

**U.** PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**PATOLOGIA E CLÍNICA LABORATORIAL**

Inês Borges Alves

Orientadora:

**Professora Doutora Alexandra Muller**

Co-Orientadora:

**Dra. Glòria Albyniana Grapí**

Porto 2015

**U.** PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**PATOLOGIA E CLÍNICA LABORATORIAL**

Inês Borges Alves

Orientadora:

**Professora Doutora Alexandra Muller**

Co-Orientadora:

**Dra. Glòria Albyniana Grapí**

Porto 2015

## AGRADECIMENTOS

A conclusão do meu percurso académico tornou-se possível com a colaboração de muitas pessoas, as quais não iria perder a oportunidade de agradecer.

O meu muito obrigada à Dra. Glòria Albyniana por me ter aceite no Citopat Veterinária para estágio curricular, pela sua paciência e transmissão de conhecimentos. À Puri, administrativa do Citopat que me ajudou na casuística, sempre curiosa com os diagnósticos e a quem agradeço a boa disposição e a vontade de aprender.

À Professora Doutora Alexandra Muller, minha orientadora, pela disponibilidade, respostas rápidas e comentários pertinentes, sempre pronta a ajudar-me em tudo.

Às simpáticas raparigas do laboratório Althia que nos faziam os cortes em parafina.

A todo o pessoal docente do ICBAS, por tudo o que me ensinaram. Ao pessoal não docente, pelo auxílio e dedicação que prestam aos alunos.

Ao Dr. Hugo do CEDIVET por me ter recebido e ter-me explicado de forma tão entendida tudo referente a um laboratório veterinário. Também à Dra. Nazaré e à Dra. Inês pela disponibilidade mostrada para me responderem a todas as minhas dúvidas.

A todos os outros locais em que fiz estágios extra-curriculares, saliento o Centro Veterinário Conimbricense, obrigada ao Dr. Nuno, Dr. Pedro, Dra. Andreia e Sandrine por me terem recebido por dois anos consecutivos.

À Salomé, minha gerente enquanto trabalhadora-estudante que sempre tentou dar-me os fins de semana para estudar, à Filipa, à Márcia, ao Pedro, ao Ricardo e à Sara sempre disponíveis para trocas de horário para eu ir a congressos e aos exames, obrigada pelos momentos bons que passámos a trabalhar e a descontraír.

A todos os meus amigos que me ouviram e aconselharam neste percurso tendo sempre palavras de apoio e conforto, à Ana, ao Daniel, à Elisabete, ao Miguel, à Patrícia, à Rita, à Susana e a tantos outros amigos e colegas que fizeram comigo este caminho pela veterinária.

Ao Pedro, pela paciência e ajuda que sempre demonstrou. À minha família por ter sempre acreditado em mim, à minha mãe, avó e avô que sei que esteve sempre comigo.

“The future has several names. For the weak, it is impossible; for the fainthearted, it is unknown; but for the valiant, it is ideal.”

Victor Hugo, *Les Misérables*

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Cm** - centímetro

**DLBCL** - linfoma difuso de células-B grandes

**DNA** – ácido desorribonucleico

**ETCL** - linfoma cutâneo de linfócitos T, epiteliotrópico

**FCV** - calicivírus felino

**FCV-VSD** - doença virulenta sistêmica associada a calicivírus felino

**FeLV** - vírus da leucemia felina

**FIV** - vírus da imunodeficiência felina

**FL** - linfoma folicular

**HE** - hematoxilina-eosina

**ICBAS** - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

**IHQ** - técnica imunohistoquímica

**MCL** - linfoma de células do manto

**Mm** - milímetro

**MZL** - linfoma da zona marginal

**NET** - tumor neuroendócrino

**NCI** - National Cancer Institute

**OVH** - ovariectomia

**PNET** - tumor neuroendócrino pancreático

**PAAF** - punção aspirativa por agulha fina

**PCR** - reação em cadeia da polimerase

**pH** - potencial de hidrogénio

**RNA** - ácido ribonucleico

**SND** - dermatite necrolítica superficial

**SRD** - sem raça definida

**TSH** - hormona estimuladora da tiroide

**X** - vezes

**WHO** - Organização Mundial de Saúde

**µm** - micrómetro

® - produto registado

°C - graus *celsius*

% - percentagem

## RESUMO

A escolha de variados temas surgiu da necessidade de expressar a multiplicidade de casos discutidos durante o período de estágio.

Foram escolhidos temas tendo em consideração a diversidade de órgãos afetados, as patologias menos comuns e provas imunohistoquímicas efetuadas, abordando também o exame de citologias, as biópsias e a realização de necrópsias.

A apresentação do tema “Linfoma - Diagnóstico Cito-histopatológico e Estudo Imunohistoquímico”, mostrou diversos casos onde foram executados vários procedimentos, tais como análise citológica, histológica e imunohistoquímica de CD3 e CD20 com as quais podemos classificar o imunofenótipo do linfoma.

Por sua vez, o capítulo “Apresentações Dermatológicas da Leishmaniose”, descreve diagnósticos laboratoriais de infecções por *Leishmania* em cães em que houve diversas manifestações cutâneas e nas quais foram aplicadas técnicas de histopatologia com imunohistoquímica de *Leishmania*.

A exposição de um caso de necrópsia que teve como diagnóstico “Estipe Hipervirulenta do Calicivírus Felino” mostrou por PCR a estirpe hipervirulenta no Sistema Nervoso Central.

Já o tema “Diagnóstico Imunohistoquímico de um Tumor Neuroendócrino relacionado com Dermatite Necrótica Superficial”, revelou a importância do diagnóstico por imunohistoquímica para chegar à origem do tumor.

Os objetivos propostos foram a integração no funcionamento de um laboratório veterinário, estudar macroscópica e microscopicamente as amostras, para depois se poder diagnosticar diversas patologias usando técnicas citológicas, histológicas, histoquímicas e imunohistoquímicas.

Considera-se que os objetivos foram atingidos e, por outro lado, adquiriu-se experiência e desenvoltura laboratorial.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	i
LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
RESUMO .....	iv
ÍNDICE .....	v
<b>1. APRESENTAÇÃO E CASUÍSTICA .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LINFOMA – DIAGNÓSTICO CITO-HISTOPATOLÓGICO E ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO</b>	
<b>2.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1 CLASSIFICAÇÃO DE LINFOMAS.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 RESULTADOS/DISCUSSÃO</b>	
<b>2.3.1 CASO CLÍNICO 1.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2 CASO CLÍNICO 2.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.3 CASO CLÍNICO 3.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.4 CASO CLÍNICO 4.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2.5 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>11</b>
<b>3. APRESENTAÇÕES DERMATOLÓGICAS DA LEISHMANIOSE CANINA E ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO</b>	
<b>3.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 APRESENTAÇÕES CUTÂNEAS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4 RESULTADOS/DISCUSSÃO</b>	
<b>3.4.1 CASO CLÍNICO 1.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4.2 CASO CLÍNICO 2.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4.3 CASO CLÍNICO 3.....</b>	<b>17</b>

<b>3.4.4 CASO CLÍNICO 4</b> .....	18
<b>3.5 CONCLUSÃO</b> .....	19
<b>3.6 BIBLIOGRAFIA</b> .....	20
<b>4. ESTIRPE HIPERVIRULENTE DO CALICIVÍRUS FELINO – UM CASO DE NECRÓPSIA COM AFETAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL</b>	
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>4.2 RESULTADOS - CASO DE NECRÓPSIA</b> .....	22
<b>4.3 DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>4.4 BIBLIOGRAFIA</b> .....	25
<b>5. DIAGNÓSTICO IMUNOHISTOQUÍMICO DE UM TUMOR NEUROENDÓCRINO RELACIONADO COM DERMATITE NECROLÍTICA SUPERFICIAL</b>	
<b>5.1 INTRODUÇÃO</b> .....	26
<b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
<b>5.3 RESULTADOS – CASO CLÍNICO</b> .....	27
<b>5.4 DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>5.5 BIBLIOGRAFIA</b> .....	30
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO I .....	I
ANEXOS II .....	V



## 1. APRESENTAÇÃO E CASUÍSTICA

A Patologia é o estudo das doenças, das alterações estruturais e funcionais das células, dos tecidos e dos órgãos, de forma a explicar os sinais clínicos manifestados pelos animais e fornecendo bases para a terapêutica.

O estágio na área de Patologia e Clínica Laboratorial englobou as dezasseis semanas no Citopat Veterinaria, um serviço privado de diagnóstico anatomopatológico em Barcelona (<http://www.citopatveterinaria.com>). O laboratório funcionava com dois patologistas e uma administrativa. O Citopat Veterinaria dedica-se ao exame de biópsias e citologias e à realização de necrópsias de origem animal. Aceitava todas as espécies, apesar de durante o período de estágio só ter recebido amostras de cães e gatos. O laboratório foi entendido como o local adequado para tomar contacto com a realidade da Patologia Veterinária, havendo preferência pela anatomopatologia para desenvolver um trabalho integrado que envolvesse diferentes áreas, como: Dermatopatologia, Neuropatologia, Patologia Respiratória, Digestiva, Urinária, Reprodutiva, Mamária e Endócrina, entre outras.

O trabalho realizado durante o período de estágio consistia no processamento diário de amostras tanto para citologia como histopatologia. As colorações das citologias podiam ser de órgãos e fluidos, bem como sedimentos urinários e exsudados. Preparam-se as amostras para histopatologia de modo a efetuar o seu exame macroscópico, fazendo-se cortes representativos das lesões e identificação das cassetes até à inclusão em parafina. O diagnóstico era posteriormente discutido com a Dra. Glòria Albyniana, diretora técnica do Citopat e patologista veterinária. Houve ainda a oportunidade de participar no estudo histopatológico de algumas necrópsias, estas eram realizadas noutras instalações.

No âmbito da casuística foram selecionados os 10 diagnósticos mais frequentes, efetuados no período compreendido entre 1 de outubro de 2014 a 31 de janeiro de 2015. Note-se que uma vez que a grande maioria das amostras recebidas durante o período de estágio provinham de canídeos, não se consideraram estatisticamente separadas das de felinos.

Deste modo, verificou-se que os adenocarcinomas tubulares mamários foram o diagnóstico mais frequente, representando 19% do total. Foram apresentados 31 em cadelas e 8 em gatas (Tabela 1, Gráfico 1). Os mastocitomas, o segundo mais frequente, 16% do total, foram observados em 32 canídeos e 1 felino num total de 205 animais.

Os tumores mamários mistos benignos (os terceiros mais frequentes) foram observados em 19 cadelas. Os adenocarcinomas tubulopapilares mamários, por sua vez, registaram-se em 17 cadelas e 1 gata. Já os histiocitomas cutâneos benignos e os lipomas corresponderam a 17 canídeos, enquanto que os sarcomas, os adenomas complexos mamários e os adenomas das glândulas hepatoídes corresponderam a 16, representando cada uma destas cinco patologias 8% do total dos diagnósticos. Os quistos foliculares exibiam apenas 7% dos diagnósticos (Gráfico 1).

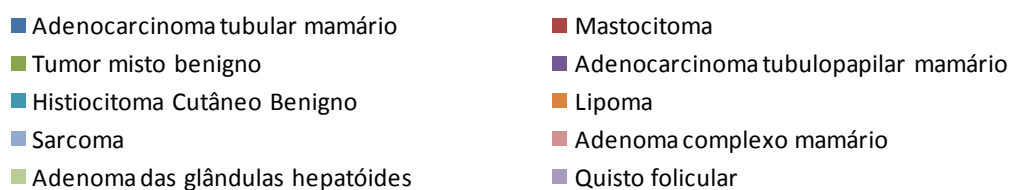


Gráfico 1 – Representação dos 10 diagnósticos mais frequentes emitidos pelo Citopat Veterinária entre 1 de outubro de 2014 e 31 de janeiro de 2015

	N.º GATOS	N.º CÃES	TOTAL OCORRÊNCIAS
Adenocarcinoma tubular	8	31	39
Mastocitoma	1	32	33
Tumor misto benigno	0	19	19
Histiocitoma cutâneo benigno	0	17	17
Adenocarcinoma tubulopapilar	1	17	18
Lipoma	0	17	17
Sarcoma	0	16	16
Adenoma complexo	0	16	16
Adenoma das glândulas hepatoídes	0	16	16
Quisto folicular	1	13	14
<b>Total de animais</b>	<b>11</b>	<b>194</b>	<b>205</b>

Tabela 1. Diagnósticos mais frequentes consoante a espécie.

Por outro lado, o Gráfico 2 expõe a dependência dos diagnósticos anteriores com a idade dos animais. Observou-se que as percentagens mais elevadas dos diagnósticos ocorreram em animais adultos, facto relacionado com a sua faixa etária ser a mais abrangente.

Os mastocitomas são neoplasias comuns nos cães e mais raras nos gatos, sendo mais frequentes nos animais geriátricos (podendo, contudo, aparecer em qualquer idade). No entanto, apenas 6 dos 33 animais com mastocitoma tinham mais de 9 anos.

O adenoma das glândulas hepatoides surge mais frequentemente em machos adultos geriátricos, sugerindo estimulação por hormonas androgénicas. Neste estudo, dos 16 cães machos com esta patologia só 2 tinham menos de 8 anos.

Destaca-se ainda o caso do histiocitoma cutâneo benigno, uma neoplasia de cães jovens, e a única que se diagnosticou com maior incidência sobre as amostras mais jovens: 1 cão com menos de 2 anos e 16 jovens adultos.

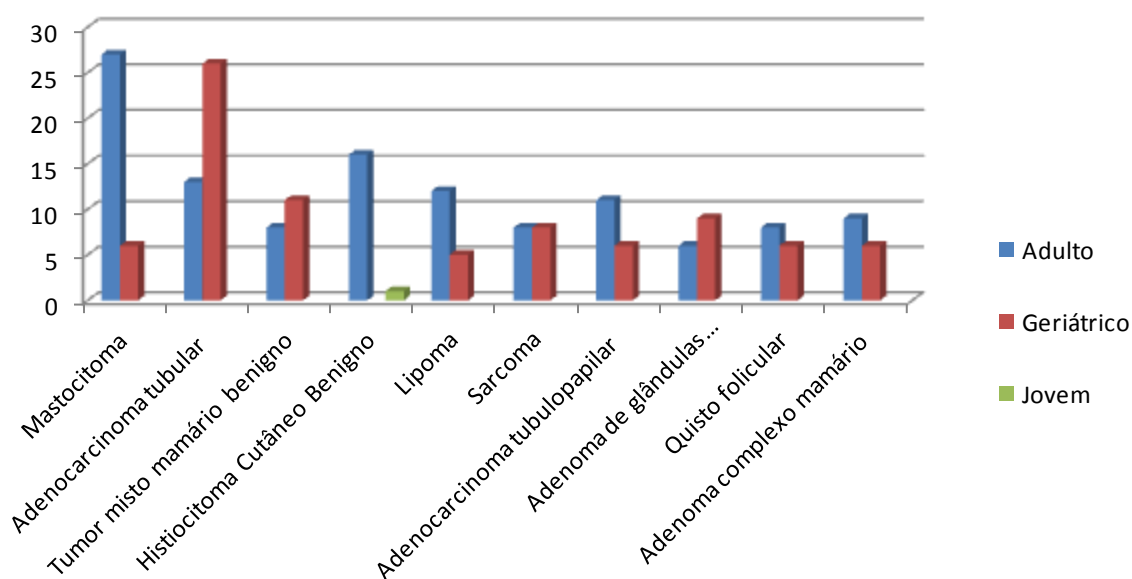


Gráfico 2 - Representação dos 10 diagnósticos mais frequentes em função da idade, considerando cães e gatos. Adultos considerados entre 2 e 9 anos; geriátricos: mais de 9 anos e jovens: menos de 2 anos.

