

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**“ASPECTOS CLÍNICOS E PARASITÁRIOS DE CÃES
INFECTADOS NATURALMENTE POR *Leishmania* spp EM
DUAS ÁREAS DE TRANSMISSÃO INTENSA COM DIFERENTES
CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS E SOCIAIS”.**

DANIELLA SILVA BARCELOS

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**“ASPECTOS CLÍNICOS E PARASITÁRIOS DE CÃES
INFECTADOS NATURALMENTE POR *Leishmania* spp EM
DUAS ÁREAS DE TRANSMISSÃO INTENSA COM DIFERENTES
CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS E SOCIAIS”.**

DANIELLA SILVA BARCELOS

Sob a orientação da Professora

Gisele Braziliano de Andrade

e Co-orientação do Professor

Dr. Heitor Miraglia Herrera

Seropédica, RJ

Março de 2009

636.7089696

B242a

T

Barcelos, Daniella Silva.

Aspectos clínicos e parasitários de cães infectados naturalmente por *Leishmania* spp em duas áreas de transmissão intensa com diferentes características ambientais e sociais / Daniella Silva Barcelos. - 2009.

89f. : il.

Orientador: Gisele Brasileiro de Andrade.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária.

Bibliografia: 49-64.

1. Cão - Parasito - Teses. 2. Leishmania - Teses. 3. Calazar - Aspectos sociais - Campo Grande(MS) - Teses. 4. Calazar - Aspectos Sociais - Conceição de Jacareí(RJ) - Teses. I. Andrade, Gisele Brasileiro de. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

Bibliotecário: _____ Data: __/__/____



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**“ASPECTOS CLÍNICOS E PARASITÁRIOS DE CÃES
INFECTADOS NATURALMENTE POR *Leishmania spp* EM DUAS
ÁREAS DE TRANSMISSÃO INTENSA COM DIFERENTES
CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS E SOCIAIS”.**

DANIELLA SILVA BARCELOS

Sob a orientação da Professora

Gisele Braziliano de Andrade

e Co-orientação do Professor

Dr. Heitor Miraglia Herrera

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária na área de concentração de Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ

Março de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DANIELLA SILVA BARCELOS

Dissertação submetida com requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, na área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____.

Gisele Braziliano de Andrade, PhD. Profa. Titular UCDB
(Orientador)

Heitor Miraglia Herrera, PhD. Pesquisador FIOCRUZ
(Co-orientador)

Ana Maria Reis Ferreira, PhD. Profa. Titular UFF
(Membro)

Adivaldo Henrique da Fonseca, PhD. Prof. Titular UFRRJ
(Presidente)

Cristiane Varella Lisboa, PhD. Pesquisadora FIOCRUZ
(Suplente)

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los.”

‘Dedico este trabalho a Deus, pela presença constante em minha vida. Obrigada Senhor!’

A minha querida Mãe, por colaborar pelo meu crescimento pessoal e profissional e por lutar pela realização dos meus sonhos.

Aos meus mestres Gisele e Heitor, por seus ensinamentos e por toda dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera, meu co-orientador, pela confiança, orientação e principalmente pelo incentivo ao desenvolvimento deste trabalho, pelo exemplo de determinação e respeito que sempre me norteou.

À minha orientadora Prof. Dra. Gisele Braziliano de Andrade, pela humildade, paciência, solicitude, conhecimento, respeito e principalmente amizade demonstrados no decorrer deste trabalho, fundamentais para o meu crescimento profissional e científico.

À Dra. Ana Maria Jansen e aos colaboradores do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, por viabilizarem a realização das análises sorológicas.

À minha querida amiga do curso de pós-graduação, Mônica Caroline, que esteve sempre disponível para auxiliar minhas culturas e sorologias.

À Prof. Dra. Rita de Cássia Campbell Machado Botteon, pela capacidade de liderar todos nós, alunos da pós-graduação, com carinho e sabedoria. Obrigada por nos entender!

Ao Prof. Dr. Argermiro Sanavria, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública - UFRRJ, pelo auxílio nas excursões ao campo e colaboração na Prefeitura Municipal de Conceição de Jacareí/RJ.

À Prof. Dra. Marilene de Faria Brito e a Prof. Ms. Laura Iglesias, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública – UFRRJ, pelo auxílio e orientação na disciplina de Anatomia Patológica dos Animais Domésticos na prática à docência.

À médica veterinária Georgea Vidal, pela amizade e companheirismo nos trabalhos de campo.

Ao médico veterinário Anselmo Silva Ramos, por disponibilizar o laboratório para a realização das análises clínicas.

Ao coordenador da Vigilância Ambiental Adalberto Pacheco e aos funcionários da FUNASA do Município de Mangaratiba, pela parceria e apoio nos trabalhos de campo.

Ao Dr. Luiz Eduardo Tavares, professor de parasitologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela realização das análises estatísticas.

À diretora do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS, médica veterinária Ms Júlia Maksoud Brazuna, por ceder os animais a Universidade Católica Dom Bosco e ao estudo.

Aos diretores do Hospital Veterinário da Universidade Católica Dom Bosco, MV. Jair Madureira e a MV. Larissa Schimidth Rosseti, por terem autorizado a execução da pesquisa nas dependências do Campus.

À Prof. Ms. Laura Raquel Rios Ribeiro, Departamento de Análises Clínicas – UCDB, pela colaboração nos trabalhos de campo e pelo laboratório cedido para análises laboratoriais.

Às alunas de graduação, da UCDB, Ana Paula Pinto e Ariane Braga pela colaboração nos trabalhos de campo e execução das análises patológicas.

Aos funcionários Isaura Alves de Lima, técnica em patologia clínica e, Thompsom Rosa de Souza, técnico em análises histopatológicas, pelo auxílio na execução dos trabalhos.

À minha querida irmã, Luciana Barcelos, pelo auxílio na formatação desta dissertação, obrigada por toda paciência!

A todos aqueles não citados nominalmente, mas cujas contribuições foram de suma relevância em meu desenvolvimento científico e pessoal, bem como na realização deste trabalho,

A todos,
minha sincera gratidão!

Daniella Silva Barcelos

BIOGRAFIA

DANIELLA SILVA BARCELOS - nascida em 23 de julho de 1982, em Vitória, ES, é Médica Veterinária formada pela Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói, em janeiro de 2007. Durante a vida acadêmica foi monitora na disciplina de Parasitologia Animal IV, durante o período de janeiro a dezembro de 2004. Desenvolveu atividades em pesquisa no programa PIBIC (Iniciação Científica), no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2006. Ingressou no Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, em janeiro de 2007. Trabalhou como médica veterinária autônomo na área de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, no período de março de 2007 a outubro de 2008. Atualmente é concursada, como Médica Veterinária, no Município de São Gabriel da Palha, como coordenadora do programa Vigilâncias em Saúde.

“O conhecimento pode pôr o homem em contato com pequenas porções de felicidade que a vida lhe oferece; e, uma vez conseguidas, já não as poderá perder, pois se houverão integrado a sua vida.”

(da Logosofia)

RESUMO

BARCELOS, Daniella Silva. “Aspectos clínicos e parasitários de cães infectados naturalmente por *Leishmania* spp. em duas áreas de transmissão intensa com diferentes características ambientais e sociais”. 2009. 91p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

A leishmaniose visceral canina é uma importante doença de saúde pública no Brasil e no mundo. O cão é considerado importante reservatório e fonte de infecção da *Leishmania infantum* para o homem por apresentar altas prevalências da infecção, presença de formas amastigotas na pele e por se fazer sempre presente nos ambientes domésticos e peridomésticos. O objetivo desse estudo foi avaliar os aspectos clínicos, parasitológicos e sorológicos da leishmaniose visceral canina em cães naturalmente infectados em duas áreas distintas de transmissão intensa. Foram realizados exames hematológicos, bioquímicos e sorológicos, assim como análise histopatológica da pele íntegra de orelha dos 41 cães provenientes de Conceição de Jacareí/RJ e 42 cães de Campo Grande/MS. Quando utilizou-se a histopatologia como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da LVC, a eficácia da detecção dos animais infectados dobrou em relação à utilização somente do teste sorológico. As principais manifestações clínicas como as lesões de pele, hipertrofia generalizada dos linfonodos e hepatoesplenomegalia foram encontradas nos cães das duas áreas estudadas. Entretanto, a intensidade e frequência de sinais clínicos observados variaram entre as duas localidades: enquanto que em Conceição de Jacareí/RJ a maioria dos animais mostrou-se assintomático, o perfil clínico dos cães estudados em Campo Grande/MS foi predominantemente polissintomático. O infiltrado inflamatório constituiu um achado histológico comum na pele dos cães infectados, estando sempre associado à presença dos parasitas. Porém, o infiltrado nos cães de Campo Grande/MS foi predominantemente moderado e intenso, com a presença de células mononucleares e neutrófilos na maioria dos cães. As severas alterações no tecido conjuntivo da derme dos animais, associadas à perda da arquitetura normal e conseqüente substituição das fibras grossas de colágeno pelas fibras finas, foram freqüentemente evidenciadas nos cães que apresentaram um intenso infiltrado inflamatório, áreas de necrose e presença abundante de formas amastigotas. As formas amastigotas foram encontradas independentemente da sintomatologia observada e da área geográfica de ocorrência. Observamos que nos animais com sintomatologia clínica que continham poucas ou nenhuma forma amastigota, o infiltrado inflamatório era constituído principalmente de linfócitos e macrófagos. Quando muitos parasitas estavam presentes, o infiltrado era adicionalmente constituído por polimorfonucleares (neutrófilos). A associação da presença de polimorfonucleares na pele íntegra de cães com características clínicas sugestivas de LVC poderia aumentar a eficácia do diagnóstico. Importante o fato de termos encontrado, tanto em Conceição de Jacareí/RJ como em Campo Grande/MS, 75% de cães assintomáticos com parasitas na pele. Deste modo a pele pode ser considerada um importante reservatório de formas amastigotas em cães assintomáticos. Em áreas endêmicas, os cães com sintomatologia clínica são aqueles logo direcionados ao exame sorológicos e conseqüentemente descartados. Assim, os cães sem sintomatologia clínica (e com parasitas na pele) constituem importantes fontes de infecção para os vetores. O mesmo raciocínio diz respeito aos animais soro-negativos, metade deles, por apresentarem as formas amastigotas, estariam atuando como importantes hospedeiros reservatórios da infecção para o homem.

Palavras-chave: LVC; Conceição de Jacareí/RJ; Campo Grande/MS.

