à eutanásia não são precisos, devido à falta de diagnóstico e a não exigência de subnotificação. Cabe aos municípios o acompanhamento e a monitoração de casos de LV em humanos e cães. Os testes preconizados pelo Ministério da Saúde são os sorológicos e TRI (BRASIL, 2017), porém diversos estudos questionam dados de especificidade desses testes (ASSIS et al., 2010, TRONCARELLI et al., 2009), então exames complementares que demonstram a presença do agente, como a PCR e o exame parasitológico direto, são utilizados por clínicos veterinários para confirmar o diagnóstico, orientando a conduta clínica (OLIVEIRA et al., 2011). Em trabalho realizado em 2011 na cidade de Botucatu (estado de São Paulo, Brasil), Silva e colaboradores utilizaram em seu estudo 155 cães eutanasiados pelo serviço de vigilância do município do Rio de Janeiro, Brasil, devido a sorologia positiva (RIFI 1:40). Destes, apenas 29 foram positivos em cultura parasitológica e na sua análise desta, apenas em 14 foi detectada *L. infantum*, sendo ainda encontrada *L. braziliensis* em cinco amostras e *Trypanosoma caninum* em outros sete cães. Graças à semelhança genética entre *L. infantum* e *T. cruzi* pode haver reações cruzadas nos exames sorológicos entre essas espécies de tripanosomatídeos gerando falsos positivos e até mesmo falsos negativos. Em estudo realizado de 100 cães avaliados em teste de anticorpo fluorescente, 65% das amostras foram positivas para *Leishmania* sp. e 40% para *T. cruzi*. Ao realizarem exame parasitológico direto e PCR de fígado e baço, os autores observaram

respectivamente que 59% e 76% das amostras de fígado e 51% e 72% das amostras de baço de cães eram positivos para *Leishmania* sp. (TRONCARELLI et al., 2009).

A imunomarcção em cortes histológicos ou materiais provenientes de coletas citológicas aumenta a acurácia diagnóstica de testes diretos e a descrição das técnicas realizadas é de extrema importância para critério de escolha da mais adequada, o que permite compará-las (SHIVAKUMARSWAMY et al., 2012).

O presente trabalho compara a eficiência na fixação do material celular em lâminas citológicas através da utilização de quatro técnicas diferentes, em amostras biológicas de cães sororreagentes para *Leishmania* sp. fornecendo informações sobre a efetividade dessas técnicas e pluralizá-las.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Leishmaniose visceral

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, cuja transmissão ocorre através de vetores artrópodes do gênero *Lutzomyia*. *Leishmania* sp. pertence à classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida e à família Trypanosomatidae (ROSS, 1903). Mais de vinte espécies de leishmania foram descritas parasitando humanos e foram agrupadas em complexos, de acordo com características, são estes: complexo *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*. Onze dessas espécies são do subgênero *Leishmania* (ROSS, 1903) e onze do subgênero *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1998), sendo que *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawie*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi* causam doença em humanos (LAINSON et al., 1994), e *L. infantum* é a mais importante em termos epidemiológicos no Brasil, responsável pela leishmaniose visceral humana e canina (BRASIL, 2017).

L. infantum possui uma fase de desenvolvimento no hospedeiro artrópode e uma fase em um hospedeiro vertebrado. Quando o inseto realiza o repasto sanguíneo em um vertebrado portador de leishmania ingere formas amastigotas, as quais se diferenciam no trato gastrintestinal do inseto em formas promastigotas procíclicas. Estas se multiplicam e se diferenciam em metacíclicas, que chegam até a válvula faringiana do flebotomíneo. A transmissão ocorre quando as fêmeas realizam novo repasto sanguíneo, regurgitando as formas promastigotas infectantes. O ciclo completo do parasito no inseto dura em torno de 72 horas (PIMENTA et al., 2003).

Os flebotomíneos vetores da leishmaniose são artrópodes dípteros e holometabólicos (possuem os estágios de vida ovo, larva, pupa e adulto). São muito pequenos, de corpo delgado e superfície pilosa, medem aproximadamente 0,25 cm, possuem pernas longas e asas lanceoladas, as quais permanecem abertas ao pousarem em uma superfície. Somente as fêmeas ingerem sangue, importante para o desenvolvimento ovariano. A alimentação principal do flebotomo é constituída de carboidratos encontrados em matéria orgânica, a qual

também serve de abrigo a esses insetos. Eles possuem hábitos crepusculares a noturnos (FORATTINI, 1973; BRASIL, 2017).

Após um período de 72 horas as fêmeas que se infectaram com formas amastigotas podem realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado e eliminar as formas promastigotas infectantes na saliva. Na epiderme do hospedeiro, os protozoários são fagocitados por células do sistema monocítico fagocitário, há formação de vacúolo parasitóforo no interior de macrófagos e os protozoários se diferenciam em amastigotas nessas células. Estas formas podem ser liberadas, infectando novos macrófagos, que podem ser transferidos para outros tecidos, como baço, linfonodos, fígado, medula óssea e pele. A transmissão ocorre enquanto houver parasitos na pele e/ou no sangue periférico do hospedeiro (BRASIL, 2016).

Os cães constituem o principal reservatório da LV, porém outras espécies de mamíferos, pertencentes às ordens Primata, Carnivora, Rodentia, Didelphimorphia, Artiodactylae à superordem Xenarthra possuem importância como reservatórios das espécies de leishmania (LAINSON; SHAW, 1998). As aves domésticas, principalmente galináceas, possuem importância, pois podem gerar ambiente favorável à proliferação do flebotomíneo, por causa dos dejetos gerados por esses animais. Didelfídeos, como os gambás, também demonstraram importância na mediação entre o ciclo silvestre e o urbano da LV (BORGES et al., 2009).

4.1.1 Aspectos epidemiológicos

Inicialmente a LV possuía um caráter rural no Brasil, porém a expansão para áreas urbanas mais populosas foi ocorrendo com o passar dos anos. Segundo dados do Ministério da Saúde, de 1999 a 2016 houve registro de 84.922 casos de LV em humanos, abrangendo todas as regiões brasileiras, inclusive estados da Região Sul, até então livres da doença (SINAN, 2016). Na década de 90, a maior porcentagem de casos (90%) se concentrava na Região Nordeste, o que foi se modificando com a expansão para outras regiões (WERNECK, 2010).

Fatores como o desmatamento e as mudanças climáticas são associados à ocorrência das leishmanioses no Brasil e no mundo. Quando ocorre o corte das árvores, a decomposição gradual da matéria orgânica vegetal promove alterações nos locais de abrigo e criadouros dos flebotomíneos, os quais acabam por

explorar novos ambientes, aproximando-se de áreas urbanizadas (ARAUJO FILHO, 1981; WHO, 2002). Em estudo publicado em 2016, Mendes e colaboradores correlacionaram o aumento do período de chuvas em algumas regiões brasileiras com o aumento do número de internações decorrentes de leishmaniose.

4.1.2 Ações de vigilância e controle no Brasil

Em 2003, o Ministério da Saúde lançou o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, de caráter informativo, que explana sobre características gerais da doença, aspectos clínico-laboratoriais, tratamento, ações em vigilância epidemiológica e medidas de prevenção e controle da LV no Brasil (BRASIL, 2016). As ações da vigilância em saúde são direcionadas à vigilância entomológica, à identificação de casos humanos e caninos. A cartilha propõe que, em caso de diagnóstico da doença humana, a notificação aos órgãos competentes deverá ser compulsória. O diagnóstico deve ser feito o mais rápido possível, com tratamento e acompanhamento, respeitando os níveis de complexidade do Sistema Único de Saúde (SUS). No caso dos cães a recomendação é, assim que detectada a doença por meio de exame sorológico, a eutanásia (BRASIL, 2017).

4.1.3 Patogênese

A LV é caracterizada por amplo espectro clínico, que compreende desde manifestações discretas (oligossintomáticas), moderadas a graves. É uma doença de evolução crônica, de sinais clínicos inespecíficos, tanto em humanos quanto em cães. Em humanos pode se observar febre prolongada, esplenomegalia e hepatomegalia e evolução para caquexia e imunodepressão, muitas vezes com agravamento do quadro por infecções secundárias (CONTI; PINTO JUNIOR, 2015). Ao chegar ao sistema monocítico fagocitário o protozoário se utiliza dos macrófagos para alcançar os órgãos linfoides do hospedeiro. É nestas células que ocorre a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, que sofrem fissão binária, multiplicam-se dentro das células fagocitárias e assim chegam ao baço, ao fígado, à medula óssea e aos linfonodos, o que caracteriza a cronicidade da doença (BANETH, 2012). Além disso, a entrada rápida em macrófagos permite o escape dos mecanismos microbicidas dos neutrófilos (MACHADO et al., 2004).

No macrófago ocorre o processamento e a apresentação do epítopo às células T, tanto à linhagem Th1 quanto Th2. A primeira gera uma resposta induzida por células, com liberação das interleucinas IL-2 e IL-12, interferon-gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral, com ativação de novos macrófagos e aumento da efetividade das células fagocitárias. Já a resposta do tipo Th2 gera liberação de IL-4, IL-5 e IL-10 e fator de transformação e crescimento beta (TGF- β), estimulando uma resposta adaptativa, ou seja, mediada por anticorpos (BACELLAR et al., 2000). O tipo de resposta predominante se deve ao caráter genético e individual (DAY, 2007). Assim, a resistência ou a suscetibilidade está ligada ao tipo de resposta apresentada pelo organismo, sendo a do tipo Th1 protetiva e a do tipo Th2 supressora de resposta à LV (BACELLAR et al., 2000).

O tipo de resposta está intimamente ligado ao curso clínico do paciente. Assim, quando a resposta mediada por células é predominante, o sistema imune é capaz de combater a infecção e a doença permanece subclínica (CARNEIRO, 2016). A persistência de um perfil tipo Th2 faz com que ocorra estímulo para a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B, então o animal apresenta altos títulos de anticorpos, com manifestação clínica. A exacerbada produção de células B e macrófagos promove esplenomegalia, linfadenomegalia, hepatomegalia e hipergamaglobulinemia (FEITOSA et al., 2000). O aumento de gamaglobulina causa processos inflamatórios em diversos órgãos, pois promove o depósito de imunocomplexos nas paredes dos vasos (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

4.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico preconizado pelo Ministério da Saúde em humanos se baseia no exame sorológico de RIFI e ELISA, aceitando-se como positivas diluições a partir de 1:80 na RIFI. Se os títulos forem iguais a 1:40 deve ser solicitado reteste após 30 dias (BRASIL, 2017).