Em conclusão, realça-se que quatro dos tipos dos tumores estudados eram mamários. Tal facto pode ser explicado devido a muitas fêmeas não terem sido sujeitas quando jovens a ovariectomia (OVH). O adenocarcinoma tubular (um tumor maligno) foi o mais frequente, o que se justifica pelo facto de quando se resolve submeter a fêmea a OVH e mastectomia a neoplasia já evoluiu. Realça-se ainda que foi o tumor mais frequente em ambas as espécies.

## 2. LINFOMA – DIAGNÓSTICO CITO-HISTOPATOLÓGICO E ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

### 2.1 INTRODUÇÃO

O linfoma é um tumor heterogêneo com diferentes sinais clínicos, respostas à terapia e tempos de sobrevivência. A sua etiologia é multifatorial, possivelmente: infecções retrovirais, contaminação ambiental com herbicidas, exposição a campos magnéticos, anormalidades cromossômicas e disfunções imunológicas (Fan, 2013).

O linfoma é a neoplasia hematopoiética mais comum do cão (90% dos tumores hematopoiéticos (Albertus, 2012)) e a terceira de todas as neoplasias. A idade em que ocorre é mais frequente entre os 6 e 7 anos contudo também pode aparecer em animais jovens. É uma neoplasia agressiva não tendo predisposição óbvia pelo sexo. As raças de maior predisposição são Scottish Terrier, Boxer, Basset Hound, Bulldog, Labrador Retriever, Airedale Terrier, São Bernardo, Bullmastiff, Pastor de Berna e Rottweiler (Bienzle & Vernau, 2011).

O sinal clínico mais comum em cães com linfoma é a linfadenopatia periférica, que é usualmente generalizada mas pode ser localizada a um único gânglio linfático ou a uma região do corpo. O envolvimento de outros órgãos, como baço, fígado ou medula óssea é indicativo da doença estar avançada (Moore, 2006). Sem tratamento, a esperança média de vida em cães com linfoma é de 1-2 meses. Com tratamento é de 12-14 meses (Kayne, 2013).

No gato, o linfoma representa 50 a 90% de todas as neoplasias hematopoiéticas e a mais frequente das neoplasias na espécie felina. A idade dos gatos afetados varia dos 2-3 anos (FeLV+) a 7 anos (FeLV-). A incidência tende a ser maior em gatos machos e nos da raça siamesa (Gustafson, 2014).

Os sinais clínicos em gatos são letargia, diminuição de apetite e perda de peso. Dependendo dos órgãos que afeta, sinais como diarreia, vômitos e dispneia podem ocorrer (Kayne, 2013).

Os gatos com linfoma que não são tratados com quimioterapia têm um tempo médio de vida de 4 semanas uma vez chegado ao diagnóstico. Os gatos com linfoma intestinal (tipo mais frequente em felinos) que são tratados só com prednisona têm uma esperança de vida de 60-90 dias. Outros tratamentos que usam agentes quimioterápicos múltiplos têm resultados significativamente melhores (Kayne, 2013).

O diagnóstico citológico de gânglios linfáticos pode ser compatível com um diagnóstico de linfoma mas não nos dá um diagnóstico definitivo, este é baseado em exame histológico de gânglio linfático.

Os fatores prognósticos incluem: estadió (I e II - linfadenopatia não generalizada, apresentam melhor pronóstico que os pacientes em estadios III a V - linfadenopatia generalizada e/ou afetação hepatoesplénica) e subestadió da doença (com e sem sinais clínicos), grau histológico (baixo, médio, alto), imunofenótipo (os linfomas de células T apresentam tempos de

sobrevivência inferiores aos linfomas de células B) presença de hipercalcemia, resposta à terapia e pré-tratamento (terapia prévia com corticoides reduz o tempo de efetividade da quimioterapia) (Moore, 2006). Nos gatos a presença de FeLV/FIV é também importante (Albertus, 2012).

### 2.1.1 CLASSIFICAÇÃO DE LINFOMAS

Anatomicamente podem ser classificados em multicêntricos, mediastínicos, digestivos, cutâneos e extranodulares. A forma multicêntrica é a mais comum no cão e a no gato a alimentar/intestinal (Tabela 2) (Deheer & Juopperi, 2004).

	<b>Multicêntrico</b>	<b>Alimentar</b>	<b>Mediastínico</b>	<b>Cutâneo</b>	<b>Extranodal</b>
<b>Canina</b>	mais de 80%	5-7%	5%	raro	
<b>Felina</b>	3ºmais comum	mais comum	comum	raro	4ºmais comum

Tabela 2. Incidência das várias formas anatómicas do linfoma. (Deheer&Juopperi, 2004).

Histologicamente, com o objetivo de relacionar o tipo celular com o prognóstico, há vários esquemas de classificação. Estes têm evoluído de esquemas de classificações de linfoma humano para relacionar o tipo histológico com um prognóstico clínico mais preciso. Os hematopatologistas veterinários têm aplicado esses modelos para o linfoma em animais domésticos. Os esquemas de classificação de linfomas humanos usados em medicina veterinária incluem o Sistema de classificação Rappaport, o esquema de classificação de Kiel, o National Cancer Institute (NCI), Working Formulation e o da Organização Mundial de Saúde (WHO) (Deheer & Juopperi, 2004).

O esquema mais atual de classificação é o da WHO revisado em 2001. Este sistema incorpora a morfologia das células neoplásicas (grandes, pequenas, blásticas ou clivadas), o padrão histológico (folicular ou difuso), o imunofenótipo (células B ou células T), bem como informações clínicas e de sobrevivência para classificar o linfoma mais claramente em subtipos, com diferenças clínicas em comportamento e prognóstico (Valli *et al*, 2013).

Para classificar cada linfoma de acordo com a WHO, as seguintes características foram examinadas: padrão de crescimento nodular versus difuso, a relação de nódulos, tamanho do núcleo, morfologia nuclear, número de mitoses por campo de ampliação e imunofenótipo.

O tamanho do núcleo é determinado como pequeno (menor de 1.5 vezes o tamanho de um eritrócito), intermédio (1.5-2 vezes o tamanho de um eritrócito) ou grande ( maior de 2 vezes o tamanho de um eritrócito). O número de mitoses foi identificado num campo microscópico com a objetiva de 40x. Linfomas com 0 a 5 mitoses são de grau 1 ou baixo grau, de 6 a 10 mitoses são de grau 2 ou médio grau e mais de 10 mitoses por campo são de grau 3 ou elevado grau (Valli *et al*, 2013).

As características morfológicas e o padrão arquitetural para a classificação de linfomas de acordo com cada categoria estão descritos na Tabela 3. (Bienzle & Vernau, 2011)

O imunofenótipo afeta o comportamento biológico que vem determinar a expressão de certas glicoproteínas da membrana plasmática. A diferenciação é interessante do ponto de vista do prognóstico pois os linfomas de células T tendem a mostrar um comportamento mais agressivo, induzem a aparição de síndromes paraneoplásicas, a sua taxa de remissão é mais baixa e têm tipos de sobrevivência mais curtos que os de células B. Apesar disto em algumas ocasiões, se bem que pouco frequentes, as células perdem a expressão dos antígenos CD3 e CD79 e portanto não se pode determinar a sua origem (Albertus, 2012).

<b>Categoria do Linfoma</b>	<b>Características Anatômicas e Histomorfológicas</b>
<b>Linfoma difuso de células-B grandes (DLBCL)</b>	Supressão generalizada de nódulos linfáticos; núcleo redondo, taxa mitótica elevada; nucléolo único = tipo imunoblástico; nucléolos múltiplos = tipo centroblastico
<b>Linfoma da zona marginal (MZL)</b>	Origem nodal, mucosa extranodal ou na polpa branca esplênica; padrão folicular, células pequenas a intermédias, taxa mitótica baixa
<b>Linfoma folicular (FL)</b>	Origem nodal única ou múltipla; padrão folicular, tamanho celular variável, baixa taxa mitótica
<b>Linfoma de células do manto (MCL)</b>	Origem na polpa branca esplênica; padrão folicular, tamanho de células pequeno, núcleo redondo a irregular, baixa taxa mitótica
<b>Linfoma periférico de células T</b>	Supressão difusa de múltiplos nódulos linfáticos, possível hipercalemia; morfologia celular e taxa mitótica variável
<b>Linfoma de células T pequenas</b>	Expansão nodal paracortical com folículos remanescentes; tamanho de células pequeno e intermédio, núcleo redondo, clivado ou indentado
<b>Linfoma cutâneo epiteliotrópico 1º</b>	Difuso ou agregado, predileção por zona mucocutânea, epiteliotrópico; tamanho das células pequeno a grande dependendo do estadio da doença
<b>Linfoma hepatoesplênico de células-T</b>	Difuso, origem na polpa vermelha esplênica, propagação extensa (fígado, medula), citopenias; tamanho de células grande, grânulos citoplasmáticos, taxa mitótica alta

Tabela 3. Categorias de linfoma mais comuns no cão baseadas na classificação da WHO (Bienzle&Vernau,2011).

O objetivo deste trabalho foi a classificação de linfomas recorrendo à histopatologia e à imunohistoquímica.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram escolhidos 4 casos, 3 foram submetidos à técnica de imunohistoquímica. Os linfomas utilizados neste trabalho foram classificados de acordo com a imunofenotipagem de CD3 (linfócitos T) e CD20 (linfócitos B). Todos os animais foram submetidos a classificação anatômica e estadiamento da neoplasia de acordo com os critérios propostos pela WHO. O diagnóstico de alguns foi realizado por meio de exame citológico de aspirado por agulha fina ou histopatologia de gânglios linfáticos hipertrofiados, alteração de consistência do baço ou nódulos cutâneos.

A informação sobre o animal e história clínica não foram completas e foram direcionadas para as lesões em questão.

As citologias obtidas foram coradas pelo método de Diff-Quick. Os fragmentos de gânglio linfático, baço ou nódulos cutâneos foram fixados em formol tamponado a 10% no mínimo 24h. Foram feitos cortes representativos das lesões, com espessura aproximadamente de 2mm e processados até a inclusão em parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram posteriormente corados pelo método de Hematoxilina-eosina (HE) e para o estudo imunohistoquímico.

Par o marcador CD3: foi usado o teste DAKO<sup>®</sup> policlonal com diluição de 1:300 no sistema automatizado BenchMark<sup>®</sup> XT da Ventana. O kit destina-se a identificar alvos por imunohistoquímica (IHQ) em cortes fixados em formol e embebidos em parafina. Foram submetidos a um pH de 8,3 a 83°C durante 30 minutos e incubados 32 minutos a 37°C. O kit de detecção usado foi o ultraview DAB Detection.

Para o marcador CD20: foi usado o teste Thermo Scientific policlonal com diluição de 1:300. Foram submetidos a um pH de 8,3 a 83°C durante 30 minutos e incubados 1 hora a 37°C. O kit de detecção usado foi o ultraview DAB Detection.

## 2.3 RESULTADOS/DISCUSSÃO

### 2.3.1 Caso clínico 1

**Caracterização do animal:** Olga, canídeo, Dobermann, fêmea de 8 anos de idade.

**História clínica:** Paciente com linfadenopatia submandibular bilateral. Analítica sanguínea normal e serologia de Leishmania negativa. Citologias de PAAF (punção aspirativa de agulha fina) de gânglio linfático submandibular. **Estudo microscópico:** Apresentava um fundo linfóide com células em forma de núcleos nus. Nas zonas melhor conservadas observou-se uma população linfóide homogênea, com predominância de formas linfoblásticas de tamanho médio (núcleo do tamanho de 2 eritrócitos), de núcleo redondo de contorno irregular, cromatina laxa e reticulada. Algumas células continham um nucléolo central e outras vários periféricos. Apresentava presença escassa de corpos linfoglandulares, ocasionais linfócitos maduros de pequeno tamanho e formas neutrofilicas ocasionais (Figura 1, Anexo I). **Diagnóstico:**

Sugestivo de Linfoma. **Evolução:** Passadas 2 semanas, o animal apresentava caquexia e linfadenopatia generalizada. Foi efetuada biópsia de gânglios submandibular e poplíteo. **Estudo microscópico:** Todas as secções continham uma proliferação intraganglionar de carácter difuso e uniforme, focalmente nodular, composta por células de aspeto linfocítico atípicas, de disposição densa, de citoplasma escasso, basófilo, com núcleo arredondado (tamanho 2,5 eritrócitos), de cromatina clara com 2-3 nucléolos. O índice mitótico era moderado (2 mitoses por campo 40x). Tinha infiltração da cápsula ganglionar e do tecido adiposo adjacente (Figura 2, Anexo I). Coloração imunohistoquímica CD20 (Linfócitos B): A maioria das células apresentavam uma forte expressão do antigénio CD20. Coloração imunohistoquímica CD3 (Linfócitos T): negativa (Figura 3, Anexo I). **Diagnóstico:** Linfoma difuso de Linfócitos B grandes (centroblástico), de distribuição difusa de grau histológico médio. **Discussão:** O índice mitótico observado (menor de 20 mitoses a 400x) parece estar associado a tempos de sobrevivência mais prolongados e é portanto um fator pronóstico favorável. Os tratamentos com quimioterapia incrementam significativamente a sobrevivência. Há uma variação marcada na sobrevivência de cães com DLBCL de vários índices mitóticos. A sobrevivência média em cães com menos de 20 mitoses por campo de 400x é de 188 dias. Se o exame histológico da Olga tivesse 21 ou mais mitoses por campo de 400x a sobrevivência média descia para os 31 dias (Valli *et al.*, 2013).

### 2.3.2 Caso clínico 2

**Caracterização do animal:** Luna, canídeo, Yorkshire Terrier, fêmea castrada de 8 anos de idade. **História clínica:** Ao exame clínico apresentava múltiplos nódulos cutâneos (Figura 4, Anexo I). **Estudo microscópico:** Manifestava epiderme normal com leve hiperqueratose ortoqueratótica. Na derme superficial, média e profunda apreciou-se um infiltrado nodular composto por macrófagos e linfócitos (alguns neutrófilos) perifolicular, que se centrou a nível perianexal (Figura 5, Anexo I), provocando a destruição das unidades foliculosebáceas. Os nódulos pareciam confluír e estendiam-se até ao tecido adiposo subcutâneo (Figura 6, Anexo I). Coloração imunohistoquímica específica CD 3 (Linfócitos T): A maioria das células mostram forte positividade citoplasmática (Figura 7, Anexo I). **Diagnóstico:** Linfoma cutâneo de linfócitos T, epiteliotrópico (ETCL). **Discussão:** ETCL em cães é uma variante de linfoma de células T, com células que têm um tropismo para o epitélio. Representa 5% de todos os linfomas caninos. O tratamento de escolha em cães com ETCL é lomustina. O prognóstico é grave e o tempo médio de sobrevivência é de seis meses após o diagnóstico, sem diferenciação de tratamento. Muitos cães podem sofrer vários graus de dor e / ou prurido e, embora o tratamento não possa alterar a taxa de progressão da doença ou do tempo de sobrevivência, pode melhorar a qualidade de vida (Schmidt, 2011).