ABSTRACT

BARCELOS, Daniella Silva. “**Clinical and parasitological aspects of dogs naturally infected by *Leishmania* spp. in two areas of intense transmission with different environmental and social aspects**”. 2009. 91p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Animal Diseases) Institute of Veterinary, Faculty of Veterinary Medicine, Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The canine visceral leishmaniasis is an important public health disease in Brazil and around the world. Dogs are considered important reservoir and source of *Leishmania infantum* infection to human due to their high prevalences of infection, the presence of amastigote forms in the skin and because they are found in the domestic and peridomestic environment. The objective of this study was to evaluate the clinic, parasitological and serological aspects of the canine leishmaniasis in dogs naturally infected in two endemic distinct areas. Hematological, biochemical and serological assays were performed, as well as the histopathologic exams of the entire ear skin of 41 dogs coming from Conceição de Jacareí/RJ and 42 dogs of the Campo Grande/MS. When histopathology was used as an auxiliary tool for diagnostic of CVL, the efficacy of detection of the infected animal double compared to the serological test only. The main clinical manifestations as skin lesions, generalized lymphadenomegaly and hepatosplenomegaly were found in dogs from the two studied areas. However, the intensity and frequency of the clinical signs varied between the two localities: while in Conceição de Jacareí/RJ the majority of animals were asymptomatic, the clinical profile of dogs from Campo Grande/MS was predominantly polysymptomatic. The inflammatory infiltrate constituted a common histological finding in the skin of infected dogs, always associated to the presence of parasites. Nevertheless, the infiltrate in dogs from Campo Grande/MS was predominantly moderate and intense with mononuclear cells and neutrophils in the majority of the dogs. The severity changes in the dermis connected tissue associated to the loss of normal architecture and consequent substitution of the thick collagen fibers by the thin fibers were frequently found in dogs with intense inflammatory infiltrate, necrosis areas and presence of abundant amastigote forms. The amastigote forms were found independently of the symptoms and the geographic area. In animals with clinical signs that harbor few or none amastigotes, the inflammatory infiltrate was mainly constituted by lymphocytes and macrophages. When many parasites were present, the infiltrate was additionally constituted by polymorphonuclears (neutrophils). The association between the presence of polymorphonuclears in intact dog skin with clinical characteristic of CVL would increase diagnostic efficacy. A significant finding was that 75% of asymptomatic dogs with skin parasites were found in both localities. In this sense, the skin may be considered an important reservoir of amastigote forms in asymptomatic dogs. In endemic areas dogs with clinical symptoms are promptly selected to serological test and consequently discarded. In this manner, dogs with no clinical symptoms (but with skin parasites) constitute an important source of infection to the vectors. The same idea may be correlated to sero-negatives animals, a half of the animals with amastigote forms would act as important reservoir hosts to human.

Key words: CVL. Conceição de Jacareí/RJ. Campo Grande/MS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Cães provenientes do Município de Conceição de Jacareí/RJ, positivos para *Leishmania* spp., com sinais e sintomas clínicos característicos da infecção:(A) úlcera em plano nasal; (B) lesão em ponta de orelha; (C) lesão em plano nasal; (D) uveíte em olho direito; (E) linfadenopatia localizada. Imagens da coleta à campo realizada em abril de 200731
- Figura 2:** Fotomicrografia de pele íntegra de cão positivo para *Leishmania* spp, Conceição de Jacareí/RJ – Abril de 2007. Infiltrado inflamatório leve e focal na derme (seta) (HE 100X original)34
- Figura 3:** Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Conceição de Jacareí/RJ – Abril de 2007. Infiltrado inflamatório moderado, focalmente extensivo com formação de granuloma (HE 200X original).....34
- Figura 4:** Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Conceição de Jacareí/RJ – Abril de 2007. Amastigotas dispersas (setas) de intensidade leve no interstício em meio à reação inflamatória mononuclear (HE 400X original)35
- Figura 5:** Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Conceição de Jacareí/RJ – Abril de 2007. Fibroplasia leve. Pequenos focos de fibras finas de colágeno na derme papilar (seta) (Picosirius 100X original).....35
- Figura 6:** Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Conceição de Jacareí/RJ – Abril de 2007. Fibroplasia moderada. Focos de fibras finas desorganizadas (seta) (Picosirius 100X original).....36
- Figura 7:** Cães proveniente do Centro de Controle de Zoonoses em Campo Grande/MS, positivos para *Leishmania* spp., apresentando sinais e sintomas clínicos característicos da infecção: (A) alopecia generalizada; (B) alopecia periocular; (C) onicogribose; (D) dermatite descamativa; (E) úlcera de pele em orelha; (F) úlcera de pele em membro. Imagens da coleta realizada em abril de 2008.....37
- Figura 8:** Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Campo Grande/MS – Abril de 2008. Reação inflamatória moderada, focalmente extensiva e área de necrose (seta) (HE 200X original).....38

- Figura 9:** Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Campo Grande/MS – Abril de 2008. Reação inflamatória intensa disposta ao redor dos folículos pilosos, vasos da derme e difusamente (HE 200X original).....39
- Figura 10:** Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Campo Grande/MS – Abril de 2008. Amastigotas de intensidade moderada e distribuição difusa (setas) (HE 200X original).....39
- Figura 11:** Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Campo Grande/MS – Abril de 2008. Distribuição intensa e difusa de formas amastigotas. Notar a presença dos parasitas no interior dos macrófagos (setas) (HE 400X original).....40
- Figura 12:** Fotomicrografias de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Campo Grande/MS. Notar áreas de necrose com fibras grossas de colágeno destruídas e algumas fibras finas de colágeno (Picrosirius 400X original).....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Relação entre a sorologia e a presença de parasitas na pele dos cães, proporção de animais soro-positivos parasitados e não parasitados e de animais soro-negativos parasitados e não parasitados.....	30
------------------	---	-----------

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação do percentual da sintomatologia clínica dos cães positivo para <i>Leishmania</i> spp Conceição de Jacareí/RJ e Campo Grande/MS.....	32
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

μm – micrômetros
A/G – relação albumina/globulina
AS – assintomáticos
CCZ – Centro de Controle de Zoonoses
cm – centímetros
CVA – canine visceral leishmaniasis
DNA – ácido desoxirribonucleico
DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA – Fundação Nacional de Saúde
H&E – hematoxilina-eosina
HIV – vírus da imunodeficiência adquirida
HOVET – hospital veterinário da UCDB
LT – leishmaniose tegumentar
LV – leishmaniose visceral
LVA – leishmaniose visceral americana
LVC – leishmaniose visceral canina
mg – miligrama
ml – mililitros
mm – milímetros
MS – Mato Grosso do Sul
MEC – matriz extracelular
NK – células natural killer
OMS – Organização Mundial de Saúde
OS – oligossintomáticos
PBS – solução tampão salina de fosfato
pH - potencial hidrogeniônico
PMN – Polimorfonucleares
PS – polissintomáticos
RIFI – reação de imunofluorescência indireta
RJ – Rio de Janeiro
rpm – rotação por minuto
SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear
TNF α – fator de necrose tumoral
UCDB – Universidade Católica Dom Bosco
UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
VG – volume globular

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1 Aspectos Epidemiológicos da LV	4
1.1.1 Agente etiológico	4
1.1.2 Agente Transmissor.....	5
1.1.3 Reservatórios	6
1.1.4 Ciclo Evolutivo e transmissão.....	6
1.1.5 Aspectos Epidemiológicos e ambientais	7
1.2 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	8
1.2.1 Aspectos clínicos da LVC.....	8
1.2.2 Epidemiologia da LVC.....	9
1.3 Aspectos hematológicos e bioquímicos dos cães infectados.....	10
1.4 Aspectos histopatológicos.....	12
1.4.1 Métodos de diagnóstico.....	13
1.4.3 Papel da matriz extracelular (MEC) do tecido conjuntivo da derme	16
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.4 Áreas de estudo.....	17
2.5 Animais.....	18
2.6 Classificação clínica dos animais	19
2.7 Obtenção das amostras de sangue dos cães.....	19
2.8 Exames hematológicos e bioquímicos	19
2.9 Inquérito sorológico censitário canino e levantamento epidemiológico	20
2.10 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	21
2.11 Coleta do fragmento de pele para exames histológicos.....	21
2.12 Processamento e análises histológicas.....	22
2.13 Caracterização do infiltrado inflamatório	22
2.14 Classificação intensidade parasitária	22
2.15 Caracterização do reparo tecidual.....	23
3 RESULTADOS.....	29
3.4 Rio de Janeiro – Conceição de Jacareí.....	29
3.5 Mato Grosso do Sul – Campo Grande	36

4	DISCUSSÃO	41
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
	ANEXOS	63
	Anexo A – Ficha clínica	64
	Anexo B – Dados clínicos dos cães de Conceição de Jacareí/RJ	1
	Anexo B – Dados clínicos dos cães de Conceição de Jacareí/RJ (continuação)	1
	Anexo B – Dados clínicos dos cães de Conceição de Jacareí/RJ (continuação)	1
	Anexo B – Dados histopatológicos dos cães de Conceição de Jacareí/RJ (continuação)	1
	Anexo C – Dados clínicos dos cães de Campo Grande/MS	1
	Anexo C – Dados clínicos dos cães de Campo Grande/MS (continuação)	1
	Anexo C – Dados clínicos dos cães de Campo Grande/MS (continuação)	1
	Anexo D – Análise estatística Conceição de Jacareí/RJ	1
	Anexo E – Análise estatística Campo Grande/MS	1

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções parasitárias que acometem animais domésticos, silvestres e o homem. São causadas por protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, incluídos na família *Trypanosomatidae* e no gênero *Leishmania*. Vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e invertebrados, são parasitas intracelulares obrigatórios que se reproduzem por divisão binária no interior das células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) de mamíferos susceptíveis, como forma flagelada ou promastigota encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota nos tecidos dos vertebrados. A transmissão do parasito ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de dípteros da família *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo).

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum*, sendo os principais vetores, os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Recentemente, *L. cruzi* foi descrita como espécie transmissora da LV no Estado do Mato Grosso do Sul. Os hospedeiros incluem grande variedade de mamíferos, inclusive o homem, sendo infecções mais comuns as que ocorrem nos mamíferos silvestres; em áreas urbanas e periurbanas, o cão é o hospedeiro de maior importância epidemiológica, pois, quando infectado, constitui o principal reservatório doméstico do parasita e tem papel fundamental na transmissão para humanos. O controle das leishmanioses ainda enfrenta grandes barreiras, não só relacionadas à disponibilidade de drogas curativas, mas, também relativa ao controle dos reservatórios, movimentação de populações, urbanização desordenada, mudanças climáticas dentre outros fatores.

A LVC, no Brasil, coexiste com a doença humana em todos os focos conhecidos sendo, porém, mais prevalente e, regra geral, precedendo à ocorrência da doença humana. Os cães infectados pela *L. infantum* apresentam um bem conhecido espectro de características clínicas que podem variar de aparente estado sadio ao severo estágio final. De modo geral, o quadro clínico se assemelha à doença humana, com febre irregular de longo curso, palidez de mucosas e um emagrecimento progressivo, até o estado de caquexia intensa, na fase terminal. A hipertrofia do SFM, levando a esplenomegalia, hepatomegalia e adenopatia generalizada, são bastante freqüentes. No entanto, os sinais mais evidentes estão relacionados às alterações cutâneas e de fâneros: perda de pêlos, podendo ser observadas no focinho, orelhas e extremidades; descamação ou dermatite furfurácea, que acompanham a depilação; alongamento das unhas (onicogrifose); opacificação da córnea (ceratite intersticial), após conjuntivite purulenta; além de outros sinais como apatia, diarreia, hemorragia intestinal,

paresia dos membros posteriores, edema e vômitos. Alterações hematológicas envolvendo eritrócitos, leucócitos e plaquetas são freqüentemente observados na doença canina

A constante modificação dos ambientes naturais e conseqüente fragmentação da paisagem original, entre outros fatores, vêm sendo responsabilizados pela emergência e re-emergência de doenças parasitárias. Como conseqüência o homem passou a ser um hospedeiro acidental de vários agentes que até então estavam restritos ao ambiente silvestre, podendo ser citado dentre eles as leishmanioses. Neste contexto, o estudo de parasitoses com enfoque na saúde animal e humana torna-se imprescindível para a elaboração de projetos em saúde pública e de vigilância epidemiológica.