Pode ser realizado exame parasitológico, sendo a medula óssea o local de eleição para coleta. O procedimento é realizado colocando-se uma gota do material aspirado em lâmina de vidro, fazer esfregaço, secagem e fixação do material em álcool metílico, prosseguindo com coloração de Giemsa, Wrigth ou Panótico. Deve se examinar 200 campos microscópicos (objetiva de 40x) para que se considere uma lâmina negativa (BRASIL, 2016, 2017).

O exame diagnóstico para a LVC é semelhante ao dos humanos e pode ser baseado nos testes sorológicos ou parasitológico, sendo esse último o método de certeza (especificidade de 100%), por se basear na visualização do parasito em material proveniente de aspirados de fígado, linfonodos, baço, medula óssea ou escarificação de pele, porém é de difícil realização em programas de saúde pública e necessita de profissional qualificado para análise (BRASIL, 2016).

Para triagem de animais foi validado um teste rápido em 2011, o chamado teste rápido imunocromatográfico (TRI). Ele detecta as imunoglobulinas G (IgG) que se ligam à proteína recombinante rK39, que é derivada de um antígeno específico encontrado no complexo *L. donovani*. Os TRIs são realizados usando-se uma gota de sangue total ou soro e o resultado sai em cerca de 20 minutos (MARCELINO; SOUZA FILHO, 2015). Porém a utilização de testes rápidos com utilização da rK39 possuem sensibilidade reduzida (61 a 75%) se comparados ao EIE, além de estudos sugerirem reação cruzada com outras infecções (REITHINGER et al., 2002).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

O estudo trata do emprego de técnicas diagnósticas para LVC utilizando-se os exames citológico e imunocitoquímico, bem como padronização de uma técnica mais simples rápida e de maior acurácia.

Foi realizado ensaio pré-experimental com coleta de dados dos exames citológicos realizados no SPV-UFLA no período de 1 janeiro de 2013, quando os primeiros casos de LVC começaram a ser diagnosticados na cidade de Lavras, a 1 de janeiro de 2018, para observação da frequência das requisições para diagnóstico citopatológico de LVC e quais órgãos eram preferenciais para a pesquisa do parasito.

Foram utilizadas amostras biológicas de 20 cães sororreagentes para LVC no ELISA (titulação acima de 1:80), provenientes Secretaria de Vigilância Epidemiológica da Prefeitura Municipal de Lavras, Minas Gerais, Brasil

O experimento foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais em pesquisa da Universidade Federal de Lavras sob número de Protocolo 010/18 em 22/03/2018.

5.2 Exame físico dos animais

Os cães passaram por exame físico, em que foram anotados os dados do animal, como sexo, raça e estado corporal, Realizou-se avaliação da pele, mucosas, unhas; além da palpação de linfonodos e abdômen para avaliação do baço. Os animais receberam classificação de acordo com os sinais clínicos em: assintomáticos (sem sinais clínicos), oligossintomáticos (com até três sinais) e sintomáticos (mais de três sinais clínicos) de acordo com classificação proposta pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2016). Esses animais foram submetidos à eutanásia no SPV-UFLA, como preconizado pelo Ministério da Saúde para cães soropositivos (BRASIL, 2017). O método de eutanásia foi realizado conforme orientações do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012).

5.3 Coleta de amostras para citologia e imunocitoquímica

Amostras biológicas de três sítios utilizados comumente nas rotinas clínicas foram coletadas; punção aspirativa de linfonodo poplíteo, punção de medula óssea em extremidade proximal de fêmur e raspado cutâneo profundo em regiões com alopecia (periorbital e região distal de pina), ou em caso de ausência de lesões de pele, da região distal da pina. Nas áreas de coleta foi realizada tricotomia com lâmina e antissepsia com clorexidina degermante a 2%.

Para punção foram utilizadas agulhas calibre 0,8 mm (25x8) em linfonodos e 1,6 mm (40x16 mm) para coleta de medula óssea, além de lâmina de bisturi para escarificação da pele.

As amostras provenientes de linfonodo poplíteo foram obtidas através de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), em que se acoplou a agulha a uma seringa de 10 mL, inseriu-se a agulha no linfonodo, onde pressão negativa foi aplicada com movimentos retráteis do êmbolo à medida que, com a agulha no interior do órgão, realizou-se movimentos de vai-vem. Posteriormente, com o êmbolo estável retirou-se o conjunto agulha-seringa dos tecidos, desacoplou-se a agulha da seringa, puxou-se o êmbolo, conectou-se a agulha novamente à seringa e depois, com um movimento único, o êmbolo foi empurrado para transferir o material colhido numa lâmina para esfregaço e para um tubo de ensaio para processamentos descritos adiante.

Para a técnica de punção de medula óssea foi utilizada a agulha de grosso calibre (40x16 mm), a qual foi introduzida na fossa trocantérica, na extremidade proximal do fêmur, com acoplamento de seringa de 10 mL e sucção de material medular para posterior processamento.

5.4 Tratamentos das amostras

Foram realizados quatro tratamentos para as amostras, com diferentes processos de fixação em lâminas de vidro silanizadas, para realização posterior de técnica de imunocitoquímica; confecção de bloco de agarose, em formol a 10%, fixação em metanol ou em paraformaldeído diluído em PBS (4%).

Amostras para exame citopatológico de rotina foram coletadas e realizada coloração de Romanowsky (Panótico rápido) e toda lâmina foi analisada seguindo em zigue-zague de uma extremidade à outra, para identificação das formas amastigotas de *Leishmania* sp., ou para atestar a negatividade da amostra. As

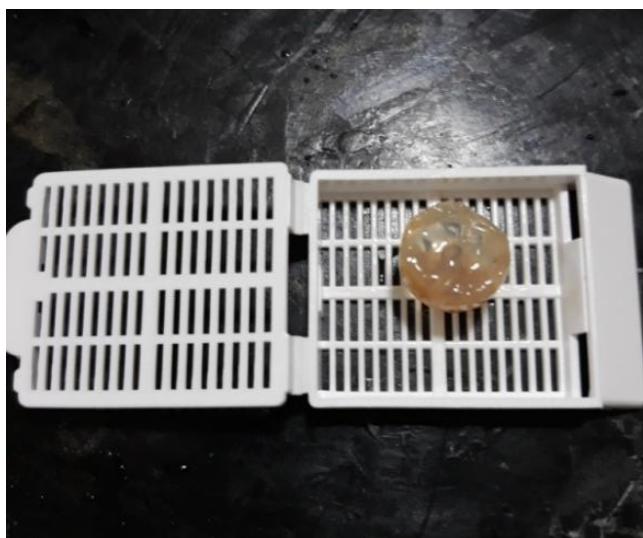
amostras positivas foram classificadas em negativas (-), + (leve, de 1 a 10 amastigotas em Objetiva de 40x), ++ (moderada, de 11 a 50 amastigotas em objetiva de 40x) e +++ (acentuada, acima de 50 amastigotas em objetiva de 40x) de acordo com a quantidade de formas amastigotas visualizadas.

5.5 Técnicas de fixação de amostras de células em lâminas histológicas

5.5.1 Emblocamento em gel de agarose (*cellblock*) (T1)

Na técnica baseada em Zanoni; Kleeb e Xavier (2013), as amostras citológicas dos três tecidos dos 20 cães foram dispostas em tubo de ensaio, nos quais houve o acréscimo de 2 mL de álcool 70°. O material foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado se acrescentou agarose líquida a 2%, ainda morna. A mistura do precipitado com a agarose foi homogeneizada e centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. Em seguida a amostra ficou refrigerada a 1 a 8°C, por 10 minutos. O pellet formado foi retirado do fundo do tubo, disposto em cassete histológico (FIGURA 1) e passou por processamento histotécnico de rotina (desidratação em etanol, diafanização em xileno, impregnação e inclusão em parafina), cortes realizados em micrótomo com espessura de 3 micrômetros, que foram dispostos em lâminas histológicas.

Figura 1 - Técnica de fixação de amostras biológicas. *Cellblock* de agarose em cassete histológico.

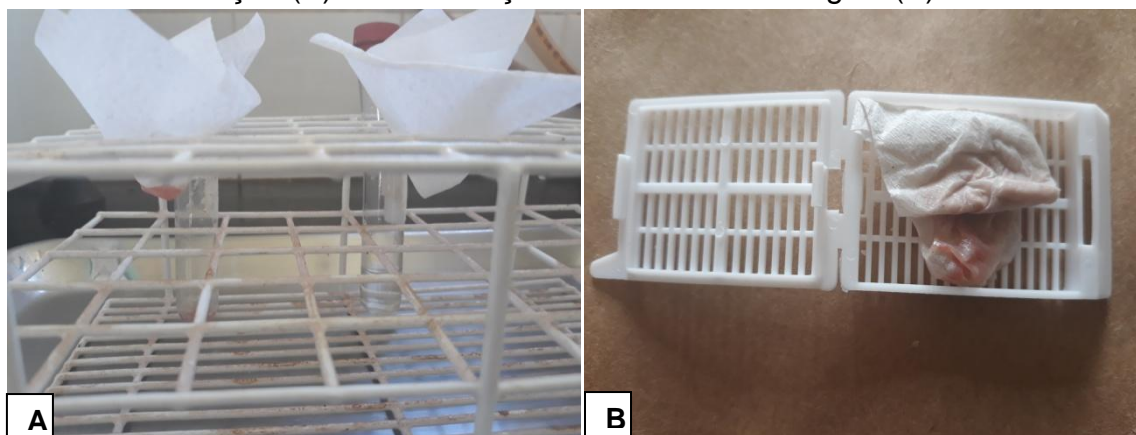


Fonte: do autor.

5.5.2 Fixação em formol 10% (T2)

Na técnica baseada em Ramos et al. (2012), o material coletado foi disposto em tubo de ensaio e diluído em 1 mL de solução de formol tamponado a 10%, centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos. O precipitado transferido para papel absorvente (FIGURA 2-A), disposto em cassete histológico (FIGURA 2-B) e encaminhado para processamento histotécnico de rotina (desidratação em etanol, diafanização em xileno, impregnação em parafina) e emblocado em parafina após a remoção do papel absorvente. O conglomerado de células emblocadas foi cortado em micrótomo com espessura de 3 micrômetros e disposto em lâminas de vidro silanizadas.