### 2.3.3 Caso clínico 3

**Caracterização do animal:** Kitty, felino, Europeu Comum, fêmea castrada de 3 anos de idade. **História clínica:** Apresentava um nódulo subcutâneo em zona temperomandibular com afetação também orofaríngea. Há 5 meses foram isolados *Cândida* e *Streptococcus* de uma lesão similar. Foi feita biópsia. **Lesões microscópicas:** Mostrava uma proliferação nodular parcialmente delimitada formada por células redondas, pobremente diferenciadas, escassamente coesivas, de citoplasma escasso, claro, com núcleo central redondo, frequentemente vesicular, de bordos irregulares, de cromatina densa com nucléolo central (Figura 9, Anexo I). Exibia presença frequente de figuras mitóticas, atípicas. Possuía diversas áreas centrais da lesão necrosadas (Figura 8, Anexo I). Coloração imunohistoquímica CD 20: As células neoplásicas mostraram uma intensa positividade (Figura 10, Anexo I). **Diagnóstico:** Linfoma difuso de células B grandes, de alto grau. **Discussão:** Linfoma felino é mais frequentemente de células intermédias ou grandes. Linfomas de células grandes são vistos com mais frequência em gatos mais jovens (menores de 6 anos de idade) tal como o animal deste caso. O linfoma cutâneo é relativamente incomum e tem 2 tipos: epiteliotrópico (afeta a epiderme, é de células T e é mais frequente) e não epiteliotrópico, na derme, com melhor prognóstico e pode ser de células B ou T (Ruano, 2013). Este era de células B. O prognóstico à partida era melhor que para o caso anterior, contudo era desconhecido o estadió clínico (se teria envolvimento de outros órgãos).

### 2.3.4 Caso clínico 4

**Caracterização do animal:** Tina, canídeo, Pastor Alemão, fêmea de 11 anos de idade. **História clínica:** Em ecografia foi detetada esplenomegalia. **Estudo microscópico:** Era visível uma proliferação intraesplénica de carácter difuso e uniforme, composta por células de aspeto redondo, de disposição densa, de citoplasma escasso ou moderadamente abundante, basófilo, com núcleo arredondado, hipercromático e nucléolo discreto. O índice mitótico era baixo (0-1 mitoses por campo 40x). Presença de áreas de infiltração hematopoiética e de abundantes macrófagos com hemossiderina (Figura 11, Anexo I). **Diagnóstico:** Compatível com Linfoma difuso/Leucemia. **Discussão:** Apresentava uma população neoplásica de células redondas de aspeto linfoide, compatível essencialmente com um linfoma difuso do baço ou uma leucemia em estadió avançado. A distinção entre ambos requer valorização hematológica e imunohistoquímica. Na leucemia linfoblástica aguda é frequente que exista alteração da produção normal e ordenada das diferentes linhas celulares hematopoiéticas da medula óssea, devido à infiltração de linfoblastos, o que se traduz em citopenias em sangue circulante e a consequente presença de anemias, neutropenias e trombocitopenias (Algarra, 2014). Em ambos os processos o pronóstico geralmente é grave. A aproximação terapêutica vem determinada pelo estadió da doença, o imunofenótipo celular implicado (normalmente a

leucemia linfoblástica é CD34 positiva (Ruano, 2013)) e o estado geral do paciente. Esplenomegalia é um achado comum. Por vezes, a esplenectomia é recomendada se a doença está em retrocesso e se a esplenomegalia é causada por linfoma que não responde à quimioterapia. Estudos indicaram que os cães que foram submetidos a esplenectomia mostraram uma sobrevivência média de 14 meses. Linfoma da zona marginal (MZL) são proliferações de linfócitos B e tanto podem surgir no baço como nos gânglios (Valli *et al.*, 2010), este seria o tipo de linfoma mais provável neste caso mas a sua distribuição não se encontrava apenas na zona marginal. A frequência de apresentação do linfoma linfoblástico na espécie canina é superior à da leucemia linfoblástica aguda. Geralmente cursa com linfadenopatia múltipla generalizada pelo que em ausência de adenopatia ganglionar o diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda é mais provável (Algarra, 2014). Leucemia linfoblástica aguda tem tratamento igual ao linfoma, é rara em cães, e apresenta mais sinais sistémicos. O tempo médio de quimioterapia são 3 meses (Ruano, 2013).

## 2.4 CONCLUSÃO

Este estudo aborda a classificação anatómica, morfológica e imunofenotípica de linfomas.

Foram classificados quatro linfomas, dois cutâneos: um epiteliotrópico de células T e um não epiteliotrópico de células B, um multicêntrico difuso de células B grandes (variante de linfomas mais comum em cães) e um esplênico (possivelmente) em que as IHQ e as análises sanguíneas ao animal eram provas fundamentais para a distinção entre linfoma e leucemia. O linfoma do tipo multicêntrico é o mais frequente e os cutâneos são raros.

O padrão difuso é o mais frequente, tal deve-se ao facto de passar algum tempo até que o proprietário se aperceba que há alguma alteração no seu animal.

O linfoma é a mais comum neoplasia tratada com quimioterapia (Bienzle & Vernau, 2011). Os resultados de quimioterapia convencional em 60-90 % dos casos têm um tempo médio de sobrevivência de 6-12 meses. Em aproximadamente 20-25 % dos casos, os cães vivem dois anos ou mais após o início do tratamento. Nos casos em que a doença é recorrente e uma segunda indução de quimioterapia tem que ser iniciada, a taxa média de sobrevivência é de aproximadamente 336 dias (Crow, 2008).

Existem variados protocolos quimioterápicos para o tratamento de linfoma em cães e gatos. É recomendado eleger um protocolo e manter o seu uso para o clínico, o proprietário e o animal se familiarizarem com os fármacos e a sua toxicidade (Albertus, 2012).

Um prognóstico baseado no estadiamento clínico permite ao clínico e ao proprietário ficarem informados e tomar decisões para o melhor tipo de terapia, o estadiamento da doença de cada animal é baseado nos resultados do exame físico, testes laboratoriais (CBC, perfil bioquímico, urianálise, citologia da medula óssea) e procedimentos imagiológicos (radiografias e

ecografias), citologias e biópsia, sendo o gânglio linfático mais acessível de remover o poplíteo (Moore, 2006).

## 2.5 BIBLIOGRAFIA

ALGARRA C (2014) “Hematología y médula ósea” in **Autoevaluación Citológica en pequeños animales**, Espanha, Servet, 52-71

ALBERTUS J (2012) “Linfoma” in **Oncologia Veterinaria**, Espanha, Servet, 83-99

BIENZLE D, VERNAU W (2011) “The Diagnostic Assessment of Canine Lymphoma: Implications for Treatment”, **Clin Lab Med** 31, Elsevier 21-39

CROW S (2008) “Chemoimmunotherapy for canine lymphoma: tumor vaccines and monoclonal antibodies” **Cancer Therapy** Volume 6, 181-186

DEHEER H, JUOPPERI T (2004) “Lymphoproliferative Disorders” in Rick Cowell, **Veterinary clinical pathology secrets**, Mosby Elsevier, 81-95

FAN T (2013) “Overview of Canine Lymphoma” in **The Merck Veterinary Manual** Merial [citado 15 de Fevereiro de 2015] Disponível em: [http://www.merckmanuals.com/vet/circulatory\\_system/canine\\_lymphoma/overview\\_of\\_canine\\_lymphoma.html?qt=canine%20lymphoma&alt=sh](http://www.merckmanuals.com/vet/circulatory_system/canine_lymphoma/overview_of_canine_lymphoma.html?qt=canine%20lymphoma&alt=sh)

GUSTAFON, T. *et al* (2014) “A retrospective study of feline gastric lymphoma in 16 chemotherapy-treated cats”, **J Am Anim Hosp Assoc.** 50:46-52

MOORE A (2006) “Critical Advances for the Management of Canine Lymphomas” **World Congress WSAVA**, Australia, 558-561

KAYNE M (2013) “Canine Lymphoma” “Feline Lymphoma” [citado 5 de Março de 2015] Disponível em: <http://www.lvghospitals.com/service-cats/oncology/>

RUANO R (2013) **Oncología Práctica para el clínico de pequeños animales**, Barcelona, Multimédica Ediciones Veterinarias, 321-340

SATO, Hirofumi *et al* (2014) “Prognostic Analyses on Anatomical and Morphological Analyses of Feline Lymphoma” **The Journal of Veterinary Medical Science** 76(6):807-811

SCHMIDT V (2011) “Epitheliotropic T-cell cutaneous lymphoma in dogs” **Companion Animal** Volume 16, 49-54

VALLI, V.E. *et al.* (2010) “Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria”, SagePub, **Veterinary Pathology**: 48(1) 198-211

VALLI, V.E. *et al.* (2013) “Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival” SagePub **Veterinary Pathology** 50(5)738-748

## 3. APRESENTAÇÕES DERMATOLÓGICAS DA LEISHMANIOSE CANINA E ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

### 3.1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença causada por parasitas protozoários do género *Leishmania*, é transmitida através da picada de fêmeas de flebótomos (Baneth, 2014).

Tem distribuição mundial e é comum no cão e rara no gato. Foram descritas mais de 23 espécies de *Leishmania*, sendo a maioria zoonóticas (Gross *et al*, 2005).

A *Leishmania* completa o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, numa mosca de areia, que contém a forma promastigota extracelular flagelada e num mamífero, onde se desenvolve a forma amastigota intracelular (Gross *et al*, 2005).

Os cães infetados, podem infetar flebótomos e transmitir a Leishmaniose. A transmissão pode ser também: vertical, apesar de incomum; por transfusão sanguínea e por contato direto. Esta tem sido sugerida como um modo de transmissão da doença, num esforço para explicar a propagação da infeção na ausência de vetores flebótomos comprovados (Baneth, 2014).

A Leishmaniose canina cutânea e visceral é mais frequentemente causada pela *Leishmania infantum*, também conhecida como *L. chagasi* na America Latina, sendo o organismo primariamente responsável por causar a Leishmaniose visceral em humanos. Os canídeos selvagens, roedores e cães são reservatórios naturais. A Leishmaniose canina é normalmente chamada de Leishmaniose visceral desde que seja causada pelo organismo *Leishmania infantum*. Contudo na maioria das vezes a doença apresenta-se combinada na forma cutânea e visceral (Gross *et al*. 2005). Quando a fase cutânea localizada for superada, surge a disseminação visceral. A gravidade e velocidade da evolução estão então relacionadas com o grau e intensidade da resposta imunitária, fundamentalmente humoral (Pinelli, 1994).

A Leishmaniose canina é a maior zoonose endémica em mais de 70 países (Baneth, 2014), incluindo Portugal e Espanha. A maioria dos cães que vive em zonas endémicas são expostos continuamente ao parasita, mas apenas alguns desenvolvem Leishmaniose devido à incapacidade do seu sistema imunitário para controlar a multiplicação do parasita. Apenas cerca de 12% manifestam sinais clínicos da doença, 26% são seropositivos e incluem cães doentes e subclínicamente infetados e 50% são portadores positivos (Baneth, 2014).

Os principais achados do exame físico são lesões dérmicas em 80%-90% dos cães, linfoadenomegalia em 62%-90%, doença ocular em 16%-81%, esplenomegalia em 10%-53% e onicogrifose em 20%-31%. Outros achados clínicos podem incluir perda de peso, letargia, epistaxe, poliúria e polidípsia devido à doença renal, vômitos, colite, melena, e claudicação devido a lesões musculares, ósseas ou articulares (Baneth, 2014). As lesões da pele são a

razão mais comum para a consulta veterinária, podendo ser a única manifestação clínica na admissão do animal (Saridomichelakis&Koutinas, 2014).

O período de incubação pode durar meses ou anos, durante o qual o parasita se dissemina a partir da pele progredindo ao longo do corpo do hospedeiro (principalmente para os órgãos do sistema hemolinfático). A idade, raça, nível de infecção, genética do hospedeiro, nutrição, doenças concomitantes, e outros fatores também podem influenciar a progressão da infecção para a doença clínica (Baneth, 2014).

As lesões dermatológicas associadas à Leishmaniose canina incluem dermatite esfoliativa, que pode ser generalizada ou localizada sobre a face, orelhas, e membros. A dermatite ulcerativa, nodular ou mucocutânea também aparecem com alguma frequência (Baneth, 2014).

Possivelmente devido à probabilidade de exposição ao vector, a Leishmaniose cutânea é mais comum em cães jovens adultos ativos, geralmente de 3 a 7 anos de idade (Gross, 2005).

A doença é extremamente polimórfica e a observação do parasita nos tecidos é necessária para confirmar o diagnóstico (Geigel *et al.*, 2011). A presença de Leishmanias pode ser demonstrada por citologia de gânglios linfáticos, baço, pele, medula óssea, ou fluidos. Estas são rotineiramente coradas com Diff-Quick, mas são mais facilmente encontradas com Giemsa. A detecção de amastigotas por citologia é por vezes ingrata devido ao baixo número de parasitas detetáveis, mesmo em cães com a doença clínica. Os parasitas *Leishmania* também podem ser vistos em secções histopatológicas de biópsia de pele ou outros órgãos infetados. O achado histopatológico típico da Leishmaniose canina é a inflamação granulomatosa associada a um número variável de Leishmanias em macrófagos. A identificação de parasitas no interior de macrófagos de tecido pode ser difícil e para isso recorre-se à imunomarcagem com coloração imunohistoquímica para verificar a presença de *Leishmania*. Há vários métodos serológicos quantitativos para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. A detecção de DNA específico do parasita por PCR permite o diagnóstico mais sensível e específico da infecção. A PCR pode ser realizada sobre DNA extraído a partir de tecidos, sangue, ou até mesmo a partir de blocos histológicos, apesar de no cão a forma amastigota da *Leishmania* raramente ser observada no sangue (Baneth, 2014).

O objetivo deste trabalho pretende mostrar não só algumas das manifestações cutâneas macroscópicas e histológicas da Leishmaniose canina como também a utilidade da técnica imunohistoquímica na identificação de *Leishmania*.

### **3.2 APRESENTAÇÕES CUTÂNEAS**

#### **Dermatite esfoliativa**

Características gerais: é localizada, regional ou generalizada, tem distribuição simétrica ou assimétrica. Com descamação pitiriasiforme e/ou psoriasiforme e eritema. O pêlo apresenta-se

sem brilho, quebradiço, seco ou oleoso com hipotricose, alopecia, hiperpigmentação, crostas e moldes foliculares. Localizações: na cabeça, à volta dos olhos, na ponta do pavilhão auricular, nos membros posteriores, anteriores e no dorso. Diagnósticos diferenciais: demodicose, dermatofitose, adenite sebácea, lúpus eritematoso cutâneo esfoliativo, lúpus eritematoso sistémico e linfoma epiteliotrópico. Histopatologia: hiperqueratose ortoqueratótica e queratose folicular. Menos de 20%: com hiperplasia epidermal, exocitose linfocítica, pústulas subcórneas, crostas serocelulares, degeneração vacuolar das células basais e incontinência pigmentar. Derme: inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa, com macrófagos ou linfócitos. A dermatite perivascular superficial, dermatite perivascular profunda e adenite sebácea em menos de 50%. Também apresentam dermatite nodular e difusa, perifoliculite, dermatite perianexal e paniculite lobular (Saridomichelakis & Koutinas, 2014).