O Brasil enfrenta atualmente a expansão e a urbanização da LV com casos humanos e grande número de cães positivos em várias cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos, com a ocorrência de importantes epidemias em várias cidades em todo o território nacional.

A importância do cão na epidemiologia das leishmanioses varia de região para região. Existe um consenso de que particularidades regionais associadas à ecologia da área endêmica, bem como à sub-populações de parasitos, espécies de hospedeiros e vetores, estariam influenciando o caráter infectivo dos cães de um local para outro. Assim, enquanto que em algumas áreas a retirada sistemática de cães sorologicamente positivos resulta em uma diminuição da prevalência da infecção em humanos, em outras regiões isso não acontece. A pele é o órgão que se expõe inicialmente a entrada do parasito e sua densidade parasitária tem sido associada à presença de perfil inflamatório granulomatoso em cães com LV, além de ser de grande importância na transmissão da doença, especialmente em cães assintomáticos. A diferença no quadro clínico, na quantidade de formas amastigotas e no tipo de reação inflamatória encontradas na pele íntegra dos animais infectados, sugere que o cão parasitado por *L. infantum* pode, dependendo da área geográfica em que se encontra apresentar maior ou menor importância como fonte de infecção para o vetor.

O objetivo desta dissertação foi (a) avaliar a saúde de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp através dos perfis de exames hematológicos e bioquímicos; (b) estudar o padrão da infecção utilizando-se de testes parasitológicos, sorológicos e histológicos na pele íntegra dos cães naturalmente infectados; (c) descrever o padrão inflamatório da infecção na pele íntegra dos cães amostrados; (d) caracterizar o processo de reparo tecidual conseqüente à inflamação na pele; (e) avaliar se existe uma correlação entre a clínica e/ou

sorologia com a presença de parasitas na pele íntegra em duas áreas de ocorrência da LVC, com diferentes características ambientais e sociais.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos Epidemiológicos da LV

1.1.1 Agente etiológico

A leishmaniose visceral americana (LVA), ou calazar, é uma antroponose causada por *L. infantum*, protozoário pleomórfico intracelular, com formas promastigotas (com flagelo externo) e amastigotas (não-flageladas). Pertence ao filo Mastigophora, que inclui todos os protozoários com um ou mais flagelos e reprodução assexuada por divisão binária, ordem Kinetoplastida, caracterizada pela presença de um cinetoplasto, e à família Trypanosomidae, gênero *Leishmania* spp (LAINSON & SHAW, 1987; KONTOS & KOUTINAS, 1993; RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; FEITOSA et al., 2000; CIARAMELLA & CORONA, 2003; GREENE et al., 2006).

Todas as espécies de *Leishmania* exibem um ciclo heteroxênico semelhante. Formas promastigotas desenvolvem-se no tubo digestivo de um inseto hospedeiro, flebótomo; formas amastigotas, arredondadas e sem flagelo, sendo parasitos intracelulares obrigatórios, encontram-se nas células do SFM de hospedeiros vertebrados (LAINSON & SHAW, 1987; FEITOSA et al., 2000; SÃO PAULO, 2006). O tamanho da forma promastigota varia muito; o corpo mede, em geral, 10,0 a 20,0 x 1,5 a 3,0 μm , com um flagelo frequentemente muito maior que o corpo. A forma amastigota mede de 2,5 a 1,5 x 6,8 a 4,5 μm , dependendo da espécie do parasito (LAINSON & SHAW, 1987; GREENE et al., 2006).

A LV é encontrada em quatro dos seis continentes. Na Índia e no leste da África, é causada pela *L. (Leishmania) donovani* (LAVERAN & MENSIL, 1903), sendo responsável pela forma visceral clássica (antroponose) e pela leishmaniose dérmica pós-calazar. Na China, na Ásia Central e nos países mediterrâneos da Europa e da África, é causada pela *L. (Leishmania) infantum* (NICOLLE, 1908). Nas Américas, o agente responsável pela LV em seres humanos e cães foi primeiramente identificado como *L. (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937; LAINSON & SHAW, 1987; LAINSON & SHAW, 1992; SÃO PAULO, 2006). Atualmente a comunidade científica nacional e internacional reconhece que *L. (L.) chagasi* é sinônimo de *L. (L.) infantum* (MAURÍCIO et al., 2001; AZEVEDO, 2004).

1.1.2 Agente Transmissor

A ocorrência das espécies de *Leishmania* é normalmente limitada à distribuição do vetor, que é determinada geograficamente. Os vetores pertencem à subfamília Phlebotominae, que se divide em dois gêneros principais: *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Na Europa, na Ásia e na África (Velho Mundo), os vetores das espécies causadoras das LV e LVC são do gênero *Phlebotomus* (LAINSON & SHAW, 1987; GREENE et al., 2006). Nas Américas (Novo Mundo), os vetores são do gênero *Lutzomyia* (PEARSON & QUEIROZ-SOUSA, 1996).

Certas espécies do flebotomo são encontradas em florestas, ao passo que outras endêmicas em regiões de deserto e algumas peridomiciliares, residentes em restos de lixo ou entulhos próximos às casas ou construções em áreas rurais (LAINSON & SHAW, 1987), embora também sejam encontradas em áreas urbanas, tais como Teresina (PI), Belo Horizonte (MG), Rio de Janeiro (RJ), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Corumbá (MS), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Palmas (TO), Araçatuba (SP), Bauru (SP), entre outras (WHO, 1998; BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

A *L. (Lutzomyia) longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) é o vetor da *L. (Leishmania) infantum*, enquanto outras espécies de *Lutzomyia* são vetores dos agentes das leishmanioses tegumentares americanas (MATHIAS, 2004; SANTOS, 2006). Diversamente, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (cidades de Corumbá e Ladário), parece que a transmissão também está a cargo da *L. cruzi* (SANTOS et al., 1998; ALVAR et al., 2004; MAROLI & KHOURY, 2004; SÃO PAULO, 2006).

Os flebotomíneos adultos, cuja capacidade de vôo é de cerca de trezentos metros, têm hábitos alimentares crepusculares e/ou noturnos: raramente são encontrados durante o dia, devido à luminosidade. As formas aladas abrigam-se nos mesmos locais dos criadouros e em anexos peridomiciliares, principalmente em abrigos de animais domésticos. Somente as fêmeas são hematófagas obrigatórias, pois necessitam do sangue para o desenvolvimento dos ovos. Alimentam-se de ampla variedade de animais vertebrados de sangue quente, entretanto têm predileção por aves, geralmente, galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*), que não mantêm a infecção por *Leishmania* spp. Por isso, elas não são consideradas fontes de infecção, mas somente elementos importantes para a manutenção do vetor no meio ambiente. Vale à pena ressaltar que a presença de animais domésticos e silvestres em áreas peridomiciliares provavelmente atrai um grande número de espécies de flebotomíneos, contribuindo, assim, para a agregação das espécies de vetores nas áreas rurais e peridomiciliares (ALEXANDER et al., 2002; COUTINHO, 2005; BRASIL, 2006; SANTOS,

2006; SÃO PAULO, 2006). Coutinho et al. (2004) sugerem a capacidade vetorial do *Rhipicephalus sanguineus* para *L. infantum*, abrindo, assim, novas perspectivas da epidemiologia da LV.

1.1.3 Reservatórios

Os reservatórios do parasito incluem grande variedade de animais mamíferos. As infecções mais comuns ocorrem nos mamíferos silvestres, como cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), raposas (*Dusicyon vetulus*), gambás (*Didelphis albiventris*), roedores, edentados (tamanduá, bicho-preguiça e tatu), procionídeos (mão-pelada e quati), suínos e primatas (inclusive o homem) e, ainda, animais domésticos como cães (*Canis familiaris*) e eqüinos (*Equus caballus*) (LAINSON & SHAW, 1987; BRASIL, 2006; SILVA, 2006). Vários estudos indicam que a metade dos cães com anticorpos anti-*Leishmania* não apresenta sinal algum de doença (assintomáticos), embora infecções subclínicas e/ou assintomáticas sejam potencialmente transmissíveis aos flebotomíneos (FEITOSA et al., 2000; ALVAR et al., 2004; GRAVINO, 2004; ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2006; GREENE et al., 2006; SÃO PAULO, 2006).

1.1.4 Ciclo Evolutivo e transmissão

O ciclo biológico da *L. infantum* é do tipo heteroxênico e inicia-se com o repasto do flebotomo infectado (fêmeas de *L. longipalpis* ou *L. cruzi*) com a forma promastigota metacíclica (infectante). As formas infectantes são liberadas na epiderme e fagocitadas por células do SFM. No interior dos macrófagos, elas diferenciam-se em formas amastigotas (aflageladas), que são ovais ou redondas, possuindo geralmente um cinetoplasto visível, as quais se multiplicam intensamente por divisão binária. Os macrófagos, repletos de formas amastigotas, ficam desvitalizados e rompem-se, liberando estas formas, que, em um processo contínuo, serão novamente fagocitadas por tecidos ricos em células do SFM, como fígado, rins, baço, linfonodos, pele, entre outros. Os vetores ingerem as formas amastigotas quando sugam o sangue com macrófagos parasitados de um hospedeiro vertebrado infectado. Os macrófagos parasitados, após passagem pelo intestino anterior, rompem-se no intestino médio abdominal, liberando ali as formas amastigotas. Tais formas sofrem nova divisão binária no

tubo digestivo do inseto e diferenciam-se para formas promastigotas (flageladas). Estas, por sua vez, sofrem por divisão binária, multiplicação e diferenciação em formas paramastigotas, que são formas flageladas fixas encontradas no intestino médio torácico (estomodeo) do vetor. As formas paramastigotas possuem o núcleo adjacente ao cinetoplasto, portanto, não são consideradas promastigotas. Em seguida, diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. O ciclo do parasita no inseto ocorre em torno de 72 horas (CASTRO, 1996; BRASIL, 2006; GREENE et al., 2006; SANTOS, 2006; SÃO PAULO, 2006). Os sinais clínicos podem apresentar-se de três meses a sete anos depois da infecção (LINDSAY, 2004).

Em humanos, há relato de transmissão por via congênita ou por transfusão de sangue contaminado (PEARSON & SOUSA, 1996). Na região do Mediterrâneo, principalmente na Espanha, na França, na Itália e em Portugal, um ciclo antroponótico da LV foi observado em pacientes com infecção pelo HIV, usuários de drogas endovenosas (MATHIAS, 2004).