Figura 2 - Técnica de fixação de amostras biológicas. Fixação em formol 10%, filtração (A) e acomodação em cassete histológico (B).

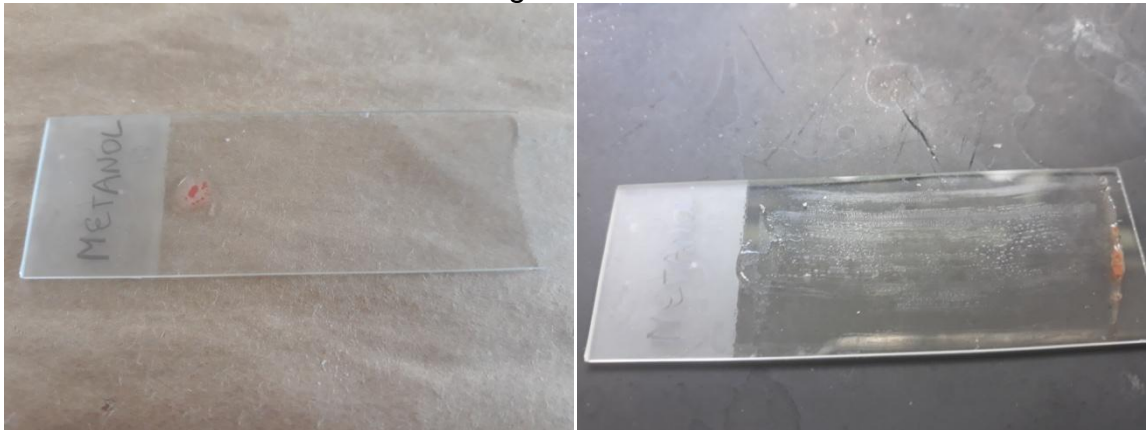


Fonte: do autor.

5.5.3 Fixação em metanol (T3)

A técnica de fixação em metanol foi baseada em Vasconcelos et al. (2016). Nessa técnica, o material coletado de medula óssea, pele e linfonodo foi disposto em lâminas silanizadas, fez-se a distensão da amostra lâmina de vidro com ajuda de outra lâmina (FIGURA 3). Após secar em temperatura ambiente, as lâminas ficaram mergulhadas em metanol por 3 minutos, lavadas por 3 minutos em água deionizada e ficaram em temperatura ambiente até secarem completamente.

Figura 3 - Técnica de fixação de amostras biológicas. Fixação em metanol e distensão lâmina histológica.

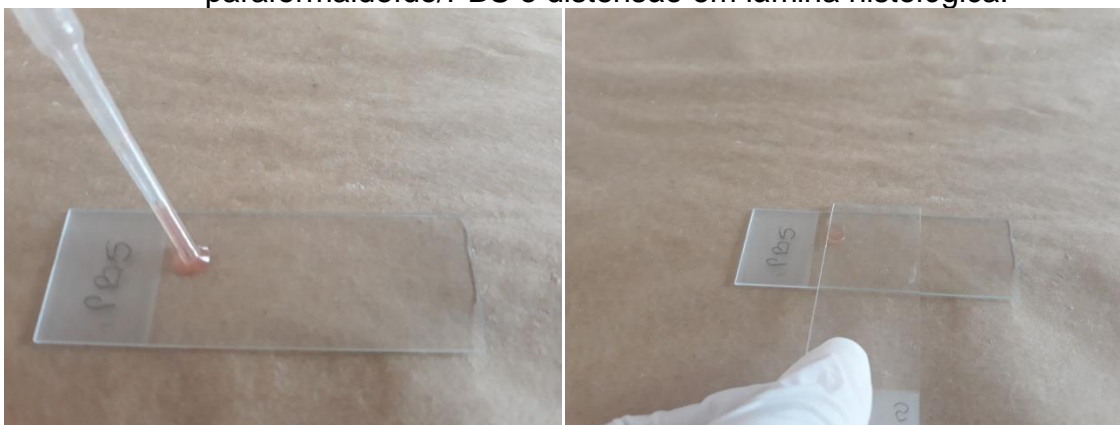


Fonte: do autor.

5.5.4 Fixação em solução de paraformaldeído (T4)

A solução de paraformaldeído utilizada nessa técnica foi confeccionada diluindo 4% desse reagente em PBS (Phosphate Buffered Saline). As amostras foram dispostas em tubo de ensaio e adicionou-se a solução de paraformaldeído em uma proporção de 1:2 (uma parte da amostra para duas partes de solução PBS-paraformaldeído). Após fixação por 15 minutos e centrifugação por 10 minutos a 3000rpm, o sobrenadante foi descartado e, com o uso de uma pipeta, as células do precipitado foram dispostas em lâminas silanizadas (FIGURA 4), nas quais foi distribuída a amostra e posteriormente foram secadas em temperatura ambiente.

Figura 4 - Técnica de fixação de amostras biológicas. Fixação em paraformaldeído/PBS e distensão em lâmina histológica.



Fonte: do autor.

5.6 Técnica de imunocitoquímica

Para protocolo de imunocitoquímica as lâminas de tecidos emblocados em parafina (T1 e T2) ficaram em estufa a 65°C para desparafinar por 40 minutos, foram banhadas em xileno por 20 minutos, em álcool 100% por 6 minutos, além de dez lavagens em álcool 90%, dez em álcool 80% e dez lavagens em álcool 70% e, então, lavadas em água deionizada por 3 minutos. As lâminas das técnicas 3 e 4 (T3 e T4) também ficaram imersas em água deionizada por 3 minutos.

As amostras dos quatro protocolos de fixação foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena, realizado por incubação em solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 10% durante 10 minutos, em temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada com solução de citrato de sódio 10 mM, pH 6,0 por 6 minutos em micro-ondas (3 minutos, verificação do nível de solução, mais 3 minutos) em potência máxima. Para bloqueio das proteínas inespecíficas se utilizou leite em pó desnatado Mólico® diluído a 10% em água destilada, por 55 minutos em temperatura ambiente.

Uma área de raio de cerca 1 cm foi marcada nas lâminas com caneta hidrofóbica para restringir a área dos reagentes.

Foi utilizado anticorpo primário policlonal anti-*Leishmania*, produzido em camundongos, obtido do Laboratório de Doenças Infecciosas (LIM-50) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na diluição de 1:400 e incubado em câmara úmida e escura a 37°C por 2 horas.

Posteriormente as lâminas foram lavadas em água deionizada e foram aplicados 100 mL de anticorpo secundário universal Dako EnVision®, e incubadas por 30 minutos em câmara úmida e escura. A revelação foi feita com cromógeno VECTOR®NovaRED por 6 minutos. As lâminas foram lavadas em água deionizada, contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 3 segundos, lavadas em água deionizada e secas em estufa por 5 minutos, mergulhadas em xileno e montadas com lamínula e Entellan®.

Após realização do protocolo as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico. Foram contabilizadas as formas amastigotas de *Leishmania* sp. imunomarcadas em seis campos de maior aumento (objetiva de 40x) e calculou-

se a média. Foi calculada também a média da quantidade de células nucleadas observadas em seis campos da lâmina em objetiva de 40x.

5.7 Análise estatística

Para verificar se há relação entre a média de células nucleadas colhidas nas amostras e a média de formas amastigotas contabilizadas em seis campos (objetiva de 40x) utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson e dispersão, confeccionado em planilha Microsoft Excel®. Através dessa análise pretendeu-se saber se há associação entre as variáveis e qual a intensidade dessa associação.

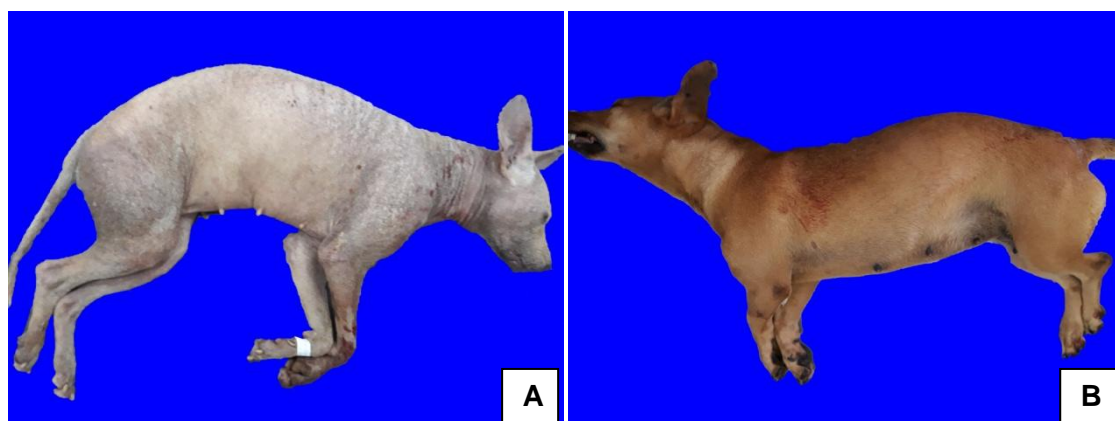
6. RESULTADOS

6.1 Exame físico

Dos cães avaliados no estudo 13 (65%) eram fêmeas e sete (35%) machos. A grande maioria (80%) não possuía padrão racial definido, dois (10%) eram da raça Poodle, um (5%) era Dobermann Pinscher e um (5%) Dachshund.