### **Dermatite ulcerativa**

Características gerais: a segunda mais comum, pode ser a única anomalia detetada no exame clínico. Apresenta erosões com eritema e alopecia, que evoluem para úlceras dérmicas superficiais ou profundas. São circulares, normalmente bem demarcadas, com bordos irregulares e uma base áspera a necrótica que é coberta por exsudado purulento ou crostas hemorrágicas. A pele envolvente é hipotricótica, alopecica e eritematosa. Podem ser únicas ou múltiplas, dolorosas e/ou pútridas e secundariamente infetadas. Localizações: ponta do pavilhão auricular, plano nasal, junções mucocutâneas, pontos de pressão, zona inferior das pernas e almofadas plantares. Diagnósticos diferenciais: pioderma bacteriana mucocutânea, lúpus eritematoso cutâneo e sistémico idiopático, vasculite idiopática, doença de aglutininas a frio, reações adversas a medicamentos, dermatomiosite, dermatose actínica, dermatose responsiva ao zinco, síndrome uveodermatológica, dermatite necrótica superficial e linfoma epiteliotrópico. Histopatologia: hiperplasia epidérmica, exocitose neutrofílica, dermatite com macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Saridomichelakis & Koutinas, 2014).

### **Dermatite nodular**

Características gerais: Menos comum que as anteriores e com maior prevalência nos Boxers. Caracteriza-se por nódulos únicos ou múltiplos, medindo até 10 cm de diâmetro, não sendo pútridos e ulcerados. Localizações: qualquer sítio da pele e membranas mucosas. Diagnóstico diferencial: todas as doenças nodulares da pele de etiologia bacteriana, fúngica, inflamatória estéril ou neoplásica. Histopatologia: Predominância de macrófagos e de células gigantes mononucleadas, a carga parasitária é a mais alta entre todas as apresentações cutâneas clinicopatológicas (Saridomichelakis & Koutinas, 2014).

### **Dermatite postular – estéril**

Características gerais: Pouco comum, é caracterizada por pequenas pústulas com uma auréola eritematosa que rompem levando à formação de crostas e colaretes epidérmicos. Localizações: zonas quase sem pêlos. Diagnósticos diferenciais: Pioderma superficial bacteriana, dermatofitose, pênfigos foliáceo, reações postulares adversas a fármacos, dermatose pustular sub-corneal e pustulose eosinofílica estéril. Histopatologia: Pústulas subcorneais neutrofílicas com poucos queratinócitos acantolíticos, excitose e dermatite mononuclear difusa e uma baixa carga parasitária (Saridomichelakis & Koutinas, 2014).

### **Dermatite papular**

Características gerais: é incomum, caracterizada pela presença de pápulas múltiplas e eritematosas. Localizações: áreas sem pêlo e são indolores. Diagnósticos diferenciais: foliculite superficial bacteriana, dermatofitose, demodicose e reações adversas a fármacos. Histopatologia: dermatite piogranulomatosa difusa a nodular, com poucos parasitas. Podem representar uma reação da pele a picadas múltiplas de mosquitos. A baixa carga parasitária na pele e órgãos internos, os baixos níveis de anticorpos, os resultados positivos para *Leishmania* e a boa resposta ao tratamento anti-leishmanial sugere que existe uma forte imunidade mediada por células nestes cães contra *L. infantum* (Saridomichelakis & Koutinas, 2014).

### **Nódulos nos locais de inoculação do parasita**

Características gerais: Pouco comuns. Inicialmente aparentam ser áreas edemaciadas com eritema e descamação e mais tarde evoluem para nódulos ulcerados, com diâmetro de 1 a 3cm, cobertos por crostas e dolorosos. Localizações: parte externa das narinas, no focinho e na parte côncava do pavilhão auricular. Estas lesões normalmente aparecem depois do fim da época de transmissão e curam-se por si num período até 6 meses. Diagnóstico diferencial: o mesmo do que para a dermatite nodular e para a ulcerativa. Histopatologia: Inflamação eosinofílica e neutrofílica, seguida de uma grande infiltração de macrófagos e linfócitos. Os parasitas estão normalmente ausentes. Não há uma explicação razoável do porquê de apenas alguns cães desenvolverem estas lesões, e não foi encontrada nenhuma associação óbvia entre o seu aparecimento e o desfecho da infeção (Saridomichelakis & Koutinas, 2014).

### **Hiperqueratose nasal e podal**

Características gerais: É comum e é caracterizado pela acumulação excessiva de queratina que leva a uma epiderme grossa, dura, inelástica e fissurada. Diagnósticos diferenciais: Esgana, papilomatose, pênfigos, lúpus cutâneo eritematoso, reações adversas a fármacos, distúrbios de queratinização e origens idiopáticas (Saridomichelakis & Koutinas, 2014).

## **Onicogrifose**

Características gerais: É frequente, caracterizada por hipertrofia e curvatura aumentada das unhas, que pode levar ao claudicar. Aparece mais frequentemente em cães de interior devido ao desgaste diminuído. Diagnósticos diferenciais: oncodistrofia idiopática, dermatite por ténias, pênfigo foliáceo e eritematoso, lúpus eritematoso, ictiose. Contrariamente à maioria destes diferenciais, a Leishmaniose associada a onicogrifose é normalmente a única anormalidade das unhas, e o seu diagnóstico torna-se mais fácil quando outras manifestações cutâneas e/ou sistêmicas da doença estão presentes no mesmo cão. Histopatologia: exocitose linfocítica e dermatite mononuclear liquenoide com ou sem degeneração hidrópica dos queratinócitos basais, fissuras demo-epidermais e incontinência pigmentar (Saridomichelakis & Koutinas, 2014).

## **3.3 MATERIAL E MÉTODOS**

Neste estudo foram escolhidos 4 casos, 3 com o objetivo de mostrar diferentes manifestações cutâneas da Leishmaniose e 1 para demonstração da técnica de imunohistoquímica. A informação sobre os animais e história clínica foram sempre limitadas e direcionadas para a lesão em questão.

As formas apresentadas foram: dermatite nodular, nódulos nos locais de inoculação do parasita e dermatite ulcerativa.

O diagnóstico foi realizado por meio de exame citológico de aspirado por agulha fina e/ou secções histopatológicas de biópsias de pele e o último caso além da histopatologia recorreu-se à técnica de imunohistoquímica específica para *Leishmania* utilizando um anticorpo monoclonal anti-*Leishmania* (Ferrer *et al.*, 1988).

## **3.4 RESULTADOS/DISCUSSÃO**

### **3.4.1 Caso clínico 1**

**Caracterização do animal:** Mae, canídeo sem raça definida (SRD), fêmea de 2 anos de idade.

**História clínica:** Apresentava múltiplos nódulos subcutâneos (Figura 1.1, Anexo II).

**Estudo microscópico:** Citologia de gânglio linfático: O fundo era ocupado por células linfocíticas em que predominam células de pequeno e médio tamanho, maduras, bem diferenciadas, sem atipias (87%), alternando com abundantes formas blásticas imaturas (5%). Presença leve de macrófagos reativos com abundantes partículas fagocitadas compatíveis com amastigotas de *Leishmania* (4,5%), células polimorfonucleares neutrófilas e plasmáticas (3%) (Figura 1.3, Anexo II). Biópsia: O corte histológico exibia hiperplasia moderadamente intensa da epiderme, associada a hiperqueratose, com áreas extensas de ulceração. Espongiose multifocal da linha basal e estrato espinhoso. A derme superficial e média contém infiltração inflamatória difusa de



predomínio histiocítico com componente linfoplasmocítico moderadamente abundante e células neutrofílicas esporádicas. Presença frequente de formas intrahistiocitárias compatíveis com amastigotas de *Leishmania* (Figura 1.4, Anexo II). **Diagnóstico:** Dermatite granulomatosa nodular por *Leishmania*. Hiperplasia linfoide e linfadenite granulomatosa por *Leishmania*. **Discussão:** Esta apresentação é pouco comum, Mae tinha múltiplos nódulos em todo o corpo, que aumentaram de quantidade e tamanho ao longo de um mês, também tinha afetação de gânglios linfáticos. Não foi encontrado mais nenhum agente etiológico. A carga parasitária era muito alta semelhante ao descrito por Saridomichelakis & Koutinas, a imunidade está assim gravemente comprometida especificamente aos parasitas. O estado geral da Mae piorou significativamente num espaço de um mês (Figura 1.2, Anexo II) e a resposta ao tratamento anti-leishmanial era fraca.

### **3.4.2 Caso clínico 2**

**Caracterização do animal:** Elsa, canídeo Bulldog Francês, fêmea de 6 meses de idade. **História clínica:** Apresentava pequenos nódulos na zona mandibular e na face interna da orelha (Figuras 2.1-2.3, Anexo II). **Estudo microscópico:** Citologia - Fundo hemático com presença leve de células nucleadas, macrófagos espumosos reativos, alguns com partículas de 2-4 µm fagocitadas, compatíveis com amastigotas de *Leishmania*. Também se observaram partículas livres. Presença reduzida de linfócitos médios, com citoplasma basófilo abundante e núcleo regular, neutrófilos e eosinófilos (Figura 2.4, Anexo II). **Diagnóstico:** Compatível com dermatite linfohistiocítica e com nódulos no local de inoculação do parasita. **Discussão:** Esta apresentação é pouco comum, é sempre assimétrica e apresenta 3 fases bem diferenciadas: fase precoce - caracterizada por lesão eritemo-escamosa de 10-15 mm de diâmetro rodeada por um anel edematoso, fase intermédia - com nódulos ulcero-crostosos com um tamanho de 1-3 cm de diâmetro e fase pré-cicatrizal - que precede o desaparecimento definitivo da lesão. A Elsa encontrava-se na fase nodular com nódulos de diâmetro de 1cm, que foram encontrados na parte côncava do pavilhão auricular, o que quadra com o descrito para estas lesões. Normalmente aparecem depois do fim da época de transmissão e curam-se por si num período até 6 meses. Apesar de ser difícil encontrar parasitas, encontraram-se vários macrófagos cheios de *Leishmanias*. As citologias apresentavam um quadro inflamatório linfohistiocítico com características próprias de uma reação à picada de artrópodes. Aparecem 1 a 6 meses depois do período de atividade dos flebotomos, que corresponde a um tempo médio de incubação de 6 meses. Persistem 3 a 9 meses antes de desaparecerem. O prognóstico nesta apresentação é muito variado e depende fundamentalmente da resposta imunitária do animal, ou podem curar-se ou pode haver uma extensão da infeção por via hematogénea chegando ao baço, fígado e generalizando-se por via sanguínea e linfática.

### **3.4.3 Caso clínico 3**

**Caracterização do animal:** Joy, canídeo sem raça definida, macho de 3 anos de idade. **História clínica:** O animal apresentava prurido de baixa intensidade, lesões alopecicas generalizadas com úlceras no carpo, joelhos e orelhas (Figura 3.1-3.4, Anexo II). Foi tratado com corticosteroides e vacinas para a alergia durante 6 meses, as úlceras melhoraram com os corticosteroides. Foram feitos testes para o hipotireoidismo: Tiroxina total: 1.21 e TSH: 0.58 **Estudo microscópico:** Hiperplasia moderadamente intensa da epiderme, associada a hiperqueratose, com áreas extensas de ulceração. Espongiose multifocal da linha basal e estrato espinhoso. A derme superficial e média continha infiltração inflamatória difusa de predomínio histiocítico, com componente linfoplasmocítico moderadamente abundante e neutrófilos esporádicos. Presença massiva de formas intrahistiocitárias compatíveis com amastigotas de *Leishmania* (Figura 3.5, Anexo II). **Diagnóstico:** Dermatite ulcerativa por *Leishmania*. **Discussão:** O hipotireoidismo foi descartado, não só as lesões histopatológicas não eram típicas de hipotireoidismo como também os valores de Tiroxina total e TSH estavam dentro dos valores de referência (Tiroxina total: 1,2 a 4,0 ug/dl e TSH: 0,04 a 0,6 mUI/mL). A dermatite ulcerativa é das manifestações cutâneas mais comuns. Observou-se alopecia que evoluiu para úlceras dérmicas circulares, bem demarcadas, com bordos irregulares. As lesões eram múltiplas, e secundariamente infetadas, estavam localizadas nos pontos de pressão e zona inferior das pernas, o que está de acordo com a bibliografia (Saridomichelakis & Koutinas, 2014) apresentada neste tipo de lesões. A aparência e a localização (pontas do pavilhão auricular) de úlceras associadas a leishmaniose são sugestivas de vasculite. Não se soube a progressão do animal mas com estes achados o prognóstico é desfavorável.

### **3.4.4 Caso clínico 4**

**Caracterização do animal:** Buster, canídeo Rottweiler, macho de 7 anos de idade. **História clínica:** O animal apresentava zonas de pele engrossada com áreas alopecicas e descamação, não melhorou com antibióticos, a cultura de fungos foi negativa. **Estudo microscópico:** O corte histológico exibia uma hiperplasia epitelial irregular com hiperqueratose ortoqueratótica. Mostrava intensa dilatação dos infundíbulos foliculares com grande acúmulo de queratina que se estendia até ao interior acompanhando os pêlos. Na derme superficial havia um discreto infiltrado inflamatório perivascular com alguns mastócitos e linfócitos. Na derme, a nível da porção média dos folículos, observou-se um infiltrado inflamatório granulomatoso, nodular situado na zona das glândulas sebáceas, este infiltrado estava composto por macrófagos com abundante citoplasma vacuolizado com presença escassa de neutrófilos degenerados e alguns linfócitos e eosinófilos. A coloração imunohistoquímica específica para *Leishmania* foi positiva (Figuras 4.1 - 4.3, Anexo II). **Discussão:** Observou-se um padrão inflamatório nodular crônico com destruição de glândulas sebáceas sem aparente infecção do folículo piloso, que é

compatível com adenite sebácea secundária a uma Leishmaniose. Esta só foi diagnosticada devido à técnica de IHQ.

### 3.5 CONCLUSÃO

Este estudo de Leishmaniose aborda o comportamento das lesões dermatológicas e a sua deteção por imunohistoquímica. Esta demonstrou ser útil como ferramenta complementar para confirmar o diagnóstico, particularmente em órgãos com poucos amastigotas (Geigel *et al.*, 2011). Por IHQ demonstrou-se a presença de amastigotas de *L. infantum* em pele mediante a observação microscópica de imunoprecipitados citoplasmáticos de cor amarela intensa. Obteve-se um bom contraste entre o tecido de fundo e as células com marcador de antígenos.