1.1.5 Aspectos Epidemiológicos e ambientais

A média de casos de LV verificados em humanos é de 3.400/ano (2003-2004), com incidência de 2/100.000 habitantes e letalidade de 5,3%. A faixa etária mais predisponente é a de indivíduos com menos de 10 anos de idade (58% dos casos). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), há 2 milhões de novos casos a cada ano e 10% da população do mundo corre risco de infecção. Cães infectados constituem o principal reservatório domiciliar do parasita e têm papel fundamental na transmissão para humanos, que são considerados hospedeiros acidentais (ALVAR et al., 2004; GRAVINO, 2004; MATHIAS, 2004; ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006). No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciada, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Na década de 1990, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV em humanos ocorreram na região Nordeste. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões e atingiu áreas urbanas e periurbanas, esta situação modificou-se e, no período de 2000 a 2002, a região Nordeste já apresentava uma redução para 77% dos casos do país.

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís

(MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, mais recentemente, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

A LV é conhecida comumente como doença própria de área de clima seco com precipitação pluviométrica anual inferior a 800 mm, e de ambiente fisiográfico composto por vales e montanhas, onde se encontram os chamados “boqueirões” e “pés-de-serra”. O ambiente característico e propício à ocorrência da LV é aquele de baixo nível socioeconômico, pobreza, promiscuidade, prevalente em grande medida no meio rural e na periferia das grandes cidades. Estas características vêm-se modificando, principalmente, nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste, onde a LV se encontra urbanizada (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006). As transformações no ambiente, provocadas pelo intenso processo migratório, por pressões econômicas ou sociais, a pauperização conseqüente de distorções na distribuição de renda, o processo de urbanização crescente, o esvaziamento rural e as secas periódicas acarretam a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos. Este fenômeno leva à redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de epidemias.

1.2 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

1.2.1 Aspectos clínicos da LVC

Há muitos anos Laveran (1917) já distinguia duas formas na evolução do calazar canino: uma forma aguda, levando o animal a óbito em poucos meses e outra forma latente, com duração aproximada de 2 anos, podendo evoluir para a cura clínica. Lanotte et al. (1979) realizando estudos imunoclínicos em cães de uma área endêmica na França para *L. infantum*, também observaram que a doença se manifestava de duas formas: a primeira (patente) que se caracterizava por animais com sintomatologia víscero - cutânea e alta taxa de anticorpos. A segunda forma (latente), quando os animais não apresentavam sintomas e a taxa de anticorpos era baixa. Este último tipo de manifestação ainda poderia apresentar dois desfechos distintos: a conversão do perfil assintomático em doença ou a evolução para a cura espontânea. A forma patente manifesta-se através de uma clínica bastante semelhante à humana, com febre irregular, anemia e emagrecimento progressivo chegando, na fase terminal, a uma caquexia

intensa. Os sinais mais evidentes estão relacionados com o emagrecimento e as alterações cutâneas e de fâneros: alopecia focal ou generalizada, pequenas lesões crostosas, isoladas ou concêntricas, descamação e dermatite furfurácea que acompanham a depilação, alongamento das unhas (onicogrifose) e, eventualmente, ceratite intersticial após episódios de conjuntivite (ALENCAR, 1959; LANOTTE et al.,1979, MARZOCHI et al.,1985). Segundo Hommel (1978) a alopecia é explicada pela ação do parasita no folículo piloso ou devido a um distúrbio do metabolismo do ácido pantotênico, decorrente da lesão hepática, ou ainda, pela deposição dos imunocomplexos existentes na membrana basal da pele, induzindo um processo auto-imune desencadeador da alopecia. O alongamento das unhas costuma ser explicado pelo estímulo do parasita na matriz ungueal (LETOSQUARD & DONATIEN, 1938). Entretanto, o estado de apatia em que o animal permanece durante a doença dificulta o desgaste natural das unhas (MARZOCHI et al.,1985). A hepatoesplenomegalia e a adenopatia generalizada são conseqüentes do acometimento do SFM (MARZOCHI et al., 1985). De acordo com Adler (1964), o emagrecimento é atribuído ao desequilíbrio proteico que levaria a uma intensa albuminúria. Catarsini (1981), no entanto, explica este fenômeno pelo comprometimento da mucosa digestiva. A explicação para os outros sinais clínicos é menos conclusiva (HOMMEL, 1978).

1.2.2 Epidemiologia da LVC

O cão é considerado o mais importante reservatório do parasita no ambiente doméstico e peridoméstico. As espécies de canídeos selvagens foram descritas por Deane & Deane (1954) e Lainson e colaboradores (1990) como importantes reservatórios e fonte de infecção para o cão doméstico devido à estreita relação entre o ecótopo silvestre e o peridomicílio. Uma vez estabelecido que o cão seja a principal fonte de infecção para o homem e agente de dispersão da doença, a OMS preconiza seu sacrifício em áreas endêmicas, desde que neste encontre-se parasito ou que seja sorologicamente positivo (WHO, 1996). A correlação entre a condição clínica do cão e sua infectividade vem sendo estudada há algum tempo. Deane & Deane (1955), no Ceará, encontraram dentre os cães assintomáticos, somente 8% portadores de formas amastigotas na pele. Vexenat et al. (1994) no Piauí, utilizando a prova Lmet DNA, encontraram mais de 30% dos cães assintomáticos com o parasita na pele. Este fato demonstra que, com o advento de testes mais sensíveis a importância do cão como reservatório doméstico vem sendo reforçada.

Pinelli et al. (1994), estudando um grupo de cães da raça beagle infectados com *L. infantum* também observaram duas formas de reação: i) os animais que se mantiveram assintomáticos e ii) os animais que apresentaram manifestações clínicas da LV. Para cada caso foram observadas respostas celulares e humorais bastante distintas. No caso dos cães que permaneceram assintomáticos (considerados animais resistentes), uma forte resposta linfocitária proliferativa aos antígenos leishmaniais, sugeriam que, como no homem e no rato, a resposta é mediada por células T. No segundo caso (considerados animais suscetíveis), não houve proliferação de linfócitos *in vitro*, fato que também coincide com o homem e o rato (HALDAR, 1983). Pinelli et al. (1994) mostram ainda que, os cães resistentes produzem baixos títulos (igual ou menor que 1:80) pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) enquanto os suscetíveis apresentam títulos elevados (1:320 ou mais). Estudos ainda colocam em discussão a retirada dos cães no controle da doença (EVANS et al., 1992; D'OLIVEIRA JR. et al. 1997). Dietze et al. (1997), estudaram o impacto da retirada dos cães no Espírito Santo sobre a transmissão da LVA. Num estudo prospectivo de intervenção, foram escolhidas três cidades separadas através de barreira geográfica (montanhas), todas endêmicas para LVA. Em duas delas, após inquérito sorológico, promoveram a retirada de todos os cães soro reagente. Na cidade controle, mantiveram-se todos os cães. Durante 12 meses as taxas de soropositividade humanas foram medidas pelo teste Dot-Elisa e aumentaram de 14% para 54% na cidade controle e de 15% para 54% nas cidades sob intervenção. Paranhos Silva et al. (1998), estudando o efeito da migração de cães sobre a incidência da LVA no estado da Bahia, demonstraram que apesar de terem sido eliminados todos os cães soropositivos da área de estudo, o número de notificações da doença em humanos nos anos seguintes foi 5, 25, 123 e 142. Estes estudos vêm demonstrando, que o critério de eliminação do cão necessita ser reavaliado.

1.3 Aspectos hematológicos e bioquímicos dos cães infectados

Embora os dados de hematologia, bioquímica sérica e urinálise demonstrem limitado valor para o diagnóstico da LVC, estes parâmetros fornecem importantes subsídios para avaliação do estado clínico do animal e prognóstico da evolução da doença (COSTA VAL, 2004). A anemia é um achado freqüente na doença canina, sendo reportada em cerca de 50% a 70% dos pacientes, tendo como características marcantes a normocitose, normocromia e arregeneração (BANETH, 2006; XAVIER, 2006). As principais causas desta alteração no

hemograma seriam: perda sanguínea pela epistaxe e ulcerações da pele, eritrólise, inflamação generalizada e insuficiência renal crônica, hipoplasia ou aplasia medulares (KOUTINAS et al., 1999; DE LUNA et al., 2000; COSTA VAL, 2004). Por outro lado, outros autores consideram a anemia como um achado pouco freqüente (AMUSATEGUI et al., 2003; ALVAR et al., 2004).

As contagens total e diferencial de leucócitos não obedecem qualquer padrão em cães portadores de LVC: alguns animais apresentam leucocitose com desvio a esquerda regenerativo enquanto outros apresentam leucopenia (geralmente por neutropenia), ou mesmo perfil leucocitário normal (AMUSATEGUI et al., 2003; COSTA VAL, 2004).

Segundo Amusatogui e colaboradores (2003), a trombocitopenia ocorre entre 29% a 50%. Esta alteração, entretanto, pode ou não estar associada a alterações no perfil hemostático do paciente (AMUSATEGUI et al., 2003; COSTA VAL, 2004; XAVIER, 2006).

As alterações na atividade funcionais dos rins representadas pelo aumento das concentrações séricas de uréia e creatinina é um achado relativamente comum em cães portadores de LVC. Cerca de 45% destes animais apresentam azotemia (AMUSATEGUI et al., 2003). A proteinúria glomerular não seletiva é encontrada na maioria dos cães portadores de LV (BONFANTI & ZATELLI, 2004). Uma característica marcante da LVC é a disproteinemia sérica, caracterizada, por hipergamaglobulinemia que ocorre na maioria dos cães com LV, podendo alcançar 100% dos animais infectados (FERRER, 1999; AMUSATEGUI et al., 2003; ALVAR et al., 2004; BONFANTI & ZATELLI, 2004;).

A composição do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas dos cães doentes sofre alterações, principalmente quanto à relação albumina e globulinas séricas (A/G). O aumento da concentração no plasma das frações β e γ seria responsável pelo aumento geral das gamaglobulinas; enquanto que a diminuição da albumina seria devido a perdas por nefropatias, doenças hepáticas, subnutrição crônica ou até mesmo a combinação destes fatores (AMUSATEGUI et al., 2003; BONFANTI & ZATELLI, 2004).

Aumentos na atividade das enzimas hepáticas, bem como aumento nos teores de bilirrubinas, não ocorrem com freqüência nos cães portadores de LV (AMUSATEGUI et al., 2003).

Em relação à urinálise, a proteinúria é a alteração mais freqüentemente descrita, variando de cerca de 70% a 100% dos animais portadores de LV, seja em graus discretos ou até mesmo graves. Em alguns animais, a proteinúria pode ser tão grave que chega a

determinar alterações nos valores de proteínas séricas normais (AMUSATEGUI et al., 2003; BONFANTI & ZATELLI, 2004; COSTA VAL, 2004).