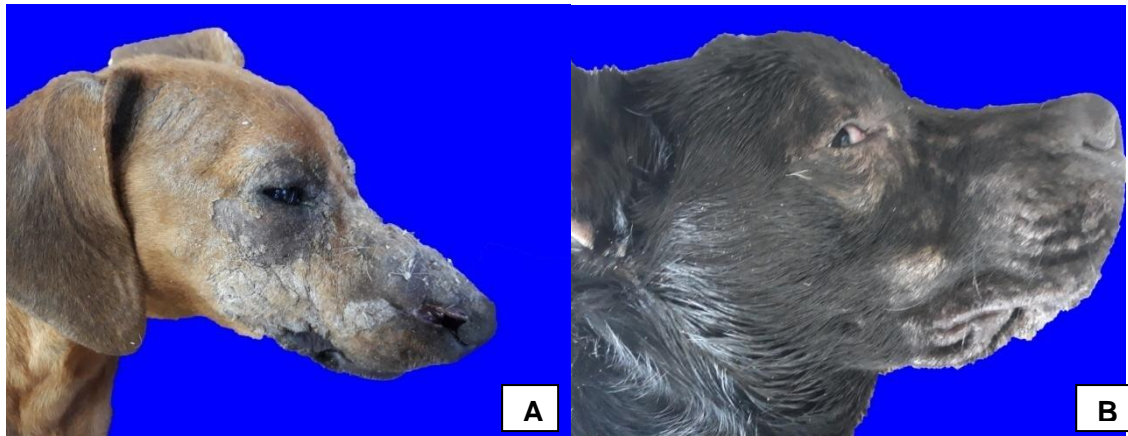
Metade dos cães estudados (10 animais) estava em boas condições corporais (FIGURA 5), com escore variando de 2 a 4 (sendo 1 para caquéticos e 5 para cães obesos); 35% dos animais apresentavam-se oligossintomáticos (até três sinais clínicos) e 65 % deles eram sintomáticos (mais de três sinais clínicos). Dentre os sinais apresentados 80% possuíam alopecia em face, em diferentes graus (FIGURA 6). Animais com ulcerações e crostas em pina somaram 75% (15 animais) (FIGURA 7), 45% (9 animais) apresentavam onicogrifose (FIGURA 8). Em relação aos linfonodos palpáveis, 15 dos 20 animais (75%) apresentavam aumento generalizado (FIGURA 9), enquanto 13 deles apresentavam baço palpável com percepção de bordos arredondados (aumento de tamanho) confirmados em necrópsia (FIGURA 10)

Figura 5 – Cão 1 (A) e cão 4 (B). LVC. Exame físico – bom estado corporal



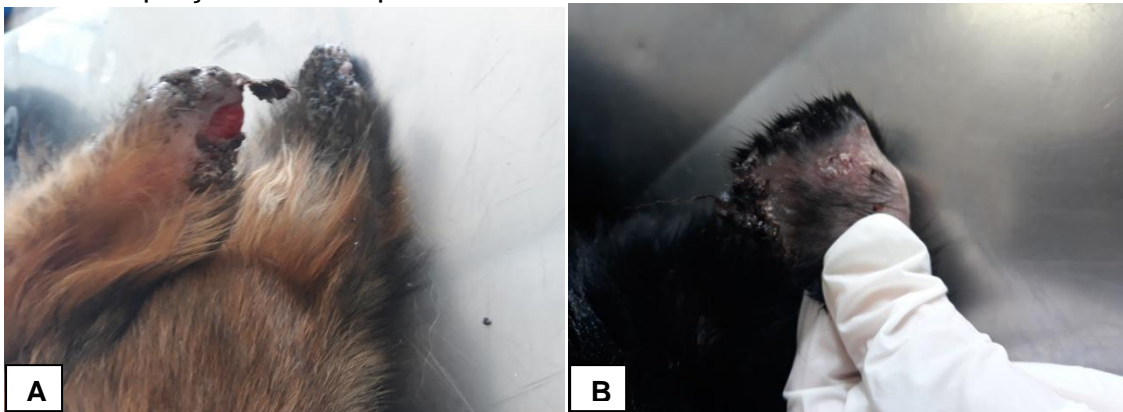
Fonte: do autor.

Figura 6 – Cão 3 (A) e cão 7 (B). LVC. Exame físico - alopecia e descamação cutânea em face.



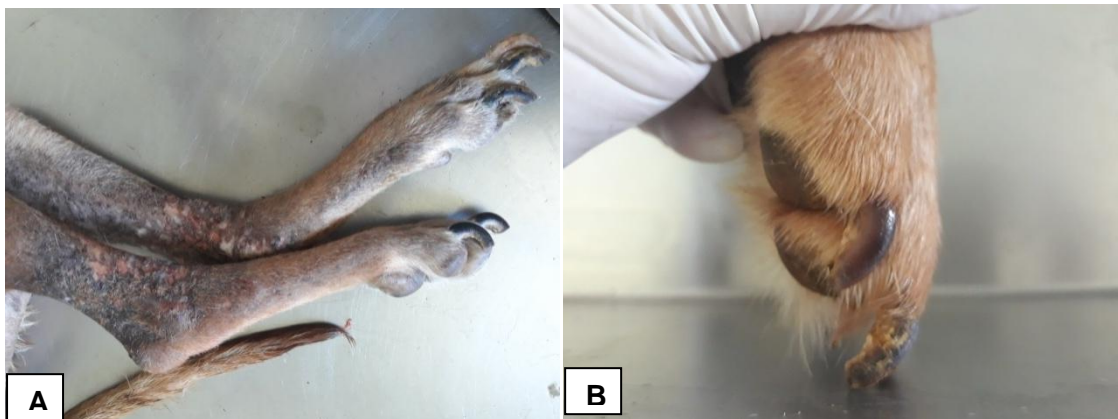
Fonte: do autor

Figura 7 – Cão 16 (A) e cão 7 (B). LVC. Exame físico - Crostas e ulcerações em porção distal de pinta



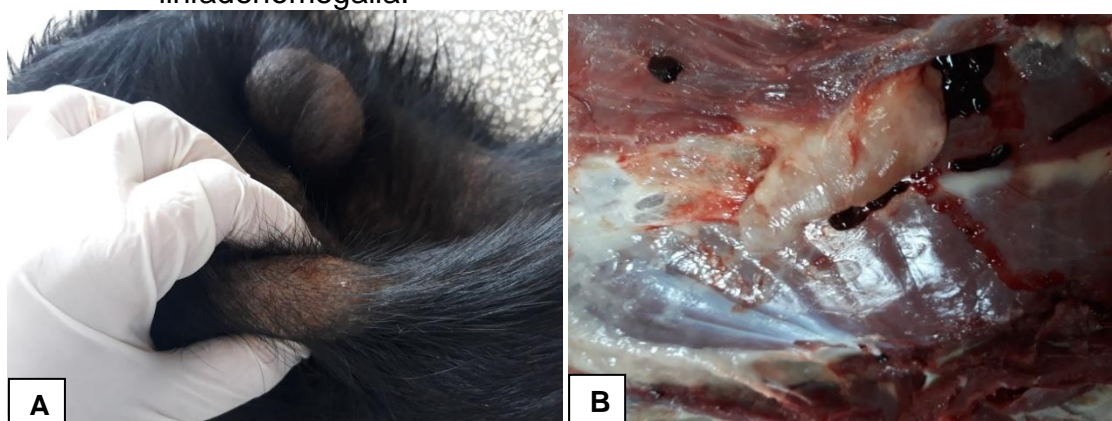
Fonte: do autor.

Figura 8 – Cão 1 (A) e cão 16 (B). LVC. Exame físico - onicogribose.



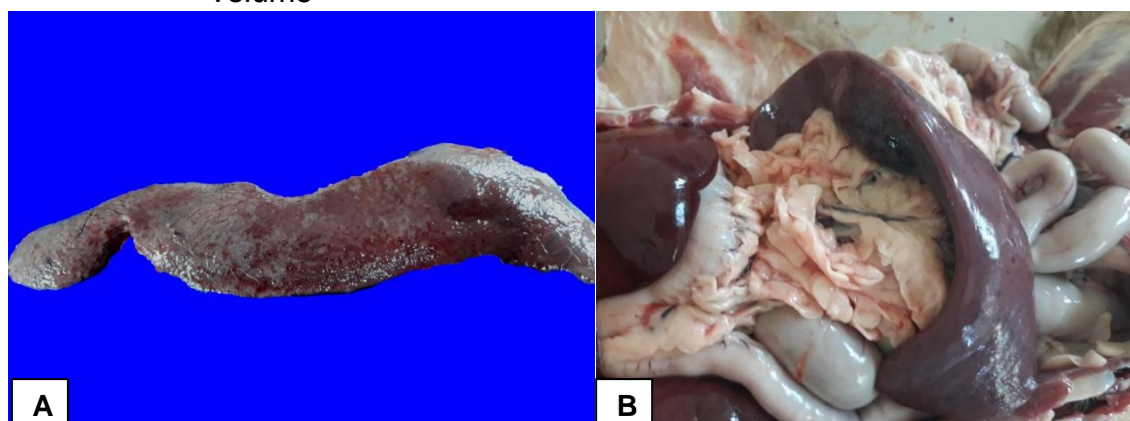
Fonte: do autor.

Figura 9 – Cão 7 (A e B). LVC. Exame físico, palpação de linfonodo poplíteo (A) e linfonodo axilar em necropsia (B) de animal apresentando linfadenomegalia.



Fonte: do autor.

Figura 10 – Cão 14 (A) e cão 10 (B). LVC. Necropsia - baço aumentado de volume



Fonte: do autor

6.2 Exame citopatológico

6.2.1 Coleta de dados retrospectivos de exames citopatológicos

De 1 janeiro de 2013 a 31 de janeiro de 2019 foram realizados 1.686 exames citopatológicos no SPV-UFLA, destes, 184 (11%) foram para pesquisa de *Leishmania*, com 127 exames apenas nos anos de 2017 e 2018 (GRÁFICO 1). As amostras biológicas mais frequentemente enviadas para análise foram linfonodo (52%), pele (24%), medula óssea (20%), baço (2%) e sangue (2%). Dentre elas, 37 (20%) amostras foram positivas e 37 negativas; 70 amostras (38%) foram inconclusivas e cinco continham material insuficiente, além de 35 (19%) com

outros diagnósticos, como processos inflamatórios sem a visualização de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

Gráfico 1 - Número de exames citopatológicos para pesquisa de leishmania realizados no SPV-UFLA entre os anos de 2013 e 2018.



Fonte: do autor

6.2.2 Exames citopatológicos (CP)

Foi realizado exame citológico de distensões de medula óssea, pele e linfonodo poplíteo dos 20 animais. Classificou-se quanto à quantidade de formas amastigotas observadas em: - (negativo), + (leve, de 1 a 10 formas amastigotas), ++ (moderado, de 11 a 50 formas amastigotas) e +++ (acentuado, acima de 50 formas amastigotas). Os dados obtidos podem ser vistos na Tabela 1:

Tabela 1 – Resultados da intensidade de formas amastigotas de por amostra biológica avaliada em lâmina citológica de 20 cães sororreagentes para *Leishmania* sp.