A identificação do agente etiológico é o diagnóstico de referência. Em todos os casos descritos foi possível identificar a presença do agente em citologia e/ou histopatologia. A caracterização morfológica de amastigotas em secções histopatológicas coradas com hematoxilina-eosina requer uma análise cuidadosa e prolongada, principalmente se os parasitas forem escassos. As lesões histológicas são variadas, e os parasitas podem ser vistos em 14%-80% dos casos; a sua identificação é mais difícil comparando com a citologia, especialmente quando é usada uma coloração de HE em vez de Giemsa, e os resultados falsos-positivos não podem ser excluídos. A imunohistoquímica, que é muito útil adjunto à histopatologia, deve a sua alta sensibilidade e especificidade ao facto de ser positiva em 18.2%-100% dos casos. Quando a carga parasítica é baixa, pode ser preferível a imunofluorescência direta, devido à sua alta sensibilidade (64.3%-100% das amostras) e falta de fluorescência de fundo. Alternativamente, pode ser usada hibridação *in situ*, que é caracterizada por uma sensibilidade relativamente alta (50%-74.5%) e especificidade (100%). Finalmente, PCR da pele parece ser superior aos outros métodos em termos de sensibilidade e especificidade (Saridomichelakis & Koutinas 2014). A PCR não foi usada uma vez que foram facilmente identificados os amastigotas. Quando não o são, é preferível usar a IHQ, não devido ao preço praticado por Citopat Veterinária (29€ para a IHQ e 33.90€ para o PCR) mas porque destrói totalmente o tecido e sobre o bloco não se podem fazer mais provas complementares. A IHQ necessita simplesmente de uma lâmina extraída do bloco de parafina. No caso de sair negativa podem-se fazer outras provas (mais colorações, profundizações...) e a PCR anula essa possibilidade.

Independentemente do método utilizado, é importante referir que a demonstração de amastigotas ou DNA do parasita mostra que o cão está infetado e que os parasitas estão presentes na pele, mas não necessariamente que o cão tem Leishmaniose ou que outra lesão cutânea é resultado desta doença (Saridomichelakis & Koutinas 2014).

O diagnóstico de uma ou várias lesões cutâneas de primoinfeção na leishmaniose canina de forma precoce tem um grande interesse prático. Possibilita a instauração de um tratamento

adequado numa fase inicial da doença, antes da disseminação do parasita no organismo do cão com bons resultados para o controlo desta patologia.

### 3.6 BIBLIOGRAFIA

BANETH, G (2014) “Overview of Leishmaniosis” in **Merck Veterinary Manual** Merial [citado 23 de Fevereiro de 2015] Disponível em: [http://www.merckmanuals.com/vet/generalized\\_conditions/leishmaniosis/overview\\_of\\_leishmaniosis.html](http://www.merckmanuals.com/vet/generalized_conditions/leishmaniosis/overview_of_leishmaniosis.html)

FERRER L et al (1988) “Identification of Leishmania donovani amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining” **Veterinary Science** 44(2):194-196

GEIGEL, L et al (2011) “Detection of Leishmania infantum in an experimentally-infected hamster using immunohistochemistry” **Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí**

GROSS, T et al (2005) “Cutaneous Leishmaniasis” in **Skin Diseases of the Dog and Cat**, Second Edition, Blackwell Science, Reino Unido, 312-317

PINELLI, E et al (1994) “Cellular and humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with Leishmania infantum”, **American Society for Microbiology** Volume 62, 1, 229-235

SARIDOMICHELAKIS M, KOUTINAS A (2014) “Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to Leishmania infantum (*syn.L chagasi*)” **Veterinary Dermatology** 25 61-e22

## 4. ESTIRPE HIPERVIRULENTE DO CALICIVÍRUS FELINO – UM CASO DE NECRÓPSIA COM AFETAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

### 4.1 INTRODUÇÃO

O calicivírus felino (FCV) é um patógeno viral extremamente contagioso, com ampla distribuição na população felina. É um pequeno vírus RNA caracterizado por uma forte variabilidade genética e antigénica (Addie *et al.*, 2012). As infeções por FCV são normalmente associadas com doença aguda, leve e autolimitante do trato respiratório superior (Battilani *et al.*, 2013).

Os sinais clínicos normalmente são leves e incluem: rinite, úlceras orais e, numa menor percentagem, pneumonia (Gaskell *et al.*, 2006). Menos comumente pode também ocorrer morte súbita, dermatite ulcerativa, claudicação, aborto e icterícia (Battilani *et al.* 2013).

A infeção com as estirpes mais comuns de baixa virulência de FCV é associada a morbidade moderada e mortalidade baixa. Porém, atualmente tem existido um aumento do número de casos descritos com estirpes altamente virulentas que causam infeções sistémicas com alta mortalidade, a chamada doença virulenta sistémica associada a FCV (FCV-VSD) (Pesavento *et al.*, 2004, Reynolds *et al.*, 2009). A doença causada por estas estirpes difere das infeções leves comuns com FCV, e é caracterizada por uma mortalidade alta e um tropismo viral marcado para células endoteliais e epiteliais da pele e outros órgãos. Normalmente, as estirpes de FCV-VSD são descritas como altamente contagiosas, afetando uma percentagem elevada da população de gatos com contacto próximo (Pesavento *et al.*, 2004, Reynolds *et al.*, 2009). Contudo, existem relatos de contato próximo sem contágio (Meyer *et al.*, 2011), o que sugere existirem outros fatores predisponentes para a doença.

O vírus também pode permanecer nas fezes de pulgas até 8 dias, e os gatinhos podem ser infetados com FCV pelo contato com pulgas infetadas ou pelas suas fezes (Mencke *et al.* 2009). Os gatos podem ser infetados com FCV via nasal, oral ou via conjuntival. A orofaringe é o principal local de replicação. A virémia ocorre de 3 a 4 dias após a infeção, momento em que o vírus pode ser detetado em muitos outros tecidos (Anonimo, 2012). Contudo o isolamento e a desinfecção são suficientes para evitar a propagação. Preventivamente, onde tenha havido um gato com FCV-VSD e onde as medidas de desinfecção total não se possam empregar, devem-se esperar 4 meses para que o vírus desapareça do ambiente (Colado 2010).

O FCV-VSD afeta todas as faixas etárias mas provoca uma mortalidade mais elevada em gatos adultos (até 67%), ao provocar uma severa resposta inflamatória sistémica. Inicialmente podem-se observar os sinais típicos de uma infeção por calicivírus com um quadro respiratório de vias altas, úlceras orais e febre, mas posteriormente o quadro progride para uma vasculite

com edema cutâneo, úlceras, sinais variáveis de dor articular e, em quadros severos, falha multissistêmica com icterícia por necrose hepática, edema pulmonar ou pneumonia, CID, ascite e efusão pleural. O diagnóstico de FCV-VSD deve basear-se nos sinais clínicos compatíveis, no seu caráter contagioso e na sua alta mortalidade. Não é simples diferenciar um FCV-VSD de um FCV capaz de originar sinais graves (pneumonia, úlceras orais severas). A realização de PCR em sangue ou tecidos apoia o diagnóstico mas não o confirma já que num quadro agudo por FCV se produz uma virémia que permite encontrar o vírus em fezes, sangue e órgãos afetados. O diagnóstico definitivo realiza-se por imunohistoquímica para identificar as estirpes de FCV-VSD nos órgãos afetados (Colado 2010).

Os sinais clínicos de FCV-VSD são: espirros, conjuntivite, rinite, lacrimejar, salivação e úlceras orais. Um diagnóstico definitivo é obtido com o isolamento e identificação do agente. A mucosa orofaríngea, narinas externas e sacos conjuntivais são os locais de amostras preferenciais. Amostras de secreções oculares, nasais, ou caudais da faringe para PCR podem ajudar a estabelecer um diagnóstico do agente causador (Kuehn, 2013).

Os achados microscópicos de FCV numa fase inicial são: pneumonia intersticial com necrose de pneumócitos tipo I induzida por vírus, exsudação serofibrinosa, e grande número de neutrófilos. À medida que a doença progride, há proliferação de pneumócitos tipo II, e as células inflamatórias tornam-se mais mononucleares. As lesões na mucosa do trato respiratório superior e na conjuntiva estão confinados a moderada infiltração de neutrófilos, edema, necrose e descamação de células individuais. A FCV-VSD apresenta-se com necrose epitelial e ulceração, pneumonia broncointersticial, alterações hepáticas que vão desde a interrupção do parênquima ao extenso rompimento hepatocelular e necrose pancreática (Pesavento *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho é descrever o diagnóstico anatomopatológico com recurso a PCR num caso de uma doença sistêmica que levou a óbito um gato adulto com afetação em vários órgãos, incluindo o Sistema Nervoso Central.

## 4.2 RESULTADOS/CASO DE NECRÓPSIA

**Caracterização do animal:** Kissa, felino Europeu Comum, fêmea jovem adulta. **História clínica:** Gata de colônia de rua, não vacinada. Teste de FIV e FeLV negativo. Apresentava sintomatologia respiratória. Acabou por falecer e foi submetida a necrópsia. **Lesões Macroscópicas:** Exame externo: Apresentava lesões crostosas e ulcerativas nas comissuras labiais. As mucosas estavam ligeiramente ictéricas. Na língua e gengivas observaram-se múltiplas lesões ulcerativas e hemorrágicas. Com presença de áreas de edema subcutâneo a nível facial. Exibia linfadenopatia cervical. Cavidade torácica: Pulmões - Ambos os pulmões apresentavam uma intensa consistência com aspeto edematoso, observou-se uma severa

hemorragia bilateral na área mediastínica e lóbulo caudal (face costal) com presença de petéquias nos lóbulos pulmonares e áreas congestivas (Figura 1.1). Traqueia – Possuía uma ligeira quantidade de líquido espumoso serosanguinolento. Coração - sem alterações. Resto dos órgãos e cavidades não se observaram lesões aparentes. Cavidade abdominal: Gânglios linfáticos mesentéricos - com hemorragias. Estômago e intestino delgado – com escasso conteúdo de coloração avermelhada. Intestino grosso – fezes pastosas a líquidas de cor negra. Rins - exibiam palidez bilateral. Cavidade craniana: apresentava congestão e hemorragias (Figura 1.2). **Lesões Microscópicas**: Pele e mucosas – apresentavam ulceração epidérmica generalizada com abundantes neutrófilos polimorfonucleares e formas bacterianas tipo cocos. A epiderme estava hiperplásica com hiperqueratose paraqueratótica e formação de crostas serocelulares com neutrófilos e eritrócitos. A derme superficial exibia necrose em banda da associada a infiltração periférica de células inflamatórias com abundantes neutrófilos, histiócitos e linfócitos. A derme superficial e profunda possuía tumefação vascular e edema. Apresentava êmbolos fibrinóides dentro de alguns vasos na derme superficial e múltiplas hemorragias dérmicas. Língua – exibia úlceras e hemorragias (Figura 1.3). Pulmões - De forma generalizada observou-se uma congestão, engrossamento e destruição de septos alveolares com aumento da celularidade e extravasamento de fibrina formando membranas hialinas alveolares. Nos alvéolos observa-se um marcado edema generalizado com escassa presença de alguns macrófagos e neutrófilos. Os brônquios terminais mostraram falta de epitélio colunar e ocasionalmente observa-se necrose. Presença de hemorragias peribronquiais, peribronquiolares e alveolares (Figura 1.4). Fígado – apresentava padrão difuso, observou-se dilatação, congestão de sinusoides hepáticos e dilatação do espaço de Disse. Presença multifocal de hepatócitos necróticos. Estômago e intestino – exibia autólise marcada. Gânglios linfáticos – com múltiplos focos de hemorragia subcapsular com incremento de macrófagos e com hemossiderina nos seios. Baço - Presença multifocal de um infiltrado inflamatório formado por neutrófilos e macrófagos, sobretudo em vasos sanguíneos e na zona sinusoidal.

Encéfalo: Tinha autólise. Observaram-se focos de hemorragia e necrose fibrinóide moderada de artérias de baixa e médio calibre, fibrose e edema proteináceo. **Biologias molecular**: Realizou-se PCR de fragmentos de pele, mucosa oral, fígado, pulmão e encéfalo em parafina para calicivírus felino. Todas as amostras foram positivas. **Diagnóstico**: Dano alveolar agudo (pneumonia intersticial), difuso, grave com edema alveolar, bronquiolite necrotizante e hemorragias pulmonares. Dermatite e estomatite ulcerativa severa. Necrose hepática multifocal. Hemorragias em múltiplos órgãos. Vasculite. Calicivírus felino.

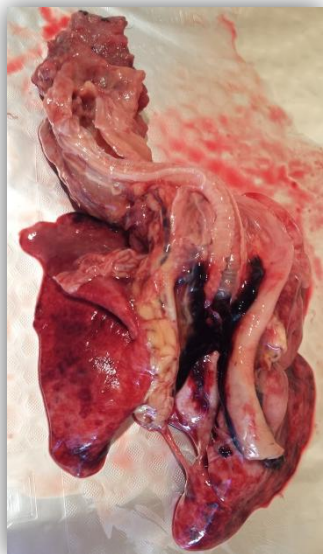


Figura 1.1. Petéquias hemorrágicas em pulmão e hemorragia na traqueia de um gato com calicivírus felino.

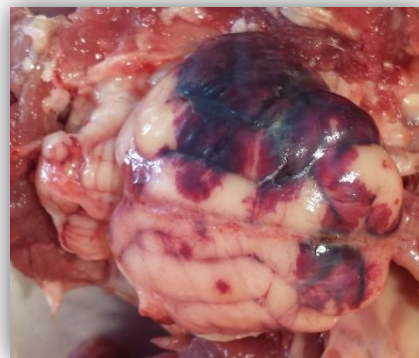


Figura 1.2. Áreas hemorrágicas no encéfalo de um gato com calicivírus felino.

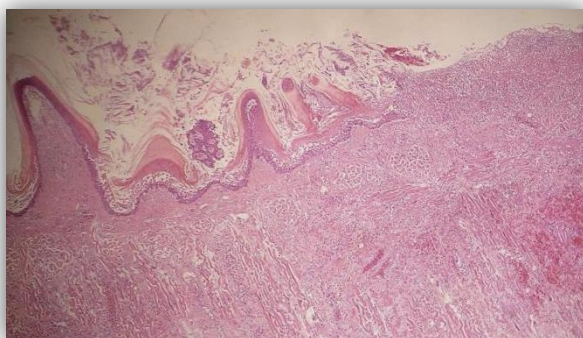


Figura 1.3. Presença de lesões hemorrágicas e ulcerativas na língua (HE, 40x).

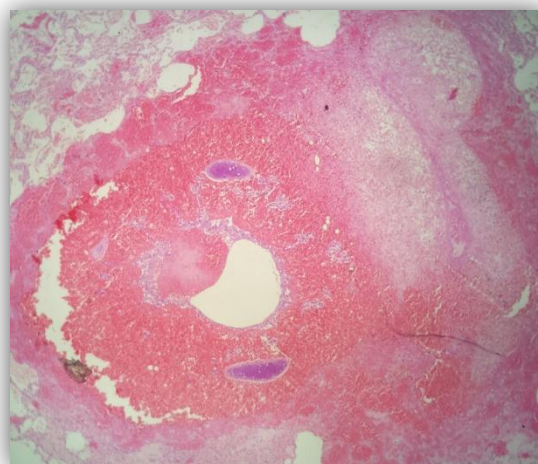


Figura 1.4. Corte histológico de pulmão com presença de hemorragias peribronquiais (HE, 40x).

### 4.3 DISCUSSÃO

Os sinais clínicos, as lesões macro e microscópicas e a PCR de vários órgãos levaram ao diagnóstico final de infecção sistêmica por FCV. A imunohistoquímica não foi realizada devido ao elevado custo da mesma.