1.4 Aspectos histopatológicos

Os animais infectados por leishmaniose apresentam microscopicamente na epiderme uma hiperqueratose ortoceratótica que pode estar associada à hiperplasia e hiperpigmentação. Na derme, o infiltrado inflamatório predominante é mononuclear, podendo haver neutrófilos e eosinófilos, comprometendo, principalmente, a derme superficial, podendo estender-se para a derme profunda e até mesmo à hipoderme. Lesões cutâneas nodulares, ulceradas ou não, são denominadas cancro de inoculação ou leishmanioma, estes nódulos são constituídos por múltiplos agregados de macrófagos, linfócitos, plasmócitos, células epitelióides, onde nem sempre o parasito está evidente, porém pode ser detectado no interior de fibroblastos da derme e hipoderme (LUVIZOTTO, 2006).

Uma variedade de tecidos e órgãos também podem apresentar-se afetados na LV, ocorrendo principalmente, hipertrofias e hiperplasias das células do SFM em todos os órgãos (COUTINHO, 2005). No fígado observa-se reação linfohistioplasmocitária periportal, podendo estar associado a um infiltrado de polimorfonucleares e à fibroplasia. Há hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer que, assim como os macrófagos do infiltrado portal, possuem formas amastigotas do parasito no citoplasma (LUVIZOTTO, 2006). No baço ocorre diminuição das células da bainha periarteriolar com proliferação de macrófagos parasitados. Ocorre também a hiperplasia da polpa vermelha e da polpa branca, com reatividade das células endoteliais associadas à fibroplasia da parede vascular (LIMA, 2007).

Os linfonodos apresentam hipertrofia e hiperplasia dos folículos linfóides, há também a formação de agregados de macrófagos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas, constituindo arranjos nodulares principalmente nos quadros crônicos (LUVIZOTTO, 2006).

Luvizotto (2006) e Lima (2007) afirmam que nos pulmões ocorre pneumonia intersticial crônica, com formações granulomatosas, fibrose intersticial e raramente macrófagos parasitados. Na medula óssea apresenta uma hiperplasia da série leucocitária, às vezes associada à eritrocitária, durante a fase ativa da doença. Por outro lado, na fase final ocorre hipocelularidade das células da linhagem eritrocitária e leucocitária, podendo ou não haver parasitos.

No rim a lesão mais freqüente é a glomerulonefrite causada pela deposição de imunocomplexos, já no interstício predomina uma reação inflamatória caracterizada por infiltrado linfoplasmocitário, podendo haver macrófagos albergando amastigotas. Ainda, pode-se observar degeneração tubular, necrose, inflamação e fibrose intersticial. Já o envolvimento do trato gastrointestinal é demonstrado através da hiperplasia linfóide das placas de Peyer, associada ou não ao parasitismo. Tais lesões são observadas como reação inflamatória linfohistioplasmocitária severa, comprometendo mucosa, submucosa e muscular da mucosa (LUVIZOTTO, 2006; LIMA, 2007)

1.4.1 Métodos de diagnóstico

Os métodos empregados para o diagnóstico de LVC incluem testes indiretos como a demonstração de anticorpos específicos anti-*Leishmania* em soros de animais pelas técnicas de RIFI, Fixação do Complemento e Ensaio Imunoenzimático. O diagnóstico parasitológico através da detecção microscópica do parasita na medula óssea, aspirados de linfonodos corados com Giemsa e preparações histopatológicas rotineiramente preparadas com Hematoxilina-Eosina auxiliam o diagnóstico. Entretanto, apenas o isolamento do parasita por meio de cultura *in vitro* ou inoculação em hamster são provas conclusivas. A direta detecção de parasitas em biópsias de pele em cães com LV pode ser obtida através de um simples procedimento cirúrgico, sendo esta uma boa ferramenta para um diagnóstico seguro e definitivo acompanhados pelo estado clínico do animal (FERRER et al., 1988; WHO, 1990; BOUDOISEAU et al., 1997; TAFURI, 2001).

1.4.2 A pele e as células envolvidas na resposta inflamatória

Estudos mostram que a pele exerce um importante papel no sistema imune, funcionando como uma potente barreira e secretando substâncias biologicamente ativas que protegem o organismo da ação de agentes agressores (BOSS & KAPSENBERG, 1986). É composta pela epiderme, uma camada de tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado e pela derme, a camada de tecido conjuntivo denso não modelado (GARTNER & HIATT, 1999), que por sua vez é constituído por uma variedade de células e uma matriz extracelular, complexo de macromoléculas, produzidas por fibroblastos e exportadas por eles para o espaço intercelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Os macrófagos são células, cujo papel mais marcante é uma rápida captura e internalização de partículas (SILVA, 2003). Estas células são especializadas no combate a agentes infecciosos como as espécies de *Leishmania*, por exemplo, (BRASIL, 2006).

Em casos de lesões por leishmaniose, os macrófagos imaturos exercem o papel de célula hospedeira, enquanto os macrófagos ativados são capazes de controlar a infecção (SILVA, 2003).

As espécies *Leishmania* desenvolveram mecanismos de defesa capazes de subverter a capacidade microbicida dos macrófagos, conseguindo sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico e multiplicar-se até a ruptura da célula, quando então são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção. Este processo leva à liberação de partículas antigênicas que serão apresentadas ao sistema imune, gerando a resposta específica (BRASIL, 2006).

Os neutrófilos são, geralmente, as primeiras células a migrarem para o local onde ocorre um processo inflamatório. Sua migração é mediada por citocinas (SILVA, 2003) produzidas por células epiteliais, endoteliais, queratinócitos e fibroblastos (CASTELLANO, 2005).

O papel dos neutrófilos é o de destruir parasitas invasores, utilizando-se de mecanismos de fagocitose e posterior destruição do conteúdo fagocitado através da ação de enzimas proteolíticas e de substâncias reativas do oxigênio (CASTELLANO, 2005).

Na leishmaniose os neutrófilos participam da fase inicial da infecção, controlando o crescimento parasitário em vísceras, mas o parasita pode estabelecer a infecção evitando a formação de uma resposta imune eficiente, através da diminuição da produção de uma quimiocina, a IP-10, que é produzida pelos neutrófilos (SILVA, 2003).

Castellano (2005) afirma que a *Leishmania*, além de influenciar a função dos neutrófilos, também pode aumentar o tempo de vida dos PMN (polimorfonucleares) ao inibir a via de ativação de apoptose. Recrutando assim mais macrófagos para a região, estes ao reconhecer os PMN infectados em apoptose e iniciam o processo de fagocitose destas células. A fagocitose de corpos apoptóticos, faz com que os macrófagos tenham suas funções microbicidas silenciadas, representando uma importante via de evasão da resposta imune e conseqüente estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp.

Os eosinófilos são células produzidas na medula óssea, que exercem papel importante nas reações de hipersensibilidade imediata e no controle de infecções por protozoários e helmintos (SILVA, 2003).

Nos processos causados por *Leishmania* spp observa-se uma associação entre os eosinófilos e os macrófagos, sugerindo que exista uma ação conjunta entre essas duas células para a destruição do parasita (SILVA, 2003).

Os linfócitos estão associados à resposta imunológica do hospedeiro. Podem ser agrupados em três categorias, sendo elas: Linfócitos T (imunidade celular); Linfócitos B (imunidade humoral) e, as células NK (*natural killer*) envolvidas nos fenômenos da imunidade natural e que são citotóxicas, independente da estimulação antigênica (SILVA, 2003).

As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno que se originam na medula óssea. Exercem importante papel na resposta imunológica primária (SILVA, 2003).

São mais relevantes na apresentação de antígenos nas respostas primárias. Durante a infecção por *Leishmania* spp, as células dendríticas da epiderme, foram encontradas infectadas com formas amastigotas (BRANDONISIO; SPINELLI & PEPE, 2004; CASTELLANO, 2005).

Estas células quando infectadas são ativadas fazendo com que, não fiquem aderidas ao tecido epidérmico e migrem para os linfonodos regionais, a fim de realizar a apresentação dos antígenos de *Leishmania* às células efetoras do sistema imune (CASTELLANO, 2005).

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo de formato oval ou alongado, que apresentam o citoplasma repleto de grânulos metacromáticos (SILVA, 2003), onde se estocam muitos produtos pré-formados como, a histamina, heparina, triptase, quimase, carboxipeptidase, fator quimiotático de neutrófilos e fator quimiotático eosinofílico de anafilaxia (CORRÊA, 2002).

Estudos recentes sugerem que os mastócitos podem ser infectados por *Leishmania* e durante a infecção liberam grande quantidade de TNF α , uma citocina quimiotática para neutrófilos, o que contribui para uma resposta inflamatória mais acentuada (SILVA, 2003).

Em hospedeiros susceptíveis os mastócitos desempenham papel favorável ao estabelecimento da infecção, enquanto que em hospedeiros resistentes, a ação destas células seja anti-parasitária (CASTELLANO, 2005).

1.4.3 Papel da matriz extracelular (MEC) do tecido conjuntivo da derme

A matriz extracelular é um complexo estrutural que cerca e apóia as células encontradas nos tecidos. É composto por três grupos de proteínas, sistema colágeno, elástico e proteoglicanas. Na derme predomina o colágeno tipo I formado por fibras grossas, entremeado a outras proteínas da matriz e células (MONTES, 1996).

Estudos relatam a participação direta da matriz extracelular nos eventos iniciais da leishmaniose humana cutânea por *L. braziliensis* (ESTERRE et al., 1992); e também na pele de cães naturalmente infectados, onde foram detectadas alterações da MEC, especialmente do colágeno tipo I.(MELO, 2005). Isto se deve ao fato de que os parasitos produzem proteases que degradam proteínas da matriz facilitando a penetração na barreira dérmica e difusão da infecção. Quando as formas promastigotas da *Leishmania* são inoculadas na pele do hospedeiro, ocorre um afrouxamento ou desprendimento da matriz do tecido conjuntivo da derme, permitindo então o estabelecimento da infecção (LIRA et al., 1997).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.4 Áreas de estudo

As regiões de escolha para o estudo foram duas áreas distintas de transmissão intensa de LV: Conceição de Jacareí, Rio de Janeiro, onde os casos humanos de LV foram notificados entre os anos de 1998 a 2000 (PACHECO, comunicação pessoal) e Campo Grande, situado no estado do Mato Grosso do Sul, onde os casos de LV atualmente constituem um sério problema de saúde pública.

Na região da Costa Verde do Rio de Janeiro, em especial a cidade de Conceição de Jacareí, município de Mangaratiba, é considerada uma área endêmica de LV, com base nos fatos que existem notificações de calazar em humanos e em cães. Conceição de Jacareí faz parte do 2º Distrito do Município de Mangaratiba/RJ, limitando o município com o de Angra dos Reis. Encontra-se dividida entre duas unidades geomorfológicas: a Serra do Mar – caracterizada pelos maciços de rochas cristalinas e metamórficas; e baixadas litorâneas – constituídas por planícies sedimentares. Em 1970 contava com aproximadamente 30 casas, habitadas principalmente por pescadores da região. A facilidade de acesso contribuiu para inúmeros investimentos e ações especuladoras que, com diversas atividades ligadas ao turismo, induziu o processo de ocupação desordenada da área, contribuindo em muitos casos para a degradação e fragmentação do meio-ambiente. Apesar dos esforços empreendidos, há ainda nessa área uma soro-prevalência alta de cães infectados e notificação de casos humanos.