Amostra Animal	Medula óssea	Pele	Linfonodo
1	-	-	-
2	-	-	-
3	+	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	+	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	++	+	-
10	-	-	-
11	+	+	-
12	+	-	+
13	+	+	-
14	+	-	-
15	+	+	-
16	-	+++	++
17	-	-	-
18	-	-	-
19	+	++	-
20	+	-	-

Legenda: -: negativo; +: leve (1 a 10 amastigotas); ++: moderado (11 a 50 amastigotas); +++: acentuado (acima de 50 amastigotas).

Fonte: do autor.

6.3 Exames de imunocitoquímica (ICQ)

Após realização de protocolo de ICQ, 12 animais (60%) foram positivos em pelo menos uma das técnicas de fixação de amostras de medula óssea (FIGURA 8). Para pele (FIGURA 9) e linfonodo (FIGURA 10) foram oito animais positivos em ao menos uma das técnicas de fixação empregadas. Os resultados obtidos dos 20 animais, para as três amostras biológicas e respectivas técnicas de fixação em lâminas estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2–Resultados dos exames citopatológico e de imunocitoquímica de amostras biológicas de 20 cães sororreagentes para *Leishmania* sp.

Amostra	Medula óssea					Pele					Linfonodo					
	Animal	CP	T1	T2	T3	T4	CP	T1	T2	T3	T4	CP	T1	T2	T3	T4
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
4	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
10	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
12	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Total	9	12	11	12	9	7	6	7	6	5	2	7	7	6	5	

Legenda: +: positivo; -: negativo; CP: citopatológico; T1: *cellblock* de agarose; T2: formol 10%; T3: metanol; T4: paraformaldeído/PBS.

Fonte: do autor.

Contagens das formas amastigotas imunomarcadas foram realizadas em seis campos de maior aumento (objetiva 40x). As médias da quantidade de leishmanias/campo e os resultados por técnica foram agrupados na Tabela 3.

Tabela 3 – Quantidade de formas amastigotas de observadas em lâminas de imunocitoquímica de diferentes amostras biológicas de 20 cães sororreagentes para *Leishmania* sp.

Amostra	Medula óssea				Pele				Linfonodo				
	Animal	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2	1	1	1	0	0	0	0	0	12	23	5	1
4	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	5	1	6	1	1	1	0	5	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
9	12	22	112	9	57	0	3	1	0	0	0	0	0
10	3	15	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	16	10	17	7	0	8	1	3	0	3	0	3	3
12	1	2	7	2	0	0	0	0	1	3	4	2	2
13	27	15	23	9	16	22	3	1	5	25	7	1	1
14	71	35	55	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	2	7	3	4	1	2	2	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	IN	IN	IN	6	IN	IN	20	SM	SM
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	12	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	8	9	29	1	1	2	0	0	2	6	4	1	1
20	17	11	3	0	0	0	0	0	9	1	0	0	0
Média	9	6	13	2	14	12	11	1	12	13	2	1	1

Legenda: IN: incontáveis (acima de 200 amastigotas); SM: sem marcação; T1: *cellblock* de agarose; T2: formol 10%; T3: metanol; T4: paraformaldeído/PBS.

Fonte: do autor.

Pode se observar formas amastigotas de *Leishmania* sp. marcadas em ICQ para todas as técnicas de fixação e para os três tipos de material biológico, medula óssea (FIGURA 11), pele (FIGURA 12) e linfonodo (FIGURA 13).

Para medula óssea, os cães 3 e 4, e do 10 ao 20 foram positivos em ICQ em ao menos três das quatro técnicas de fixação testadas, sendo que ao cães 9, 13 e 14 apresentaram as maiores médias de formas amastigotas visualizadas. A

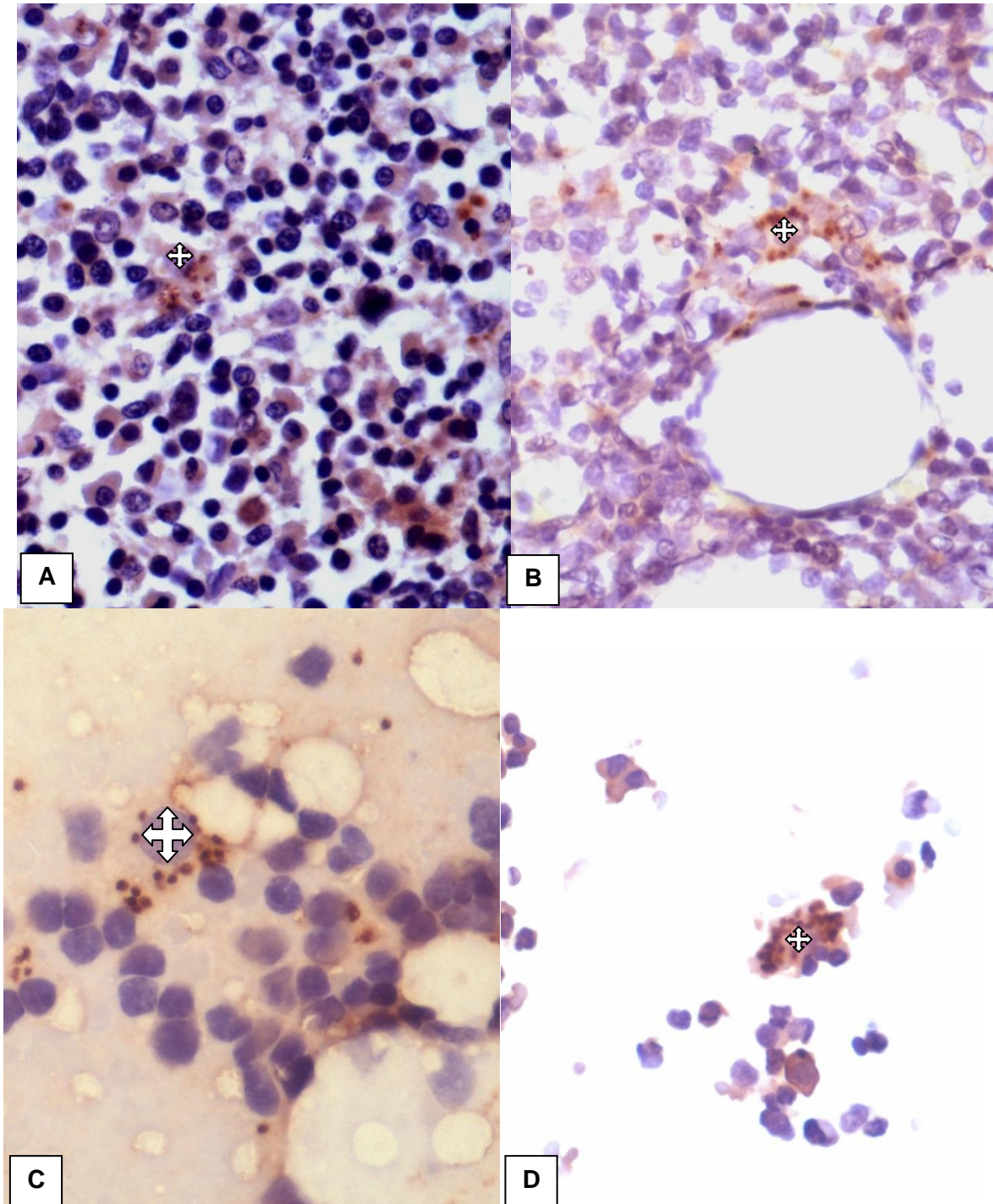
maior média de quantidade de amastigota foi obtida na técnica de fixação em metanol (T3), seguida da fixação em *cellblock* de agarose (T1), formol a 10% (T2) e paraformaldeído/PBS (T4).

Na contagem das formas amastigotas observadas em pele e linfonodo, a técnica T1 apresentou as maiores médias, seguido das técnicas T2, T3 e T4 respectivamente.

A técnica de fixação em metanol permitiu uma melhor visualização das formas amastigotas para quaisquer tipos de material biológico. Nessa técnica o tamanho das células foi maior em comparação às demais técnicas (FIGURAS 11C, 12C e 13C). Nas técnicas T1, T2 e T4 o tamanho do núcleo celular apresentou-se reduzido, além da retração citoplasmática observada (FIGURA 11 setas cruzadas).

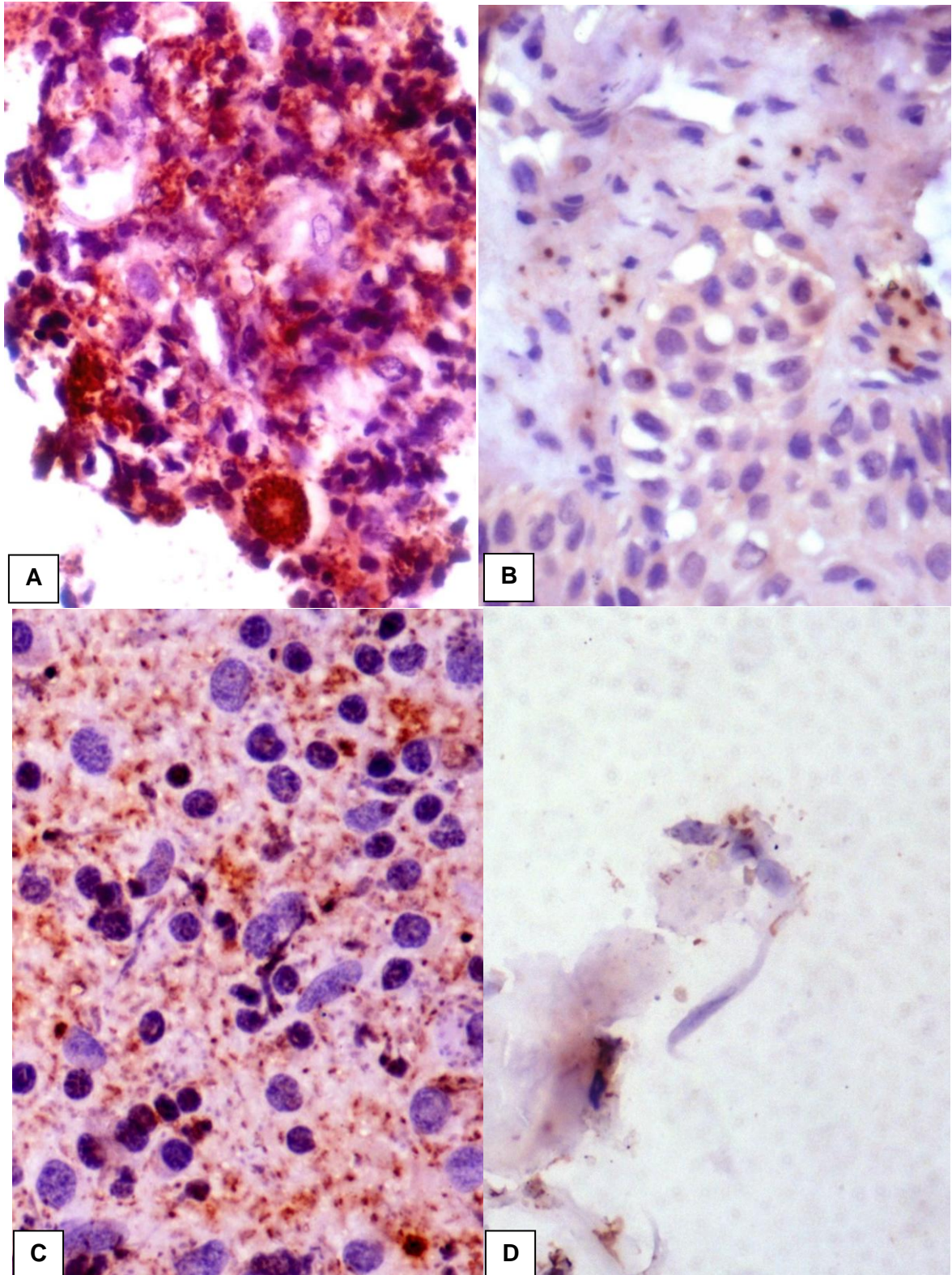
Para pele, o cão 16 apresentou abundante quantidade de formas amastigotas (FIGURA 12) e por vezes se notou fragmento de tecido cutâneo na lâmina dando aspecto semelhante a uma lâmina histológica (FIGURA 12B).