Este tipo de infecções pode causar elevada mortalidade com lesões variáveis, como necrose e ulceração mucocutânea, pneumonia broncointersticial, alterações hepáticas, com alteração do parênquima hepatocelular, necrose pancreática e hemorragias em múltiplos órgãos. Parece que nestes surtos hiperagudos o vírus mostra um tropismo por células epiteliais e endoteliais, que induz um dano vascular sistêmico, afetando os pulmões, pâncreas e fígado. Cursa clinicamente com febre, edema, falência multiorgânica, hemorragias, choque e morte.

Há múltiplas estirpes de calicivírus felino que variam no grau de virulência. Até hoje têm-se associado estirpes patogênicas de FCV-VSD com um número de surtos que se caracterizam por



estes sinais sistêmicos graves e que podem levar à morte animais adultos. Estas estirpes são designadas como calicivírus virulento sistêmico. Com base em análises genéticas, estas surgem como mutações de outras estirpes de FCV. Os isolamentos víricos mostram partículas víricas que parecem distintas dos outros FCV e distintas entre os diferentes casos analisados (Meyer *et al.* 2011).

As lesões típicas associadas a uma infecção com FCV-VSD, incluindo edema subcutâneo, dermatite necrosante e vasculite, estavam presentes no gato afetado. Também foi observada a necrose de órgãos como: pâncreas, fígado, pulmões e encéfalo.

A virulência específica de uma estirpe de vírus não é o único fator predisponente para o desenvolvimento de uma doença sistêmica. Outros, tal como imunossupressão, podem ter aumentado a suscetibilidade do gato afetado à estirpe virulenta de FCV-VSD ou permitido a doença sistêmica causada por uma estirpe de virulência baixa. Contudo, a última não foi descrita em gatos imunocomprometidos (Meyer *et al.* 2011). Fatores predisponentes no presente caso podem ter sido outras doenças assintomáticas presentes antes da infecção por FCV. Também é possível que outros gatos no grupo fossem já portadores da estirpe viral mas eram resistentes à doença. A proteção aparenta ser variável e provavelmente depende da estirpe viral envolvida.

#### 4.4 BIBLIOGRAFIA

ADDIE D, HORZINEK M, SANDOR B *et al.* (2012) "Feline calicivirus infection What's new?" **Journal of Feline Medicine and Surgery**

COLADO ML, PÉREZ V (2010) "Infección por calicivírus" in **Enfermedades infecciosas felinas**, Zaragoza, Editorial Servet, 233-270

BATTILANI *et al.* (2013) "Virulent feline calicivírus disease in a shelter in Italy: A case description" **Veterinary Science** 95, 283-290

GASKELL RM *et al.* (2006). "Feline respiratory disease" in **Infectious diseases of the dog and cat**, Greene CE (Ed), Saunders Elsevier, 145-154

KUEHN N (2013) "Feline Respiratory Disease Complex" in **The Merck Veterinary Manual**, Merial

MENCKE N *et al.* (2009) "Transmission of feline calicivirus via the cat flea (*Ctenocephalides felis*)". **Parasitol Res** 105(1):185-9

MEYER *et al.* (2011) "Feline calicivírus-associated virulent systemic disease not necessarily a local epizootic problem" **Veterinary Record** 168 (22) 589

PESAVENTO *et al.* (2004) "Pathologic, immunohistochemical, and electron microscopic findings in naturally occurring virulent systemic feline calicivirus infection in cats" **Veterinary Pathology** 41: 257-263

REYNOLDS BS, *et al.* (2009) "A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France" **Journal of Feline Medicine and Surgery** 11, 633-644

## 5. DIAGNÓSTICO IMUNOHISTOQUÍMICO DE UM TUMOR NEUROENDÓCRINO RELACIONADO COM DERMATITE NECROLÍTICA SUPERFICIAL

### 5.1 INTRODUÇÃO

Os tumores neuroendócrinos (NET) são um grupo extremamente heterogêneo de neoplasias (Kaemmerer *et al.*, 2014). Estes são encontrados numa variedade de localizações e são raros em pessoas e animais. Exemplos de NET incluem tumores gastroenterohepáticos (gastrinoma, insulinoma, glucagonoma), feocromocitoma, carcinoma medular da tireóide e alguns tumores hipofisários. Os NET, são identificados e classificados pela sua aparência microscópica e identificação imunohistoquímica dos marcadores de células neuroendócrinas como a cromogranina A (Kemppainen, 2013). Tanto esta como a sinaptofisina definem o seu caráter neuroendócrino, com positividade para uma ou para ambas. É necessário fazer IHQ para demonstrar péptidos hormonais específicos, como insulina e glucagão (Martínez, 2003).

O insulinoma é o NET mais comum em animais domésticos, já os glucagonomas são menos frequentes (Kemppainen, 2013). Os animais afetados com glucagonoma mostram lesões cutâneas caracterizadas por uma dermatite necrolítica superficial (SND) afetando junções mucocutâneas, almofadas plantares, cotovelos ou abdómen (Kemppainen, 2013).

Várias combinações de hormonas pancreáticas (insulina, glucagão, polipéptidos pancreáticos e somatostatina) podem ser demonstradas nos tumores neuroendócrinos pancreáticos (PNET), bem como hormonas não encontradas nas células endócrinas do pâncreas (gastrina e calcitonina). Os sinais clínicos dependem das hormonas segregadas. O comportamento biológico dos PNET é difícil de prever devido às suas características histológicas. Os critérios histológicos aceites para malignidade, como o pleomorfismo nuclear ou infiltração dos tecidos adjacentes, não são fiáveis na avaliação de PNET em seres humanos, bem como em cães (Minkus *et al.*, 1997).

A SND é uma doença cutânea em cães que partilha muitas características clínicas e histopatológicas com o eritema necrolítico migratório de seres humanos. Este tipo de eritema é normalmente associado a hiperglucagonemia secundária a neoplasia pancreática secretora de glucagão. Foi aplicado o termo “síndrome hepatocutâneo” a este subtipo (Gross *et al.*, 1993).

Nos cães, as lesões cutâneas são mais frequentemente encontradas nas almofadas plantares, cotovelos, jarrete, face, abdómen ventral e períneo. Os termos SND, necrose metabólica epidérmica, dermatose diabética, síndrome hepatocutâneo e eritema migratório necrolítico foram já todos usados para descrever as lesões cutâneas em cães. Estas incluem: hiperqueratose paraqueratótica e hiperplasia epidermal moderada associada com edema intracelular do estrato superior da camada espinhosa. As lesões criam camadas distintas: detritos celulares queratinosos, intensamente eosinofílicos, mais superficialmente;

queratinócitos edematosos mais palidamente corados numa camada intermédia; e uma zona profunda de células basais basofílicas hiperplásicas. Foram identificadas alterações histológicas semelhantes em cães com neoplasias secretoras de glucagão ou síndrome hepatocutâneo. Acredita-se que a patogénese da doença cutânea seja um resultado indireto de uma concentração cronicamente elevada de glucagão plasmático (Zincierman, 2008).

Foi descrita hiperglicémia ou intolerância à glucose em associação com diabetes mellitus nalguns cães com glucagonomas (Zimmerman, 2008). Nem sempre é identificado um tumor pancreático primário. Assim, o diagnóstico de glucagonoma foi alcançado ao demonstrar imunorreatividade ao glucagão em metástases envolvendo mais frequentemente o fígado e os nódulos linfáticos hepáticos ou mesentéricos (Zimmerman, 2008).

Os diagnósticos diferenciais clínicos para SND em cães incluem eritema multiforme, erupção medicamentosa, pênfigo foliáceo, lúpus eritematoso sistémico, dermatose responsiva a zinco. A histopatologia é útil na diferenciação da maior parte destas doenças. A ecografia hepática deve ser realizada para avaliar a presença do padrão patognomónico "favos de mel" visto com SND bem como para afastar a possibilidade de neoplasia de pâncreas subjacentes. Ecografia abdominal e biópsia de pele são necessárias para o diagnóstico (Gross *et al.*, 2005).

Este estudo descreve as alterações microscópicas num cão com SND onde não foram encontrados tumores pancreáticos mas sim metástases em gânglio linfático regional.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo apresenta um caso de dermatite necrolítica com posterior achado ecográfico de uma massa abdominal. A informação sobre o animal e história clínica foram algo limitadas e direcionadas para as lesões em questão.

O diagnóstico foi realizado por secções histopatológicas de biópsias de pele e gânglio linfático mesentérico. Foram realizadas diversas imunohistoquímicas pedidas a laboratórios externos a que não se teve acesso ao protocolo, foram elas: citoqueratina AE1/AE3 (marcador epitelial), sinaptofisina e cromogranina (marcadores neuroendócrinos), insulina e glucagão.

## 5.3 RESULTADOS

### **Caso clínico**

**Caracterização do animal:** Paquito, canídeo Bulldog Francês, macho de 8 anos de idade.

**História clínica:** Paciente diabético há um ano. Apresentava há um mês lesões ulcerativas e eritematosas nas axilas e virilhas, região periescrotal, perilabial e nas almofadas plantares. O animal foi tratado com antibióticos sem êxito. **Estudo microscópico:** Observou-se marcada hiperplasia irregular da epiderme com hiperqueratose ortoqueratótica. Apoptose de queratinócitos e exocitose difusa e pouco intensa de linfócitos. Separação focal

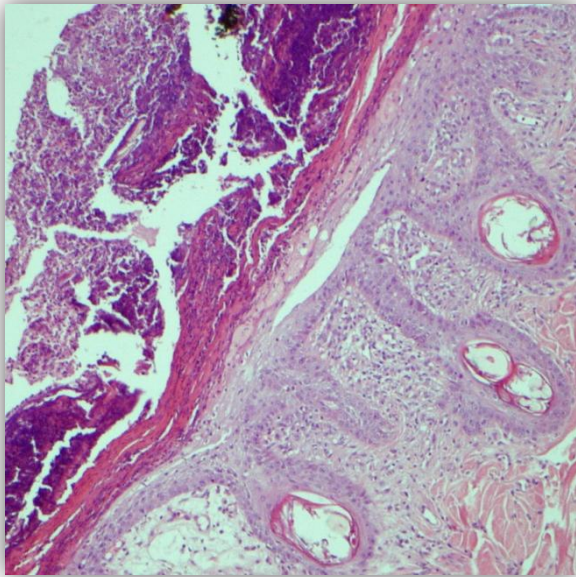


Figura 2 – Pele, cão. Dermatite necrótica superficial. Presença de crosta superficial e edema (H-E, 100x).

dermoepidérmica (Figura 2) sem outras alterações associadas. Numa extremidade da biópsia o estrato superior da epiderme vacuolizou-se e na superfície formou-se um grande acúmulo de material crostoso onde se observaram bandas de detritos celulares, com restos de núcleos, neutrófilos degenerados e material seroso intensamente eosinófilo. Nesta zona observou-se um discreto infiltrado subepidérmico com alguns macrófagos, nas outras zonas o infiltrado é perivascular superficial com mastócitos, linfócitos e células plasmáticas. **Diagnóstico:** Dermatite perivascular com hiperqueratose. Dermatite crostosa serocelular. As lesões são

compatíveis com uma infecção bacteriana, o quadro histopatológico foi sugestivo de uma dermatite necrótica superficial. **Evolução:** 2 meses depois foi feita biópsia de massa encontrada ecograficamente em zona abdominal a que correspondia um gânglio linfático mesentérico. **Estudo microscópico:** Estrutura ganglionar alterada. Observou-se uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso (Figura 3.2). Apresentava pequenos agregados de células epiteliais. Possuía numerosos septos de tecido conjuntivo contendo pequenos capilares que irradiaram a partir da cápsula para o interior da neoplasia e subdividiam as células em pequenos lóbulos (Figura 3.1). A neoplasia apresentou-se intensamente celular. Os lóbulos estavam separados por septos fibrovasculares de espessura variável. As células neoplásicas eram poligonais e estavam arranjadas em cordões densamente celulares. Tinham limites celulares indistintos, quantidades moderadas de citoplasma eosinófilico e finamente granular. Os núcleos eram redondos a ovais, vesiculados ou continham cromatina grosseiramente aglomerada e um nucléolo variavelmente distinto. Tinha infiltração vascular com células neoplásicas. As figuras de mitose foram pouco frequentes. As colorações imunohistoquímicas: citoqueratina AE1/AE3, sinaptofisina (Figura 3.3) e cromogranina foram positivas; insulina foi negativa e glucagão foi inconclusiva. **Diagnóstico:** Tumor neuroendócrino metastático.

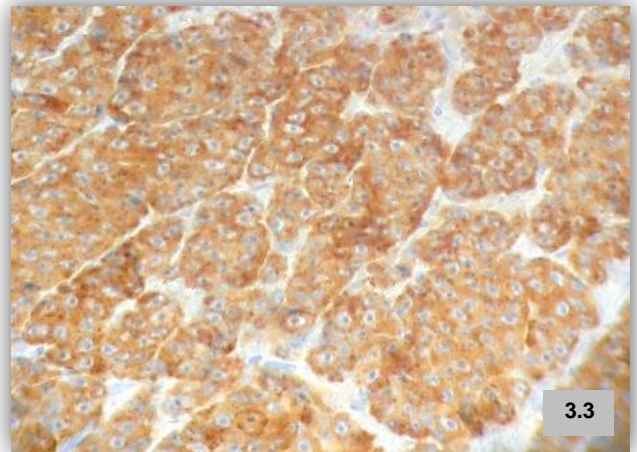
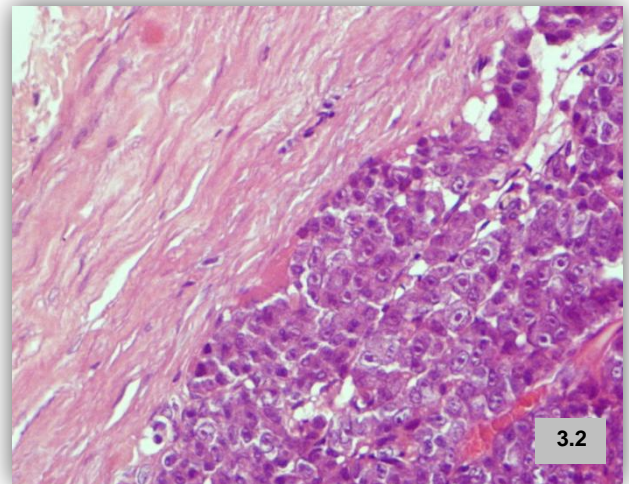
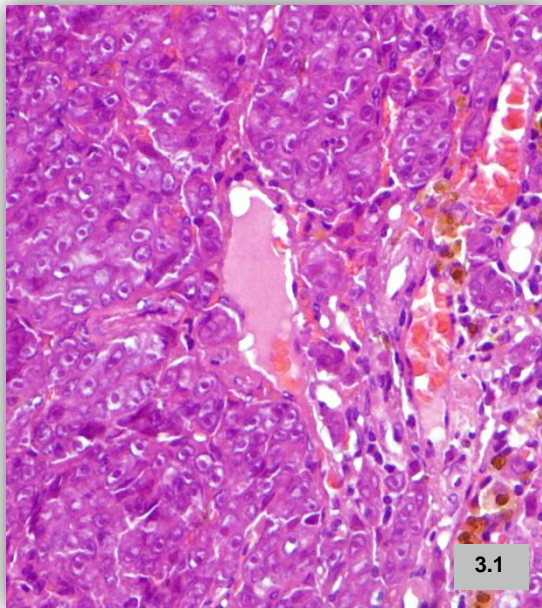


Figura 3 – Gânglio linfático mesentérico, cão. Em 3.1 – Numerosos septos fibrosos finos de tecido conjuntivo que contém pequenos capilares subdividindo as células em pequenos agregados. Em 3.2 - Morfologia alterada pelo tumor neuroendócrino. Observa-se cápsula de grande espessura de tecido conjuntivo fibroso (HE a 400x). Em 3.3 – Marcação IHQ com anticorpo reativo para a sinaptofisina (400x).