No Estado de Mato Grosso do Sul a doença está em franca expansão, sendo relatada desde a década de 80, inicialmente nas cidades de Corumbá e Ladário, recentemente disseminada por todo o Estado (NUNES & GALATI et al., 2000; SILVA, ANDREOTTI & HONER, 2007), que nos últimos anos, tem sofrido grandes modificações ambientais que devem ter contribuído para a disseminação do vetor, entre elas estão a construção de um gasoduto e a destruição de áreas do cerrado (SILVA, ANDREOTTI & HONER, 2007).

Em Campo Grande, a LV, foi descrita pela primeira vez em caninos no ano de 1998 e, os casos humanos em 2002, a partir de então passou a ser considerada uma doença emergente constituindo, atualmente, a principal doença de origem parasitária na saúde pública municipal. Este fato pode estar associado a alguns remanescentes florestais na área urbana, bem como a abertura de avenidas acompanhando os cursos das águas e a derrubada da vegetação para construção de loteamentos nas áreas periurbanas, mudança ambientais

que favoreceram a instalação do vetor. (SILVA, ANDREOTTI & HONER, 2007). O município de Campo Grande, com uma área de 8 mil quilômetros quadrados, está localizado na porção central do Estado de Mato Grosso do Sul, localizado predominantemente na bacia hidrográfica do Rio Paraná, com exceção de uma pequena porção noroeste de seu território, que se situa na bacia hidrográfica do Rio Paraguai. O município de Campo Grande pertence ao domínio da região fitogeográfica do Cerrado. A cobertura vegetal original apresenta-se com fisionomias de Campo Limpo, Campo Sujo, Cerrado, Cerradão, Mata Ciliar, Veredas e Áreas de Tensão Ecológica, representadas pelo contato Cerrado/Floresta Mesófitas Semidecídua e área de formações antrópicas. Até a década de 50, Campo Grande cresceu ordenadamente, sendo possível inscrever círculos concêntricos de desenvolvimento. A partir da década de 60, foram aprovados grandes loteamentos, muito afastados do centro, alguns totalmente descolados da malha urbana, provocando uma ruralização de áreas periurbanas. A cidade conheceu uma explosão em seu crescimento após 1979, quando foi elevada à categoria de Capital do recém-criado Estado de Mato Grosso do Sul em 1977. Atualmente a população urbana é de 724 mil habitantes com uma densidade de 90,5 habitantes/km² (IBGE, 2007; SILVA, ANDREOTTI & HONER, 2007).

2.5 Animais

Os animais utilizados nesta pesquisa foram cães domiciliados (*Canis familiaris*) naturalmente infectados com *Leishmania* spp portadores de diferentes formas clínicas da leishmaniose. Os cães procedentes de Conceição de Jacaré/RJ foram coletados a partir de um raio de 100 m dos casos humanos notificados da região (FUNASA, 1999). Dos 70 animais coletados nesta região, apenas em 41 animais foi possível a realização de biópsias de pele, devido a não autorização dos proprietários. Na cidade de Campo Grande/MS, utilizaram-se os animais recebidos e/ou recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), totalizando 42 cães.

Durante as coletas dos materiais biológicos os animais foram avaliados quanto aos sinais e sintomas clínicos, os dados registrados em uma ficha clínica pré-confeccionada. Sinais clínicos e sintomas como: alterações dermatológicas, oftalmológicas, linfadenopatias e alguns aspectos epidemiológicos (**Anexo A**).

As análises histológicas das duas áreas foram realizadas em conjunto com o laboratório de Anatomia Patológica e Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UCDB

(Universidade Católica Dom Bosco), em Campo Grande/MS; os testes sorológicos foram realizados no laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos do Pavilhão Carlos Chagas – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

O projeto foi aprovado durante a avaliação de qualificação, pela coordenação de Pós-Graduação, ocorrida no mês de Novembro de 2007, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

2.6 Classificação clínica dos animais

Os cães selecionados nesta pesquisa foram classificados clinicamente de acordo com ausência (assintomáticos) ou presença de sintomas característicos da infecção como oligossintomáticos e polissintomáticos conforme a descrição de Manciante e colaboradores (1988). Consideraram-se cães polissintomáticos (PS) os animais que exibiam em conjunto os seguintes sinais clínicos: alterações cutâneas (alopecia, dermatites esfoliativas ou úlceras), onicogribose, ceratoconjuntivite e caquexia. Caracterizaram-se os animais como oligossintomáticos (OS) aqueles que ao exame clínico observou-se: linfadenopatia, moderada perda de peso e/ou alopecia acompanhada de lesões cutâneas. Os demais animais com ausência de sinais clínicos característicos da infecção por *Leishmania* spp foram classificados como cães assintomáticos (AS).

2.7 Obtenção das amostras de sangue dos cães

Foram colhidos, de todos os animais, cinco ml de sangue, divididos em dois frascos: 2 ml em frasco com anticoagulante EDTA e, 3 ml em frasco sem anticoagulante, em seringas descartáveis de 10 ml, através de venopunção da veia radial ou jugular externa. O sangue sem anticoagulante foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos para obtenção das amostras do soro, logo em seguida foram feitas alíquotas do soro, congelamento e armazenamento a 20°C até o momento de uso no teste sorológico.

2.8 Exames hematológicos e bioquímicos

Os exames hematológicos realizados foram: a determinação do volume globular (VG), pelo método do microhematócrito; concentração de hemoglobina, através do cianeto

de potássio 500 mg/dl (Padrão de hemoglobina – Labtest Diagnóstica S.A., MG/kit LABTEST®); hematimetria e leucometria globais avaliados por método manual, nos quais utilizou-se a câmara de Neubauer (COLES, 1986), e leucometria específica em esfregaços sanguíneos corados pelos métodos de Panótico Rápido®.

Na avaliação bioquímica sérica, foram determinados os níveis de proteínas totais pelo método do "biureto", albuminas pelo "verde de bromocresol", seguindo-se, em ambos os casos, as indicações do fabricante (Labtest® Diagnóstica). As dosagens bioquímicas foram realizadas mediante espectrofotometria utilizando-se os *Kits* analíticos "Lab-test" (Labtest Diagnóstica S.A.).

Todos os exames foram realizados com as amostras em duplicatas, utilizando-se as médias dos resultados.

2.9 Inquérito sorológico censitário canino e levantamento epidemiológico

As coletas e obtenção das amostras de sangue foram realizadas distintamente nas duas áreas de estudo: (a) Conceição de Jacareí/RJ – com o auxílio da equipe de agentes da Divisão da Vigilância Ambiental em Saúde do Município, no período de Março a Agosto de 2007; (b) Campo Grande/MS - as coletas foram realizadas no Centro de Controle de Zoonoses durante a eutanásia dos animais recolhidos, no período de Abril de 2008.

Previamente às coletas de sangue, os animais foram submetidos à inspeção física, as informações foram anotadas em fichas de identificação, que continham dados do proprietário e do cão (nome, endereço, raça, idade, sexo, entre outros) e informações epidemiológicas (por exemplo, presença de animais silvestres, ambiente domiciliar, peridomiciliar ou silvestre), e de possíveis alterações clínicas (inclusive alopecia, onicogribose, ceratoconjuntivite, lesões cutâneas e presença de ectoparasitos) que permitiram definir o quadro clínico da leishmaniose canina em assintomático, oligossintomático e polissintomático.

No distrito de Conceição de Jacareí/RJ foram diagnosticados dois casos humanos de leishmaniose visceral (foco de transmissão) e a partir de um raio de 100 metros desses casos, foram coletadas amostras de sangue dos 41 cães da região. Na cidade de Campo Grande/MS foram coletadas 42 amostras de cães, de uma área previamente determinada como endêmica.

2.10 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os soros obtidos dos cães foram avaliados pela técnica de RIFI. Para esta técnica foi utilizado antígeno de *L. infantum*, empregando o conjugado específico anti-IgG de cão, bem como os soros controles positivo e negativo, do kit diagnóstico de leishmaniose produzido e comercializado por BIOMANGUINHOS, FIOCRUZ, RJ.

As lâminas foram preparadas para a técnica da RIFI, depositando-se 10 µL de antígeno de *Leishmania* sobre as áreas demarcadas. Em seguida, procedeu-se a secagem em estufa a 37°C. Foram utilizadas diluições seriadas (1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320) do soro em solução salina (PBS) pH 7,4, transferindo-se depois 10 µL para as correspondentes marcações das lâminas. Estas foram incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida e para remoção dos soros, foram lavadas três vezes, durante 10 minutos com PBS.

Após a secagem das lâminas estas foram recobertas com conjugado fluorescente, diluído a 1:40, contendo 1mg de Azul de Evans, seguindo de nova incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e lavagem três vezes em PBS. As lâminas foram secas e montadas em glicerina tamponada e lamínula, e observadas ao microscópio de fluorescência em objetiva de 40x até a última diluição em que se observou a fluorescência do flagelo do parasita, este foi considerado o nosso maior título. Os cães que apresentaram titulações iguais ou maiores que a diluição 1:40 foram considerados soro positivos para leishmaniose de acordo com o critério estabelecido pelo Ministério da Saúde (FUNASA, 1999).

2.11 Coleta do fragmento de pele para exames histológicos

Após o exame clínico e coleta do sangue, foram realizadas as biópsias de pele íntegra. A área escolhida para a estudos foi a região superior à pina auricular, por ser uma região mais exposta ao repasto sanguíneo dos flebotomíneos, e aparentemente, mais frequente ponto de infecção para LVC (TRAVI et al., 2001).

A técnica utilizada foi o bloqueio regional da área incisionada e retirada do fragmento, com o auxílio do “Punch” de 0,6 cm de diâmetro e em alguns casos o bisturi. Uma vez retirado, o fragmento foi seco em papel absorvente para em seguida ser colocado em solução de fixação formalina a 10% neutra tamponada (pH 7,2).

2.12 Processamento e análises histológicas

O material destinado a análises histológicas foi desidratado em soluções alcóolicas crescentes (álcool 70%, 80%, 90% e 100% I e II), permanecendo durante 1h em cada solução alcoólica. Posteriormente os fragmentos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina (PROPHET et al., 1992). Os cortes histológicos dos tecidos foram cortados a 4 μ m de espessura em micrótomo de rotação, sendo os mesmos corados segundo a técnica da Hematoxilina-Eosina (H&E), conforme Luna (1968). Para a observação das fibras de colágeno, foram feitos cortes seriados corados pelo Picrosúrio como descrita a seguir: os cortes foram desparafinados, hidratados e corados por uma hora em uma solução 0,2% de Sirius *Red*, *Directed Red 80* (Aldrich, Milwaukee, WI, EUA) dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado, a seguir foram lavados por cinco minutos em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris durante dois minutos. As lâminas histológicas foram observadas à microscopia de luz e fotografadas pelo sistema de captura de imagens.