Figura 11 - Medula óssea. ICQ. Núcleo de macrófagos (setas cruzadas). Formas amastigotas de *Leishmania* sp. em técnica de fixação por *cellblock* de agarose (A); em formol a 10% (B); álcool metanol (C) e paraformaldeído (D).. (ICQ revelado com VECTOR®NovaRED e contra-corado com hematoxilina – Obj. 40x).



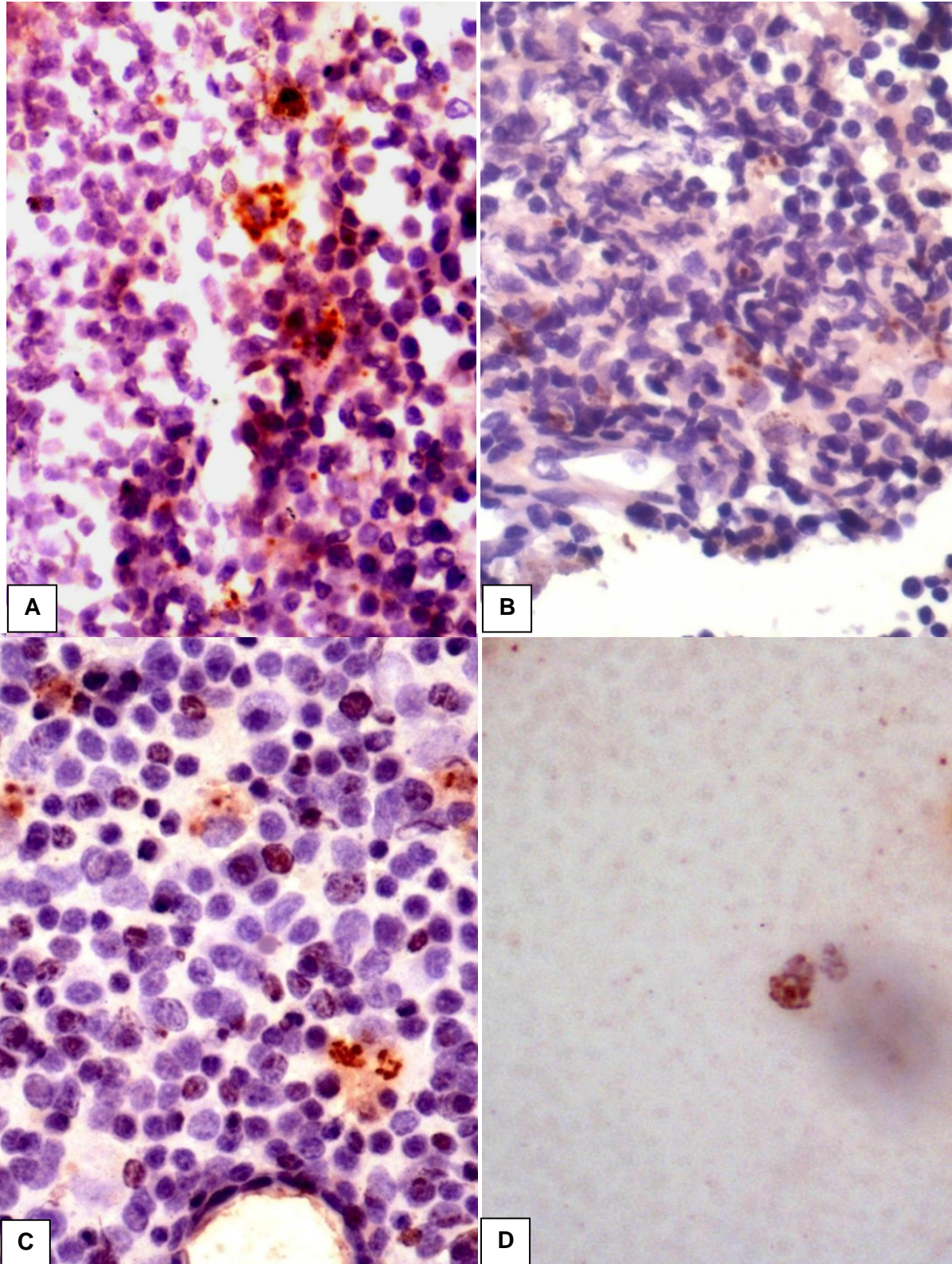
Fonte: do autor

Figura 12: Pele. ICQ. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. em técnica de fixação por *cellblock* de agarose (A); em formol a 10% (B); álcool metanol (C) e paraformaldeído (D). (ICQ revelado com VECTOR®NovaRED e contra-corado em hematoxilina – Obj. 40x).



Fonte: do autor

Figura 13: Linfonodo. ICQ. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. em técnica de fixação por *cellblock* de agarose (A); em formol a 10% (B); álcool metanol (C) e paraformaldeído (D). (ICQ revelado com VECTOR®NovaRED e contra-corado em hematoxilina – Obj. de 40x).



Fonte: do autor.

Foi realizada contagem manual das células nucleadas que compunham o material biológico de medula óssea, pele e linfonodo dos 20 animais (TABELA 4). A contagem foi feita em seis campos, em microscópio óptico e maior aumento (objetiva 40x).

Tabela 4 – Média de células nucleadas observadas em lâminas de imunocitoquímica de diferentes amostras biológicas de 20 cães sororreagentes para *Leishmania* sp.

Amostra	Medula óssea				Pele				Linfonodo			
	Animal	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3
1	37	101	107	19	20	10	1	1	17	10	35	35
2	153	105	137	9	108	257	1	1	167	284	92	7
3	15	31	103	7	73	87	0	0	128	231	23	12
4	61	86	1	13	28	22	10	10	138	301	65	69
5	94	196	4	4	83	34	0	3	308	221	156	77
6	78	92	0	3	61	68	40	7	180	202	208	51
7	242	270	43	41	3	31	3	2	396	326	230	151
8	239	416	196	0	0	87	25	1	215	397	268	291
9	370	372	93	199	124	0	22	4	440	282	164	0
10	128	204	148	14	13	80	30	10	267	120	187	102
11	162	168	119	45	0	77	28	5	58	205	23	38
12	174	166	115	15	80	31	2	10	167	80	144	177
13	224	262	121	156	91	101	14	9	110	362	100	175
14	308	222	88	66	13	0	8	4	69	205	165	38
15	279	256	324	88	100	85	12	8	95	378	123	54
16	446	381	187	88	211	158	111	28	427	378	324	66
17	339	246	86	87	109	96	25	0	89	290	57	33
18	304	377	117	10	164	162	19	1	330	0	216	51
19	229	311	186	28	54	43	16	4	38	339	144	46
20	268	218	83	1	132	110	19	1	384	374	99	184
Médias	208	224	113	45	73	77	19	5	201	249	141	83

Legenda: T1: cellblok de agarose; T2: formol 10%; T3: metanol; T4: paraformaldeído/PBS.

Fonte: do autor.

Medula óssea e linfonodo foram os materiais biológicos que apresentaram as maiores quantidades de células ao final dos processamentos das amostras. No caso da medula óssea as técnicas T1 e T2 apresentaram maior número de células do que as técnicas T3 e T4. A técnica de fixação paraformaldeído/PBS apresentou uma quantidade celular inferior às demais, além das células ficarem sobrepostas após distensão em lâmina.

6.4 Estatística

Calculou-se o coeficiente de correlação entre a quantidade de células captadas e contadas nas lâminas e a quantidade de formas amastigotas de *Leishmania* sp. observadas em cada técnica. Os resultados estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Coeficiente de correlação entre quantidade de células nucleadas e formas amastigotas de *Leishmania* sp.

Material biológico	Medula óssea	Pele	Linfonodo
Técnica			
Cellblock de agarose	0,284633887	0,602893629	0,390441
Formol 10%	0,171528927	0,315369958	0,275891
Metanol	*0,077063	0,88996556	0,420754
Paraformaldeído	0,773681126	0,773840599	0,032628

Legenda: >0 = correlação positiva entre as variáveis

<0 = correlação inversamente proporcional

0 = sem correlação

* Observação: para cálculo da correlação foram excluídos os valores discrepantes.

Fonte: do autor.

Observou-se que a correlação entre a variável quantidade de células nucleadas e a quantidade de formas amastigotas contabilizadas nas diferentes técnicas tem correlação positiva para todos os materiais biológicos e em toda as técnicas estudadas, ou seja, quanto maior a quantidade de células captadas na técnica de coleta, maior a quantidade de formas amastigotas contabilizadas.

Para medula óssea a técnica T3 (paraformaldeído/PBS) é a de mais intensa associação entre a quantidade de células nucleadas e a quantidade de amastigotas (mais próximo de 1). Para pele a associação mais de maior intensidade ocorreu na técnica de fixação em metanol (0,89) com valor bem

próximo à associação perfeita (1). Quando analisado o material biológico de linfonodos, a técnica de maior associação célula nucleada/amastigotas foi a técnica de fixação em metanol, porém a associação não foi tão intensa (0,42).