#### 5.4 DISCUSSÃO

O animal acabou por ser eutanasiado antes da emissão de um diagnóstico definitivo. Devido à localização da massa e à histologia da mesma sabe-se que esta estava localizada num gânglio linfático mesentérico não tendo sido encontrado o tumor primário. Sabe-se que teria um tumor neuroendócrino (provas de sinaptofisina e cromogranina A deram positivas) que podia não ser secretor, apesar de o sugerir porque o cão tinha síndrome hepatocutâneo. Também se sabe que tem origem epitelial (prova de citoqueratina AE1/AE3 positiva), portanto um carcinoma das células dos ilhéus seria a suspeita mais provável. Era compatível com um glucagonoma devido às semelhanças marcantes com a SND (diabetes mellitus e lesões cutâneas histologicamente semelhantes).

A prova IHQ de insulina foi negativa pelo que se pode excluir o NET mais comum (insulinoma) e a do glucagão foi inconclusiva.

Estes achados sublinham a importância de saber as concentrações plásmicas de glucagão para atingir um diagnóstico definitivo de glucagonoma, as quais não foram realizadas. Esta

síndrome é mais frequentemente associado com um tumor pancreático endócrino que segrega altos níveis de glucagão (Zimmerman, 2008).

Apesar dos glucagonomas serem tumores pouco comuns, devem ser considerados como diagnóstico diferencial em qualquer paciente exibindo mudanças clínicas e histológicas consistentes com dermatite superficial necrótica. Um diagnóstico de glucagonoma deve ser baseado em concentrações elevadas de glucagão no plasma e um tumor pancreático neuroendócrino confirmado. A análise imunohistoquímica do tumor é também uma ferramenta de diagnóstico muito útil apesar de muitos tumores de células dos ilhéus produzirem múltiplas hormonas. O prognóstico para pacientes com e sem excisão cirúrgica deste tipo de neoplasias permanece pobre a reservado (Zimmerman, 2008) e neste caso o cão já tinha afetação de gânglios linfáticos regionais.

## 5.5 BIBLIOGRAFIA

GROSS T L *et al.* (1993) "Superficial Necrolytic Dermatitis (Necrolytic Migratory Erythema) in Dogs" California, **Veterinary Pathology** 30:75-81

GROSS T L *et al.* (2005) "Superficial Necrolytic Dermatitis" in **Skin Diseases of the Dog and Cat**, Second Edition, Blackwell Science, Reino Unido, 86-91

KAEMMERER D *et al.* (2014) "Somatostatin receptor immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: comparison between manual and automated evaluation" **International Journal of Clinical and Experimental Pathology** 7(8): 4971-4980

KEMPPAINEN, R J (2013) "Overview of Neuroendocrine Tissue Tumors" in **Merck Veterinary Manual** EUA Meril [citado 26 de Fevereiro de 2015] Disponível em: [http://www.merckmanuals.com/vet/endocrine\\_system/neuroendocrine\\_tissue\\_tumors/overview\\_of\\_neuroendocrine\\_tissue\\_tumors.html](http://www.merckmanuals.com/vet/endocrine_system/neuroendocrine_tissue_tumors/overview_of_neuroendocrine_tissue_tumors.html)

MARTÍNEZ JFG (2003) "Tumores endócrinos pancreáticos", **Revista Española de Patología**, Vol 36, nº4: 405-412

MINKUS G *et al.* (1997) "Canine Neuroendocrine Tumors of the Pancreas: A Study Using Image Analysis Techniques for the Discrimination of Metastatic Versus Nonmetastatic Tumors", **Veterinary Pathology** 34:138-145

ZIMMERMAN K (2008) "A challenging case: Glucagonoma-associated superficial necrolytic dermatitis in a dog" [citado 26 de Fevereiro de 2015] Disponível em: <http://veterinarymedicine.dvm360.com/challenging-case-glucagonoma-associated-superficial-necrolytic-dermatitis-dog?id=&pageID=1&sk=&date=>

# ANEXO I - Linfoma – Diagnóstico Cito-histológico e Estudo Imunohistoquímico

## Caso clínico 1

Olga, canídeo Dobermann, fêmea de 8 anos de idade

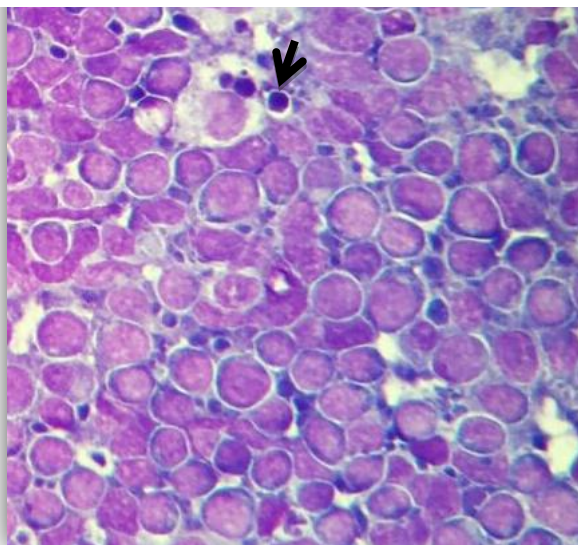


Figura 1 – Linfoma de células médias/grandes. Citologia de aspirado de gânglio linfático submandibular. Presença de elevado número de linfoblastos predominantemente de médio a grande tamanho com citoplasma basófilo. Alguns corpos linfoglandulares (seta) (Diff-Quick, 400x).

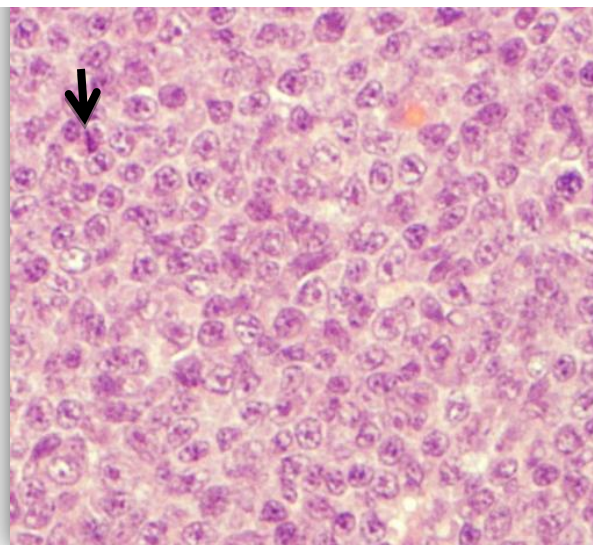


Figura 2 – Linfoma difuso de células B grandes centroblástico. Corte histológico de gânglio linfático submandibular. Os núcleos são 2.5x o tamanho de um eritrócitos e redondos com cromatina clara com 2-3 nudéolos. Visível uma mitose (seta) (HE, 400x).

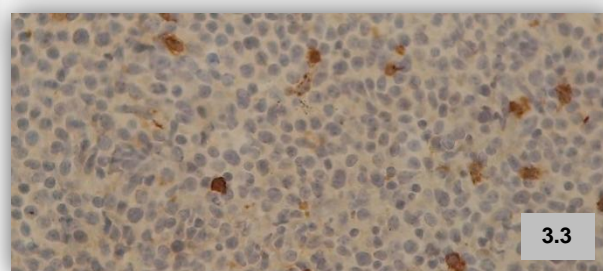
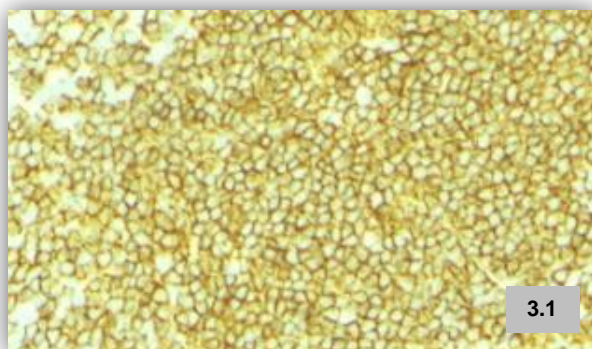


Figura 3 - Linfoma difuso de células B grandes Centroblástico. Marcação de CD20 em gânglio linfático. 3.1 – No controlo positivo. 3.2 – No gânglio linfático da Olga. 3.3 - Controlo negativo (200x).

## Caso clínico 2

Luna, canídeo, Yorkshire Terrier, fêmea castrada de 8 anos de idade



Figura 4 – Linfoma cutâneo epiteliotrópico em canídeo. Podem-se observar nódulos cutâneos. 2.1 - Em zona dorso-lombar. Em 2.2 dorsal ao olho direito. 2.3 - Na junção do plano nasal com o lábio. 2.4 - Na zona dorsal do nariz.

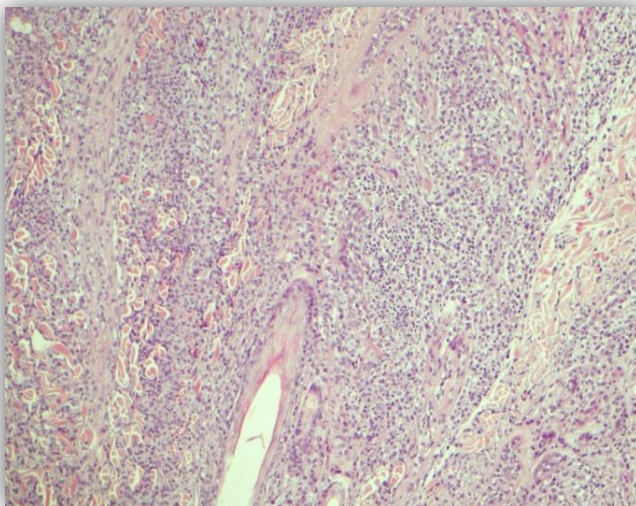


Figura 5 – Linfoma cutâneo de células T, epiteliotrópico. Corte histológico de nódulo cutâneo com linfoma, presença difusa de linfócitos pela derme (HE,100x)

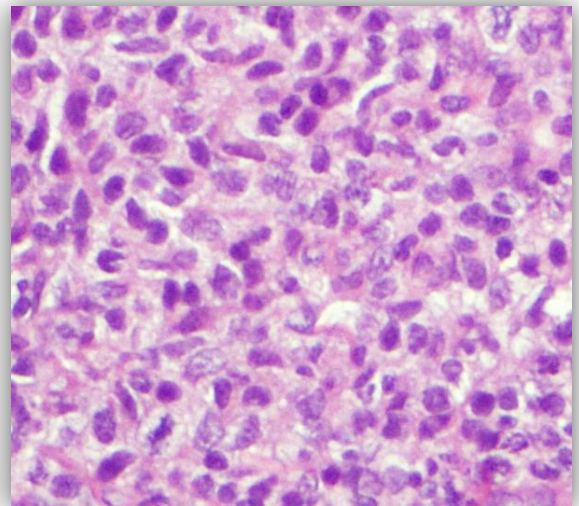


Figura 6 – Linfoma cutâneo de células T, epiteliotrópico podem-se observar células redondas, pobremente diferenciadas, escassamente coesivas, de citoplasma escasso, claro, com núcleo central redondo, de bordos irregulares, de cromatina densa com nucléolo central. (HE,400x).



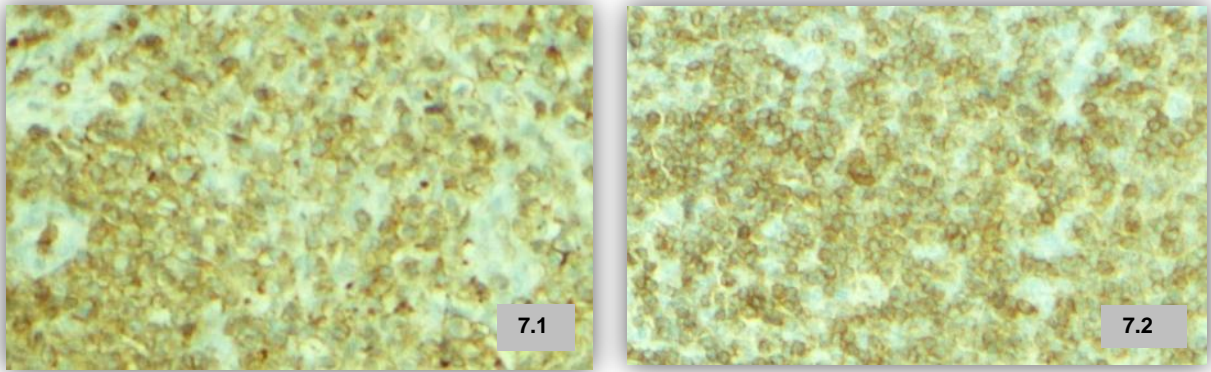


Figura 7 – Linfoma cutâneo de células T epiteliotrópico. Marcação de CD3 do nódulo cutâneo. 7.1 – Controlo positivo. 7.2 - De notar a forte positividade das células tumorais para CD3 (200x).

### Caso clínico 3

Kitty, felino Europeu Comum, fêmea castrada de 3 anos de idade

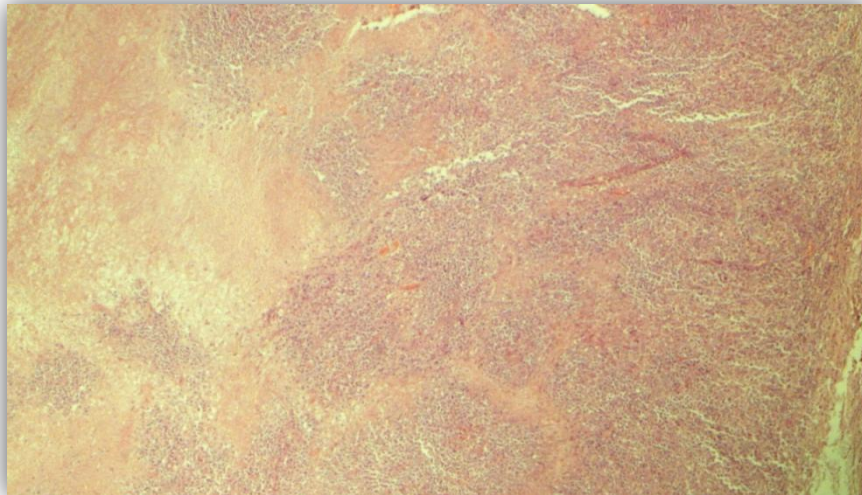


Figura 8 – Linfoma difuso de células B grandes, de alto grau. Corte histológico de nódulo subcutâneo. Proliferação nodular parcialmente delimitada formada por células redondas. Apresenta áreas de necrose (HE, 40x).