2.13 Caracterização do infiltrado inflamatório

Os padrões inflamatórios foram classificados da seguinte forma: (a) presença/ausência de infiltrado; (b) intensidade da reação inflamatória: leve, moderado e intenso; (c) tipo celular predominante: mononuclear (presença de células mononucleares predominantemente macrófagos e linfócitos) e misto (infiltrado contendo uma variabilidade de células inflamatórias incluindo macrófagos, linfócitos, e polimorfonucleares); e (d) distribuição do infiltrado inflamatório: focal, focalmente extensivo e difuso (SANTOS et al., 2004).

2.14 Classificação intensidade parasitária

Utilizou-se a seguinte classificação para a intensidade parasitária: (a) ausente - sem presença de parasitos; (b) leve - com rara presença de formas amastigotas, que somente foram visualizadas com cuidadosa busca; (c) moderada, quando as formas parasitárias eram facilmente visualizadas, mas com distribuição restrita; e (d) intenso, quando o interstício e a maioria dos macrófagos presentes no infiltrado inflamatório estavam parasitados (SANTOS et al., 2004).

2.15 Caracterização do reparo tecidual

As fibras colagênicas foram avaliadas quanto ao efeito da reação inflamatória tecidual que causa a destruição tecidual. Assim, procurou-se caracterizar a fibroplasia através do tipo de fibra predominante, avaliando-se o grau de substituição, na derme, de fibras grossas pelas fibras finas.

As áreas de reparo por tecido conjuntivo, formado pelas fibras que contém colágeno, foram avaliadas através da coloração do Picrosirius, com o intuito de analisar a reparação tecidual das áreas de necrose tecidual.

2.16. Análises estatísticas

2.16.1 Amostra Rio de Janeiro

Foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2), com a correção de Yates quando necessário, para comparar as proporções de (ZAR, 1999): animais RIFI + parasitados e não parasitados e animais RIFI – parasitados e não parasitados; animais do sexo masculino RIFI + parasitados e não parasitados e RIFI – parasitados e não parasitados; animais do sexo feminino RIFI + parasitados e não parasitados e RIFI – parasitados e não parasitados; machos RIFI + parasitados e não parasitados e fêmeas RIFI + parasitados e não parasitados; machos RIFI – parasitados e não parasitados e fêmeas RIFI – parasitados e não parasitados; animais do sexo masculino assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos e animais do sexo feminino assintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos; animais do sexo masculino positivos (RIFI + e os RIFI – com parasitos observados na biópsia) e negativos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos; animais do sexo feminino positivos e negativos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos; animais do sexo masculino positivos e negativos assintomáticos e animais do sexo feminino positivos e negativos assintomáticos; machos positivos e negativos oligossintomáticos e fêmeas positivas e negativas oligossintomáticas; machos positivos e negativos sintomáticos e fêmeas positivas e negativas sintomáticas; total de animais positivos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos e o total de animais negativos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos; animais do sexo masculino com escore corporal bom (B), regular (R) e caquético (C) e animais do sexo feminino com escore corporal B, R e C; animais do sexo masculino positivos com escore corporal B, R e C e animais do sexo masculino negativos com escore corporal B, R e C;

animais do sexo feminino positivos com escore corporal B, R e C e animais do sexo feminino negativos com escore corporal B, R e C; machos com escore corporal B, positivos e negativos e fêmeas com escore corporal B, positivas e negativas; machos com escore corporal R, positivos e negativos e fêmeas com escore corporal R, positivas e negativas; (machos com escore corporal C, positivos e negativos e fêmeas com escore corporal C, positivas e negativas não foi testado uma vez que não havia fêmeas C); o total de animais positivos com escore corporal B, R e C e o total de animais negativos com o escore corporal B, R e C; animais positivos com e sem infiltrado inflamatório e animais negativos com e sem infiltrado inflamatório.

O teste *t* de Student foi utilizado para comparar as médias dos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre os animais positivos e negativos, com os dados previamente transformados em $\log(X+1)$, exceto para hematócrito que sofreu transformação pelo arco seno (ZAR, 1999).

Possíveis correlações entre os valores de titulação e os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram testadas através do coeficiente de correlação por postos de Spearman (*rs*), assim como possíveis correlações entre a idade dos animais e os parâmetros hematológicos e bioquímicos (ZAR, 1999).

Possíveis diferenças entre as médias de cada parâmetro bioquímico sanguíneo foram analisadas com o teste de Kruskal-Wallis entre os animais assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e sintomáticos (S), utilizando o teste *a posteriori* de Dunn quando ocorreram diferenças significativas (ZAR, 1999).

O teste do crivo (*screening test*) foi utilizado para calcular a sensibilidade e especificidade do RIFI, o percentual de falsos positivos e negativos, o valor preditivo do teste positivo e o valor preditivo de teste negativo (AYRES et al., 2005).

O nível de significância estatística adotado foi de $p \leq 0,05$.

2.16.2 Amostra Campo Grande

Foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2), com a correção de Yates quando necessário, para comparar as proporções de (ZAR, 1999): animais RIFI + parasitados e não parasitados e animais RIFI – parasitados e não parasitados; animais do sexo masculino RIFI + parasitados e não parasitados e RIFI – parasitados e não parasitados; machos RIFI + parasitados e não parasitados e fêmeas RIFI + parasitados e não parasitados; animais do sexo masculino

assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos e animais do sexo feminino assintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos; total de animais positivos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos e o total de animais negativos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos; animais do sexo masculino com escore corporal bom (B), regular (R) e caquético (C) e animais do sexo feminino com escore corporal B, R e C; o total de animais positivos com escore corporal B, R e C e o total de animais negativos com o escore corporal B, R e C; animais positivos com e sem infiltrado inflamatório e animais negativos com e sem infiltrado inflamatório.

Possíveis correlações entre os valores de titulação e os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram testadas através do coeficiente de correlação por postos de Spearman (r_s), assim como possíveis correlações entre a idade dos animais e os parâmetros hematológicos e bioquímicos (ZAR, 1999).

Possíveis diferenças entre as médias de cada parâmetro bioquímico sanguíneo foram analisadas com o teste de Kruskal-Wallis entre os animais assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e sintomáticos (S), utilizando o teste *a posteriori* de Dunn quando ocorreram diferenças significativas (ZAR, 1999).

O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

2.16.3 Resultados

2.16.3.1 Amostra Rio de Janeiro

A proporção de animais RIFI + parasitados e não parasitados e animais RIFI – parasitados e não parasitados foi considerada igual ($\chi^2 = 2,93$; $p = 0,087$), ou seja a probabilidade de um animal RIFI + ser parasitado não é superior a de um animal RIFI –; a proporção de animais do sexo masculino RIFI + parasitados e não parasitados e RIFI – parasitados e não parasitados foi considerada igual ($\chi^2 = 2,392$; $p = 0,122$); a proporção de animais do sexo feminino RIFI + parasitados e não parasitados e RIFI – parasitados e não parasitados foi considerada igual ($\chi^2 = 0,048$; $p = 0,826$); a proporção de machos RIFI + parasitados e não parasitados e fêmeas RIFI + parasitados e não parasitados foi considerada igual ($\chi^2 = 0,088$; $p = 0,767$); a proporção de machos RIFI – parasitados e não parasitados e fêmeas RIFI – parasitados e não parasitados foi considerada igual ($\chi^2 = 0,269$; $p = 0,604$); a proporção de animais do sexo masculino assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos e

animais do sexo feminino assintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos foi considerada igual ($\chi^2 = 0,118$; $p = 0,943$); a proporção de animais do sexo masculino positivos e negativos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos foi considerada igual ($\chi^2 = 1,768$; $p = 0,413$); a proporção de animais do sexo feminino positivos e negativos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos foi considerada igual ($\chi^2 = 1,477$; $p = 0,478$); a proporção de animais do sexo masculino positivos e negativos assintomáticos e animais do sexo feminino positivos e negativos assintomáticos foi considerada igual ($\chi^2 = 0,038$; $p = 0,847$); a proporção de machos positivos e negativos oligossintomáticos e fêmeas positivas e negativas oligossintomáticas foi considerada igual ($\chi^2 = 0,444$; $p = 0,505$); a proporção de machos positivos e negativos sintomáticos e fêmeas positivas e negativas sintomáticas foi considerada igual ($\chi^2 = 0,364$; $p = 0,546$); a proporção do total de animais positivos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos e o total de animais negativos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos foi considerada igual ($\chi^2 = 0,306$; $p = 0,858$); a proporção de animais do sexo masculino com escore corporal B, R e C e animais do sexo feminino com escore corporal B, R e C foi considerada igual ($\chi^2 = 0,888$; $p = 0,641$); a proporção de animais do sexo masculino positivos com escore corporal B, R e C e animais do sexo masculino negativos com escore corporal B, R e C foi considerada igual ($\chi^2 = 3,92$; $p = 0,141$); a proporção de animais do sexo feminino positivos com escore corporal B, R e C e animais do sexo feminino negativos com escore corporal B, R e C foi considerada igual ($\chi^2 = 0,997$; $p = 0,318$); a proporção de machos com escore corporal B, positivos e negativos e fêmeas com escore corporal B, positivas e negativas foi considerada igual ($\chi^2 = 0,003$; $p = 0,957$); a proporção de machos com escore corporal R, positivos e negativos e fêmeas com escore corporal R, positivas e negativas foi considerada igual ($\chi^2 = 0,703$; $p = 0,402$); a proporção do total de animais positivos com escore corporal B, R e C e o total de animais negativos com o escore corporal B, R e C foi considerada igual ($\chi^2 = 4,251$; $p = 0,119$); a proporção animais positivos com e sem infiltrado inflamatório e animais negativos com e sem infiltrado inflamatório foi considerada significativamente diferente ($\chi^2 = 3,718$; $p = 0,05$), ou seja, ocorreu uma maior proporção de animais positivos com presença de infiltrado inflamatório.

A média dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos grupos de animais positivos e negativos são apresentados na tabela 1 e apenas o valor médio de hemoglobina foi significativamente diferente entre os grupos ($t = 1,797$; $p = 0,04$).

Não foram observadas correlações entre os valores de titulação sorológica (RIFI) com os parâmetros hematológicos e bioquímicos (**Anexo D**). O valor de hematócrito total e volume

globular médio apresentaram correlação positiva significativa com a idade dos animais amostrados ($r_s = 0,266$; $p = 0,026$ e $r_s = 0,281$; $p = 0,018$ respectivamente), indicando o aumento destes parâmetros com o aumento da idade dos animais.

A média de neutrófilos no sangue variou significativamente entre os animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos do município do Rio de Janeiro ($H = 10,669$; $P < 0,01$; A – O, $p < 0,05$; A – S, ns; O – S, $p < 0,05$), sendo que 60% dos animais foram assintomáticos, 11,4% oligossintomáticos e 28,6% sintomáticos.

O teste do crivo (*screening test*) com base no número de animais RIFI + parasitados e não parasitados e RIFI – parasitados e não parasitados detectou 57,58% de sensibilidade, 100% de especificidade e 42,42% de resultados falsos negativo. O valor preditivo do teste positivo foi 100% e o valor preditivo do teste negativo foi de 36,36%, ou seja, se em um animal o RIFI der resultado negativo, há 36,36% de chances deste animal não ser parasitado (ou 63,64% de chances de estar parasitado).