7. Discussão

Medula óssea, baço, pele e linfonodo são tecidos comumente utilizados para pesquisa do parasito e, no estudo pré-experimental realizado neste trabalho, também foram os órgãos de predileção enviados para pesquisa parasitológica no SPV-UFLA, sendo linfonodo o mais frequentemente analisado e o baço o menos frequente, talvez pelo fato da leishmaniose provocar trombocitopenia em alguns pacientes (PALTRINIERI et al, 2016; SARKARI et al., 2016) com tendência a hemorragia, por requerer prática na técnica de punção e auxílio de exame de imagem para realização. A coleta citológica de linfonodo é de simples realização e menos invasiva. Comparando os resultados imunocitoquímicos dos 20 cães, a medula óssea apresentou o maior número de positivos na pesquisa de *Leishmania* sp., seguido de linfonodo e pele.

Nos achados externos a linfadenomegalia foi encontrada em 15 dos 20 casos (75% dos animais), em apenas dois casos foi confirmado no CP e em sete animais confirmados pela ICQ, o que pode demonstrar que nem sempre está associado à presença das formas amastigotas de *Leishmania* sp., mas à estimulação do sistema imunológico, com conseqüente aumento do tamanho e da quantidade de folículos linfóides e número dos macrófagos medulares (COSTA et al., 2008). Um número elevado dos cães apresentou lesões ulcerativas em região distal da pina (75%), porém apenas 35% deles apresentaram positividade na ICQ para esse órgão, podendo-se inferir assim que a ulceração cutânea pode estar relacionada ao processo inflamatório provocado sem necessariamente ter a presença do parasito na área de lesão.

O presente trabalho demonstrou que exame imunocitoquímico aumenta a acurácia do exame parasitológico substancialmente, resultado corroborado por outros trabalhos (MARQUES et al, 2016; MENEZES et al., 2016). Além disso, mesmo em lâminas com pequena quantidade de formas amastigotas, essas puderam ser imunomarcadas, confirmando a positividade da amostra. A técnica de ICQ empregada, sem a utilização de *overnight* descrita em outros trabalhos (SILVA et al, 2002; VASCONCELOS et al., 2016, GUERRA et al., 2016) reduziu significativamente o tempo de realização do exame, além disso se dispensou o uso de albumina e soro bovino, utilizados em outras técnicas já descritas

(SANTOS, 2011; VASCONCELOS et al., 2016). Com o uso da ICQ houve um aumento considerável do número de positivos em relação ao CP. Em medula óssea foram 15% a mais na técnica de ICQ em relação ao CP quando o material biológico foi fixado nas técnicas T1 e T3, de 10% no caso da T2, porém não houve significância na T4. Em relação à pele não houve significância nos resultados de comparação entre as técnicas, sendo que na T2 os resultados positivos em ICQ foram apenas iguais ao CP. Quando analisados os resultados para linfonodo, o número de positivos foi 25% maior para as técnicas T1 e T2, de 20% para T3 e de 15% para T4. Esses resultados também demonstram que a técnica de fixação de material biológico em lâminas histológicas pode influenciar na qualidade do exame imunocitoquímico, sendo T1 e T3 superiores quando o material biológico se trata de medula óssea, a T2 para pele e a T1 e T2 para linfonodo.

Houve diferenças significativas na visualização das formas amastigotas nas diferentes técnicas de fixação. Essas foram devidas principalmente a qualidade das células em relação à perda de arquitetura e à retração do citoplasma. Nos tratamentos T1, T2 e T4 as células reduziram drasticamente de tamanho (Figura 11, A, B e D, respectivamente), observando-se macrófagos, por exemplo, que apresentavam dimensões aproximadas de uma hemácia (aproximadamente 7 μ m) e a visualização morfológica de núcleo e cinetoplasto das leishmanias foi dificultada, ao passo que na preservação em metanol (T3) as formas amastigotas e suas estruturas visualizáveis em microscópio de luz eram perfeitamente distinguíveis. Resultado semelhante para a qualidade de células foi descrito por Santos et al. (2012) em análise de células foliculares.

Na avaliação da qualidade das células nas técnicas, a fixação em paraformaldeído (T4) promoveu as maiores alterações, além de, na realização do esfregaço em lâmina, não apresentar uniformidade no espalhamento do material biológico, acarretar sobreposição celular e não ser um material de fácil acesso para ser utilizado. A fixação em metanol demonstrou ser de simples realização e manteve a arquitetura das células. O metanol é de fácil obtenção por veterinários clínicos, que podem realizar o esfregaço e enviar para a realização da imunocitoquímica, desde que haja prática na confecção de lâminas de qualidade, critério importante na imunomarcção.

A produção do *cellblock* em gel de agarose (T1) demanda tempo para sua realização, além do custo da agarose. A coleta pode ser feita pelo clínico em um tubo contendo 2 mL de álcool etanol 70%, o qual pode ser enviado para laboratório para confecção do pellet de células e posterior realização de ICQ. Após processamento histotécnico, o bloco em parafina pode ser arquivado. Para T2, cujas células são fixadas em formol tamponado diluído a 10%, o processamento pode promover a perda de material no momento da filtração, o material também passa por processamento histotécnico assim como na T1, o que aumenta o tempo de confecção das lâminas.

O cálculo do coeficiente de correlação permitiu inferir que a quantidade de células obtidas dos diferentes sítios de coleta tem relação leve a moderada com a quantidade de leishmanias encontradas nas lâminas em quaisquer dos tratamentos de fixação.

A eutanásia como medida de controle é contestada quanto a sua efetividade por alguns pesquisadores (MACHADO; SILVA; VILANI, 2016; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2016) ao passo que é defendida por outros (PALATNIK-DE-SOUSA et al, 2004), constitui-se de medida controversa e mal vista pela população (CARMO; LUZ; BEVILAQUA, 2016 e por muito tempo gerava fuga dos tutores com animais diagnosticados como positivos. Embora a recomendação pelo Ministério ainda seja a eutanásia, a liberação da Miltefosina vem sob perspectiva da opção pelo tratamento, assim as técnicas diagnósticas devem ser mais precisas, rápidas e eficientes. Em termos de medidas epidemiológicas, o método sorológico é mais adequado, porém contraprovas e no acompanhamento de animais em tratamento os exames parasitológico e imunoquímico podem ser bem eficazes, visto que a especificidade, alta (BRASIL, 2016). No presente estudo a associação da citopatologia e ICQ demonstrou ser um bom método de diagnóstico e poderia ser uma aliada para acompanhamento de animais em tratamento.

8. Conclusão

O exame ICQ é um importante aliado para o diagnóstico parasitológico de LVC e a quantidade e tipo de técnica de fixação do material biológico em lâminas histológicas pode influenciar diretamente na acurácia desta ferramenta diagnóstica.

Dentre as técnicas de fixação utilizadas, a *cellblock* (T1) de agarose apresentou resultado geral mais satisfatório quando comparadas as demais, porém demanda mais tempo e pode ser mais onerosa

A fixação em metanol não foi tão eficiente quanto à técnica de *cellblock* de agarose, mas em contrapartida é a técnica mais rápida e acessível a médicos veterinários clínicos, além de apresentar bons resultados de positividade na imunocitoquímica.

A medula óssea demonstrou ser o material biológico mais adequado para pesquisa de *Leishmania* sp., seguido do linfonodo e pele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; CAÑAVATE C.; MOLINA, R.; MORENO J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ARAUJO FIHO, N.A. Leishmaniose Tegumentar Americana e o desmatamento da **Acta Amazonica**. Universidade do Amazonas, Manaus. v. 11(1), 1981.

ASSIS, J. et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.

BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v.12, p. 1228-1231, 2000.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 4. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. p. 735-748.

BLOCK, M.; JACOBSON, M.D. Splenic Puncture. **Journal of the American Medical Association**, v. 142, n. 9, p. 641-7, 1950.

BORGES, J.A et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1035-1043, 2009.

BRASIL - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2013. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, p. 1-122, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde. **Nota técnica** nº11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, 2016. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>

BRASIL- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2017. Guia de Vigilância em Saúde. v. único, ed. 2, p. 477-496. Brasília, 2017.

CARMO, R.F.; LUZ, Z.M.P.; BEVILAQUA, P.D. Perceptions of the population and health professionals regarding visceral leishmaniasis. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 21, n. 2, p. 621–628, 2016.

CARNEIRO, L. A. Estudo prospectivo sobre a dinâmica da evolução clínica e imunológica da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de Leishmaniose no Estado do Pará. Dissertação – USP. 93 p. São Paulo, 2016.

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia brasileiro de boas práticas em eutanásia em animais**. Conceitos e Procedimentos Recomendados. Brasília: CFMV, 62 p., 2012.

CONTI, R.V.; PINTO JUNIOR, V.L. Abordagem terapêutica da Leishmaniose Visceral no Brasil - revisão para clínicos. **Revista Medicina e Saúde**, v. 4, n. 2, p. 240-249, 2015.

COSTA, M.M.; LIMA, W.G.; FIGUEIREDO, M.M., MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L. Cervical, Mandibular, and Parotid Lymph Nodes of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*: A Histopathologic and Immunohistochemistry Study and Its Correlation with Facial Skin Lesions. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 613-616, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Best Practices for Preventing Vector-Borne Diseases in Dogs and Humans. **Trends Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 43-55, 2016.

DAY, M.J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Veterinary Parasitology**, n. 147, p. 2-8, 2007.

FEITOSA, M.M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FORATTINI, O.P. **Entomologia médica**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher/EDUSP. p. 658, 1973.

FOWLER, L.J.; WHITNEY, A.L. Application of Immunohistochemistry to Cytology. **Archives of Pathology e Laboratory Medicine**, v. 132, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18318580>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GUERRA, J.M. et al. Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v-. p. 1675-1686, 2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. População de Animais de Estimação no Brasil. Senso 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-anteriores/ibge-populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf/view>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

LAINSON, R. et al. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 435-443, 1994.

LAINSON, R; SHAW, J.J. New World Leishmaniasis – the neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER, L; BALLOWS, A; SUSSMAN, M. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. p. 241-266, 1998.

MACHADO, P.R.L. et al. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 79, p. 647-664, 2004.