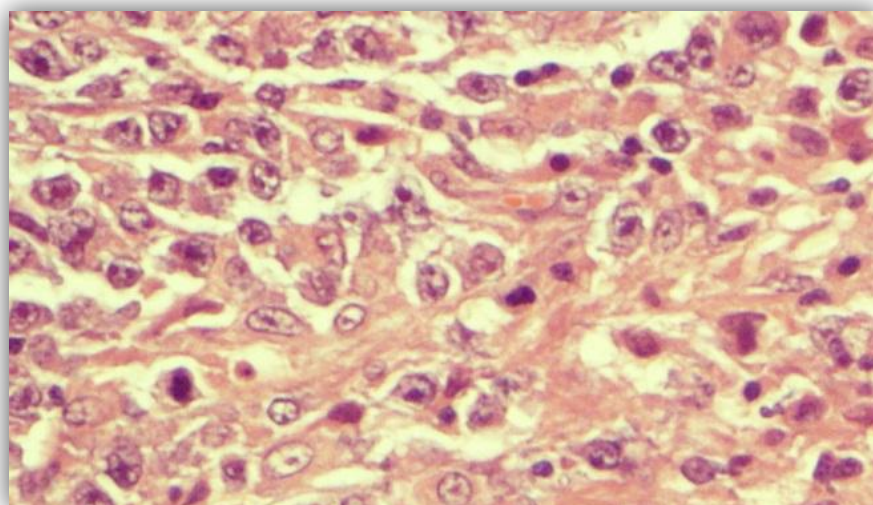


Figura 9 – Linfoma difuso de células B grandes, de alto grau. Podem-se observar células predominantemente com um nucléolo e células redondas, pobremente diferenciadas, escassamente coesivas, de citoplasma escasso, claro, com núcleo central redondo, de bordos irregulares, de cromatina densa e com nucléolo central. (HE,400x).

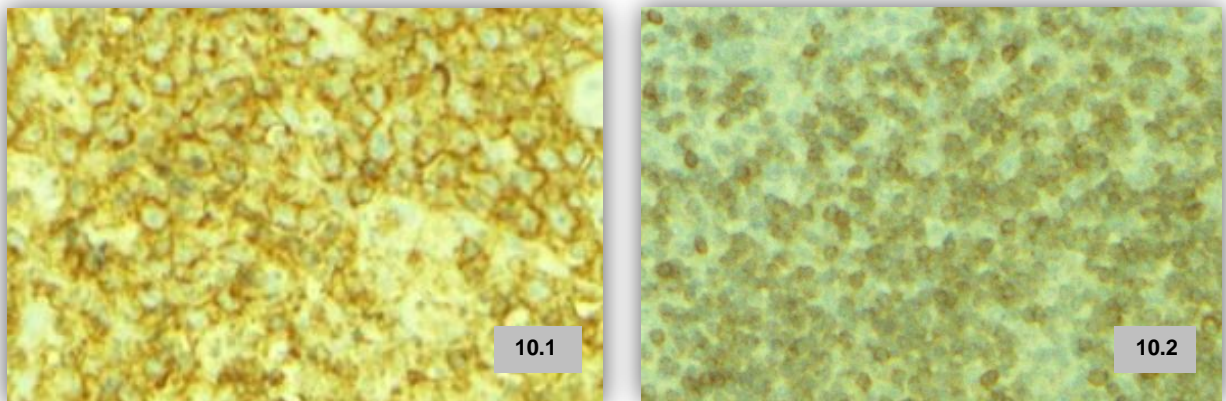


Figura 10 – Linfoma difuso de células B grandes, de alto grau . Coloração imunohistoquímica para o anticorpo CD20. 10.1 - Controle positivo. 10.2 - Nódulo subcutâneo da Kitty. As células neoplásicas mostram uma intensa positividade (400X).

## Caso clínico 4

Tina, canídeo, Pastor Alemão, fêmea de 11 anos de idade

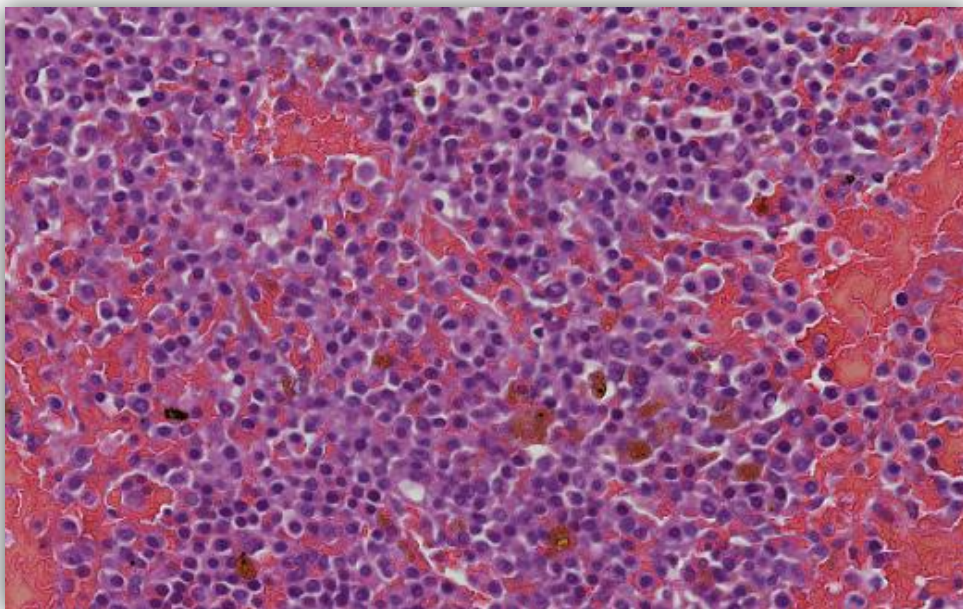


Figura 11 – Corte histológico de baço com linfoma. Proliferação difusa de células atípicas de grande tamanho, disposição densa, redondas com abundante citoplasma basófilo. Núcleo arredondado, hiper Cromático e nudéolo discreto. Presença de áreas de infiltração hematopoiética e de abundantes macrófagos com hemosiderina. (HE, 400x).

## ANEXO II - APRESENTAÇÕES DERMATOLÓGICAS DA LEISHMANIOSE CANINA E ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

### Caso Clínico 1

Mae, canídeo SRD, fêmea de 2 anos de idade



Figura 1.1. Dermatite nodular provocada por Leishmaniose numa cadela SRD de 2 anos de idade.



Figura 1.2. O mesmo animal da figura anterior, um mês depois.

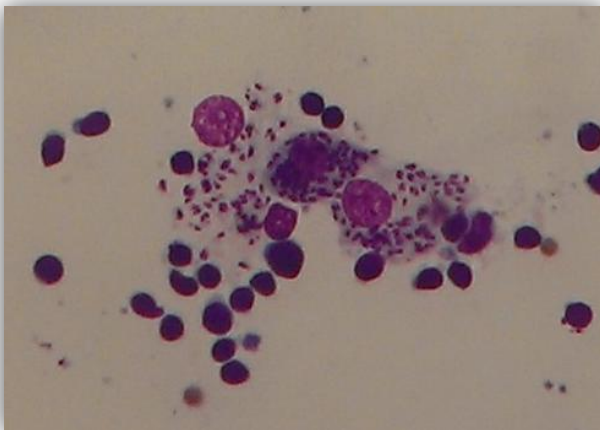


Figura 1.3. Leishmanias em macrófagos. Citologia por PAAF de gânglio linfático do animal anterior (Diff-Quick, 400x).

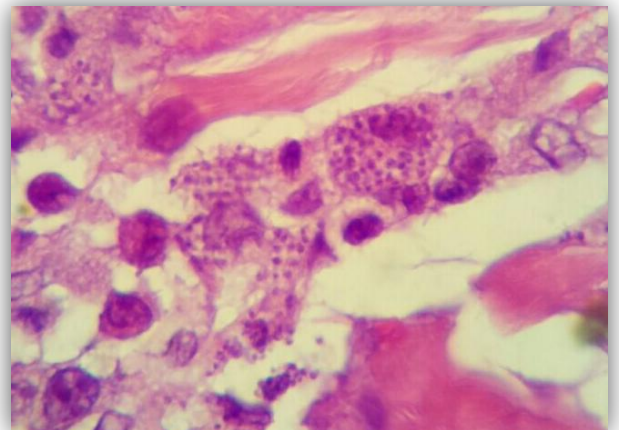
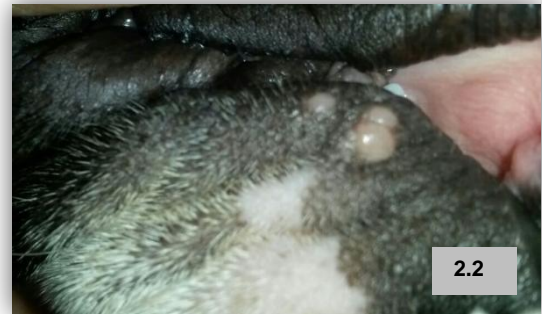


Figura 1.4. Leishmanias em corte histológico de pele da mesma cadela (HE, 400x).

## Caso Clínico 2

Elsa, canídeo Bulldog Francês, fêmea de 6 meses de idade



Figuras 2.1-2.3. Pequenos nódulos na face interna da orelha (2.1), mento (2.2) e zona mandibular (2.3), lesões nos locais de inoculação do parasita provocadas pela picada de flebótomos em Bulldog Francês de 6 meses de idade.



Figura 2.4. Leishmanias em macrófago. Citologia por PAAF de nódulo de inoculação da picada de parasitas flebótomos (Diff-Quick, 400x).

### Caso Clínico 3

Joy, canídeo SRD, macho de 3 anos de idade



Figuras 3.1-3.4. Dermatite ulcerativa provocada por Leishmania em cão SRD de 3 anos de idade. Lesão em cotovelo (3.1), carpo e metacarpo (3.1), zona patelar (3.3 e 3.4), e alopecia (3.1-3.4).

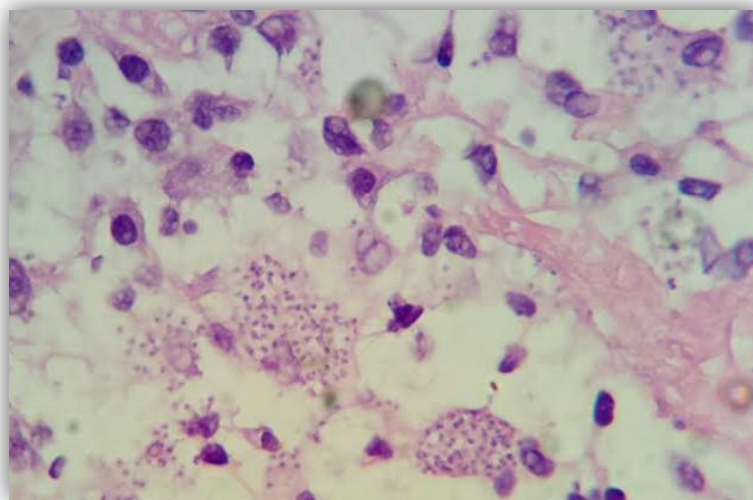


Figura 3.5. Presença de Leishmanias em corte histológico de pele do animal anterior (HE, 400x)

## Caso Clínico 4

Buster, canídeo Rottweilwer, macho de 7 anos de idade

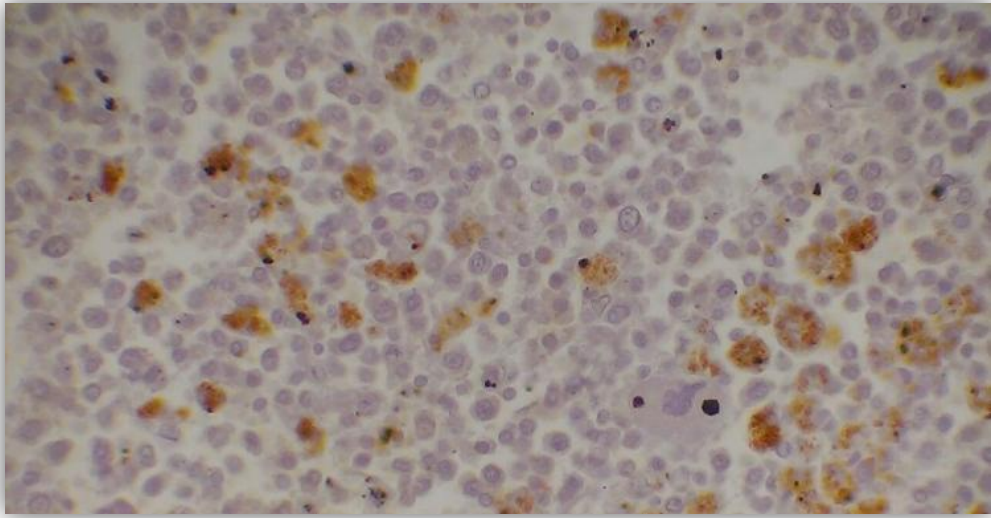
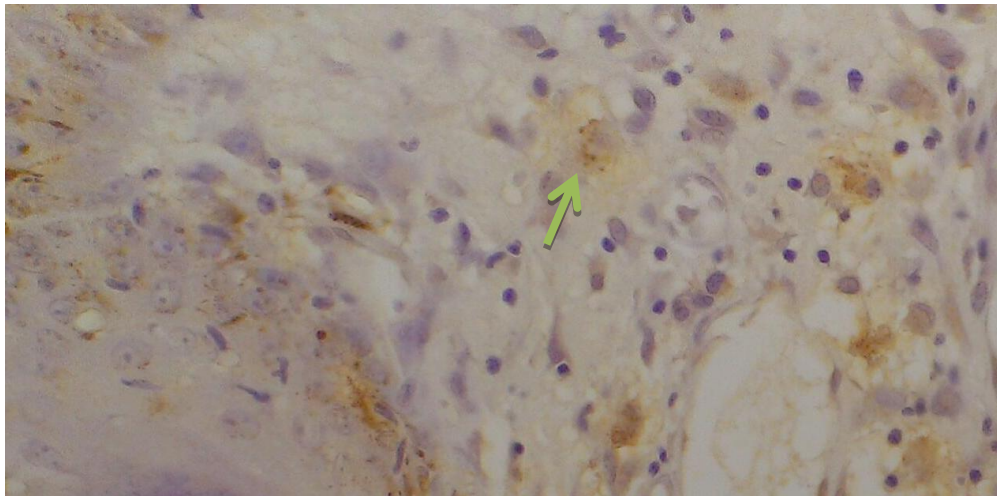


Figura 4.1. Controlo positivo de IHQ para Leishmania em tecido histológico de cão. Os amastigotas de Leishmania coram-se de amarelo intenso (400x).



Figuras 4.2 e 4.3. Leishmanias (seta) em corte histológico de pele de Rottweiler de 7 anos de idade. Coloração IHQ específica de Leishmania. Em 4.3 é visível ligeira hiperqueratose, inflamação sub-banda, dilatação dos infundíbulos foliculares, e na derme superficial discreto infiltrado inflamatório perivascular (400x, 100x).