MACHADO, C.J.S.M; SOLVA, E.G.; VILANI, R.M. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Saúde Sociedade São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 247-258, 2016.

MARCELINO, A.P.; SOUZA FILHO, J.A. Instruções para a realização do teste rápido imunocromatográfico Alere para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. Informativo técnico. Serviço de Doenças Parasitárias Laboratório de Referência Nacional em Diagnóstico da Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral IOM – FUNED, 2015. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2015/09/instru%C3%A7%C3%B5es-teste-rapido-Alere-LVC-manual.pdf>> Acesso em: 20 jan. 2018.

MARQUES, F.A., et al. Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. **Parasitology International**, Manuscript, 2016. (doi:10.1016/j.parint.2016.10.003)

MARZOCHI, M.C.A. et al. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 5-17, 1985.

MENDES, C.S. et al. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 21, n. 1, p. 263-272, 2016.

MENEZES, R.C. et al. Cell-block Immunohistochemistry of Bone Marrow Aspirates: a Novel Tool to Improve the Diagnosis of *Leishmania* Infection in Dogs. **Journal of Comparative Pathology**. feb- apr, v. 154(2-3), p. 157-60, 2016.

OLIVEIRA, T.S. et al. Análise de métodos de diagnóstico para leishmaniose visceral canina a partir de levantamento de casos atendidos em uma clínica veterinária na cidade de Belo Horizonte, MG. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 9, n. 31, p. 692- 696, 2011.

PALATNIK DE SOUSA, C. B.; BATISTA DE MELO, L.M.; BORJA CABRERA, G.P.; LAVOR, C.C. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 76, n. 3, p. 583-593, 2004.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v.45/4, p. 21–27, 2016.

PIMENTA, P.F.P.P; SECUNDINO, N.F.C.; BLANCO, R.R.N. Interação vetor-hospedeiro. In: RANGEL, E.F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 368 p., 2003.

RAMOS, G.O. et al. Aplicabilidade da técnica de *cellblock* na avaliação citológica do conteúdo de lesões de aspecto cístico dos maxilares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 121-127, 2012.

REITHINGER, R. et al. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2352–2356, 2002.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by *Leishman donovan* and further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1261-1401, 1903.

SAKARI, B. et al. Visceral Leishmaniasis in Southwestern Iran: A Retrospective Clinico-Hematological Analysis of 380 Consecutive Hospitalized Cases (1999–2014) **PLOS ONE**. v. 11, n. 3, p. 1-8, 2016.

SANTOS, I.B. Comparação entre a citopatologia, histopatologia, imunocitoquímica e imunohistoquímica em diferentes amostras biológicas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. 88f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, 2011.

SANTOS, J.T. et al. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of bovine preantral ovarian follicles. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 33, n. 1, p. 297-304, jan./mar. 2012.

SHIVAKUMARSWAMY, U. et al. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology. **Journal of Cytology**, v. 29, n. 1, p. 11–15, 2012.

SILVA, F.L.; TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; TAFURI, W.G.L. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: A case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, Belo Horizonte, 2002.

SILVA, D.A. et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**. v 179 p. 257–261, 2011.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Ministério da Saúde**. Brasil, 2016. Disponível em:<<http://sinan.saude.gov.br>>

TRONCARELLI, M. Z. et al. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 118–120, 2009.

VASCONCELOS, T.C.B. et al. Avaliação da confiabilidade entre dois observadores em exames citopatológico e imunocitoquímico de aspirado de medula óssea no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 3, p. 821-824, 2016.

WERNECK, G.L. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**. n. 44, p. 265-270, 2002.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Acesso em: 27 jun. 2018.

ZANONI, D.S.; KLEEB, S.R.; XAVIER, J.G. Emprego do *cellblock* de agarose como método complementar no diagnóstico citológico de tumores mamários caninos. **Ciência Rural**, v. 43, n. 3, p. 489-495, 2013.

ANEXO A

Técnica em silanização em lâmina histológica

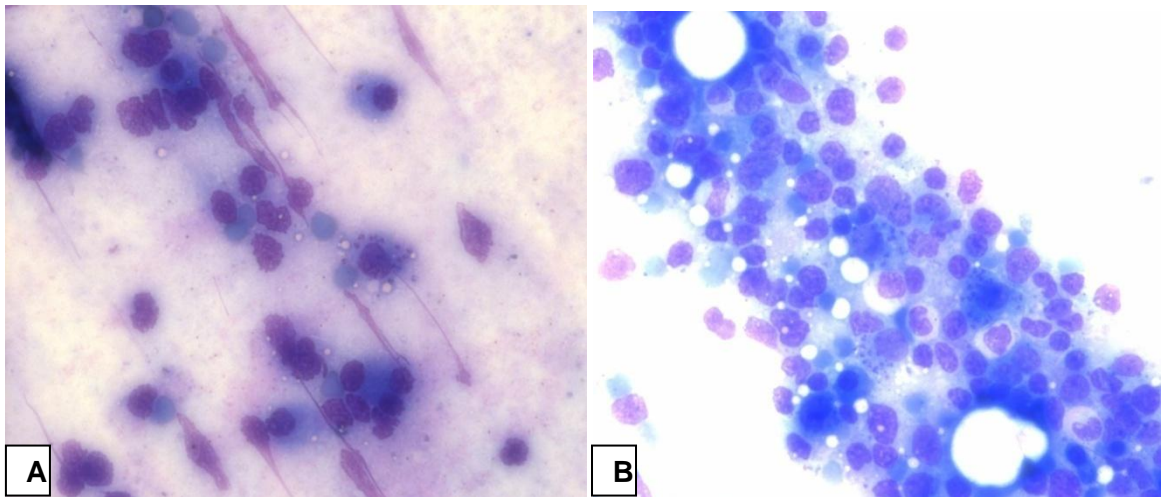
- 1- Remoção de traço de óleo ou água: As lâminas devem ser mergulhadas em metanol ou acetona por dois minutos e secas em temperatura ambiente.
- 2- Submergir as lâminas secas e limpas em solução de Silane a 2% em a acetona por dois minutos.
- 3- Realizar duas lavagens em água destilada
- 4- Secar completamente as lâminas, primeiro em temperatura ambiente até que as gotas de água sequem depois em estufa 60°C por no mínimo 1 hora.
- 5- Estocar as lâminas em temperatura ambiente.

Observações:

- A solução de Silane a 2% em acetona deve ser armazenada em geladeira, mantendo-se estável por 8 horas. Após esse período pode haver alteração de coloração da solução.
- Após a confecção das lâminas não tocar a superfície silanizada com os dedos.

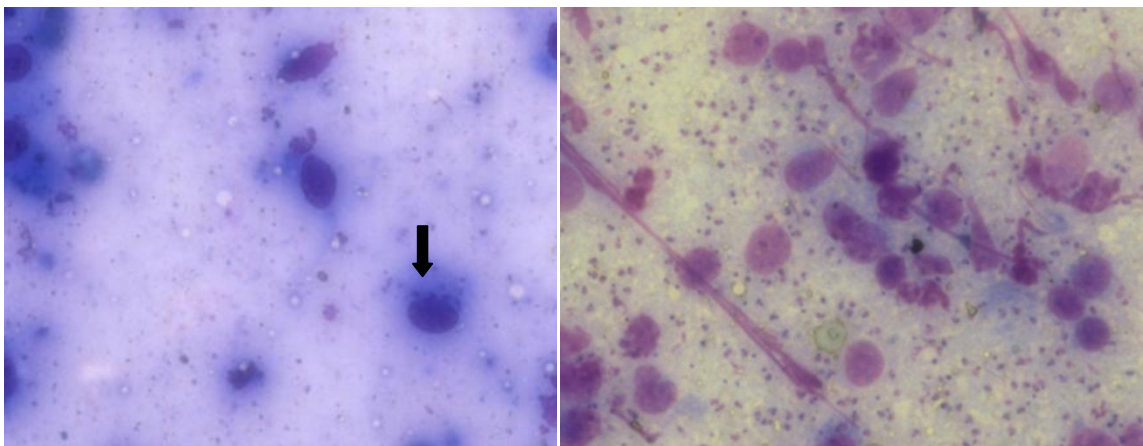
ANEXO B**Figuras de citopatológico**

Figura - Medula óssea. LVC. Exame citopatológico – formas amastigotas no interior de macrófago em intensidade leve (A) e moderada (B). (coloração hematoxilina/eosina, objetiva 40x)



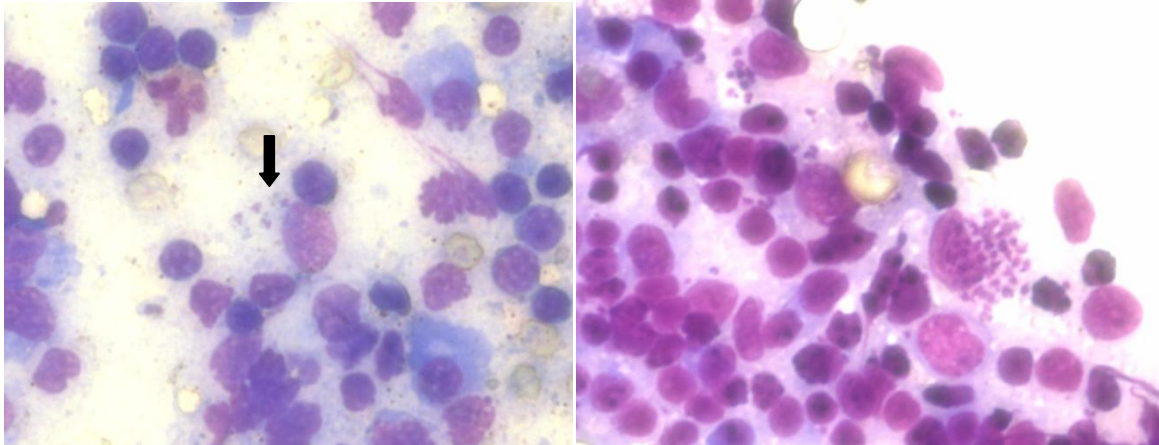
Fonte: do autor.

Figura - Pele. LVC. Exame citopatológico – formas amastigotas em intensidade leve (seta- A) e acentuada (B). (coloração hematoxilina/eosina, objetiva de 40x)



Fonte: do autor.

Figura - Linfonodo. LVC. Exame citopatológico – formas amastigotas em intensidade leve (seta- A) e moderada (B). (coloração hematoxilina/eosina, objetiva de 40x).



Fonte: do autor.