2.16.3.2 Campo Grande

A proporção de animais RIFI + parasitados e não parasitados e animais RIFI – parasitados e não parasitados foi considerada igual ($\chi^2 = 0,128$; $p = 0,721$); a proporção de animais do sexo masculino RIFI + parasitados e não parasitados e RIFI – parasitados e não parasitados foi considerada igual ($\chi^2 = 0,075$; $p = 0,784$); a proporção de machos RIFI + parasitados e não parasitados e fêmeas rifi + parasitados e não parasitados foi considerada igual ($\chi^2 = 0,278$; $p = 0,598$); a proporção de animais do sexo masculino assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos e animais do sexo feminino assintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos foi considerada igual ($\chi^2 = 0,223$; $p = 0,895$); a proporção do total de animais positivos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos e o total de animais negativos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos foi considerada igual ($\chi^2 = 4,354$; $p = 0,113$); a proporção de animais do sexo masculino com escore corporal B, R e C e animais do sexo feminino com escore corporal B, R e C foi considerada igual ($\chi^2 = 2,186$; $p = 0,335$); a proporção do total de animais positivos com escore corporal B, R e C e o total de animais negativos com o escore corporal B, R e C foi considerada igual ($\chi^2 = 2,049$; $p = 0,359$); a proporção de animais positivos com e sem infiltrado inflamatório e animais negativos com e sem infiltrado inflamatório foi considerada igual ($\chi^2 = 2,837$; $p = 0,092$).

O valor de proteína total apresentou correlação negativa significativa com o valor de titulação sorológica (RIFI), indicando um aumento de proteína total conforme mais diluída é a titulação (**Anexo E**). O valor de hemoglobina apresentou correlação positiva significativa com a idade dos animais amostrados ($r_s = 0,337$; $p = 0,025$), indicando aumento do valor de hemoglobina conforme aumenta a idade dos animais amostrados.

A média do volume globular médio variou significativamente entre os animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos provenientes do município de Campo Grande ($H = 12,648$; $p < 0,01$; A – O, ns; A – S, $p < 0,05$; O – S, ns), sendo que 9,1% dos animais foram assintomáticos, 20,5% foram oligossintomáticos e 70,4% foram sintomáticos.

3 RESULTADOS

3.4 Rio de Janeiro – Conceição de Jacareí

Dos 41 animais com biópsia de pele e histopatologia, dentro do grupo soro-negativo (n=26), 13 (50,0%) foram considerados falso-negativos por apresentarem parasitas na pele, sendo deste modo, verdadeiramente positivos para *Leishmania* spp (**Tabela 1**). Assim, a prevalência inicial de 36,6% (15/41) evidenciada pela sorologia foi elevada para 68,3% (28/41) quando se utilizou duas ferramentas, o exame sorológico e a histopatologia.

A proporção de animais soro-positivos parasitados e não parasitados e de animais soro-negativos parasitados e não parasitados foi considerada igual ($\chi^2 = 2,93$; $p = 0,087$), ou seja, a probabilidade de um animal soro-positivo ser parasitado não é superior a de um animal soro-negativo (**Tabela 1**).

O teste do crivo (*screening test*) com base no número de animais soro-positivos parasitados e não parasitados e soro-negativos parasitados e não parasitados detectou 57,6% de sensibilidade, ou seja, 57,6% dos resultados negativos da RIFI são falso-negativos. A especificidade, traduzida pela capacidade do teste em detectar casos falso-positivos, não pode ser mensurada no presente estudo devido ao fato de que a não observação de parasitas no fragmento de pele analisado não significa que o animal não esteja parasitado.

Dos 28 cães positivos (em ambos os testes sorológico e histopatológico), mais da metade (57,1%) não apresentou sintomatologia clínica (AS), 10,7% foi classificado como oligossintomáticos (OS) e 32,1% como polissintomáticos (PS) (**Figura 1 e Gráfico 1**). Dos 24 cães assintomáticos, 18 (75%) apresentaram parasitas na pele, enquanto que dos 13 cães polissintomáticos, 12 (92,3%) apresentaram parasitas na pele. Metade dos cães OS (2 em 4) apresentaram parasitas na pele (**Gráfico 1**).

Tabela 1: Relação entre a sorologia e a presença de parasitas na pele dos cães, proporção de animais soro-positivos parasitados e não parasitados e de animais soro-negativos parasitados e não parasitados.

	<i>Parasitas</i>	<i>Presença</i>	<i>Ausência</i>	<i>Total</i>
<i>RIFI</i>				<i>RIFI</i>
Negativo	13	13	26	
Positivo	8	7	15	
Total	21	20	41	

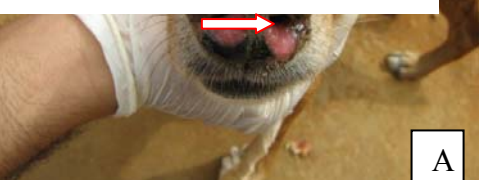
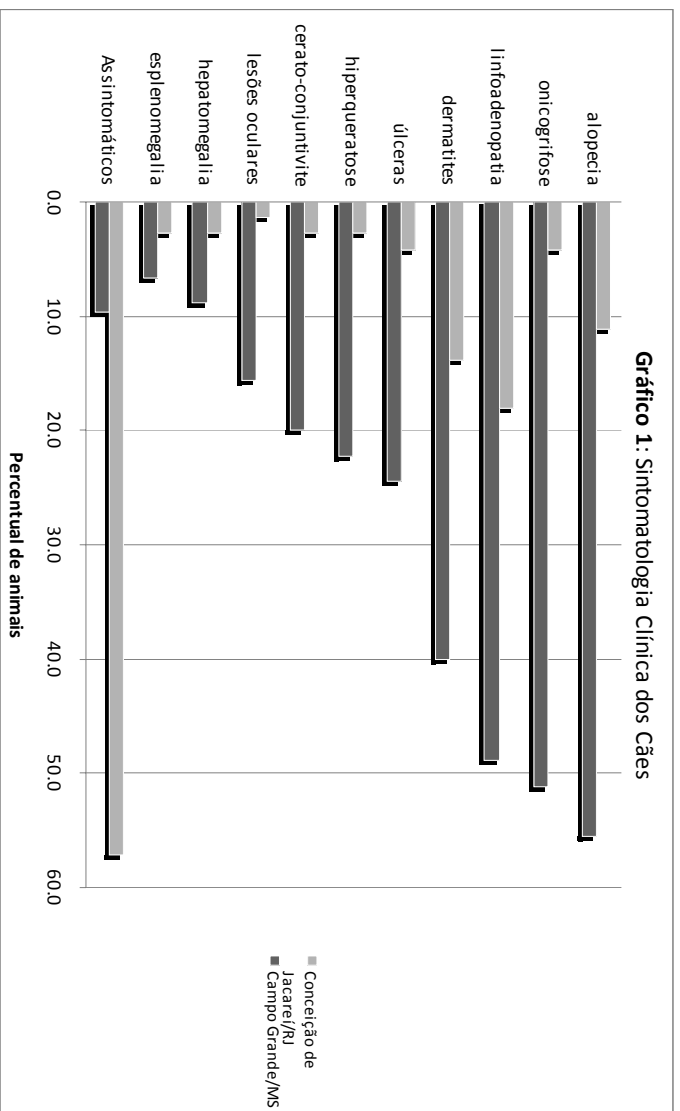




Figura 1 Cães provenientes do Município de Conceição de Jacareí/RJ, positivos para *Leishmania* spp, com sinais e sintomas clínicos característicos da infecção:(A) úlcera em plano nasal; (B) lesão em ponta de orelha; (C) lesão em plano nasal; (D) uveíte em olho direito; (E) linfadenopatia localizada. Imagens da coleta a campo realizada em abril de 2007.

Gráfico 1: Representação do percentual da sintomatologia clínica dos cães positiva para *Leishmania* spp Conceição de Jacareí/RJ e Campo Grande/MS.



As médias dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos grupos de animais positivos e negativos estão apresentadas (**Anexo D**). Dentre os parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados, encontramos diferença significativa entre os diferentes padrões de sintomatologia (AS, OS e OS) e o número de neutrófilos/mm³. Assim, a média de neutrófilos no sangue variou significativamente entre os animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos do município de Conceição de Jacareí/RJ ($H = 10,669$; $P < 0,01$; AS (8199) – OS (4620), $p < 0,05$; AS – PS, ns; OS – PS (7625), $p < 0,05$). As análises estatísticas também revelaram que o valor médio de hemoglobina foi significativamente maior no grupo de animais positivos ($t = 1,797$; $p = 0,04$).

A soro-prevalência, o parasitismo da pele, e a sintomatologia, não foram influenciados significativamente quando analisados entre os sexos e/ou dentro dos grupos soro-positivos e soro-negativos para cada sexo. Ainda, a proporção do total de animais positivos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos e o total de animais negativos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos foi considerada igual ($\chi^2 = 0,306$; $p = 0,858$). Observamos que o escore corporal não foi influenciado estatisticamente pelo resultado da sorologia, tanto quando analisado o número total de animais como entre os sexos.

Os resultados mostraram uma maior proporção de animais positivos à leishmaniose com presença de infiltrado inflamatório. Ou seja, a proporção de animais positivos com e sem infiltrado inflamatório e de animais negativos com e sem infiltrado inflamatório foi considerada significativamente diferente ($\chi^2 = 3,718$; $p = 0,05$).

Observou-se que 25 (89,3%) dos 28 animais positivos apresentaram algum tipo de infiltrado inflamatório. A reação inflamatória, caracterizada como mononuclear (macrófagos e linfócitos) encontrada em 80% dos animais assintomáticos, foi classificada como leve, apresentando predominantemente uma distribuição focal (**Figura 2**), embora nos casos moderados observou-se um padrão focalmente extensivo, com formação de granuloma em 1 caso (**Figura 3**).

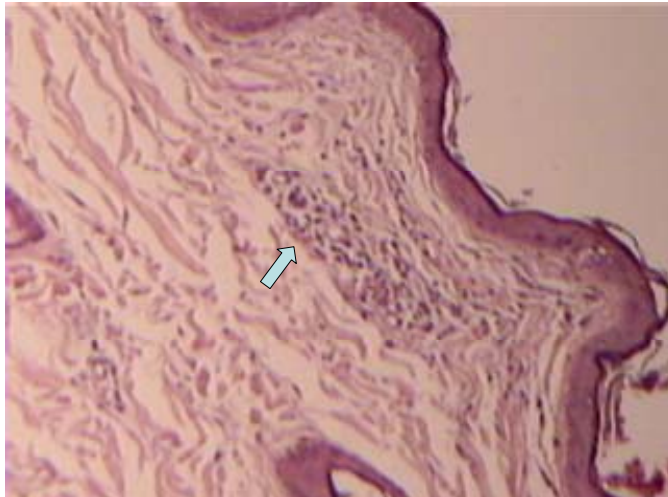


Figura 2 Fotomicrografia de pele íntegra de cão positivo para *Leishmania* spp, Conceição de Jacareí/RJ – Abril de 2007. Infiltrado inflamatório leve e focal na derme (seta) (HE 100X original).

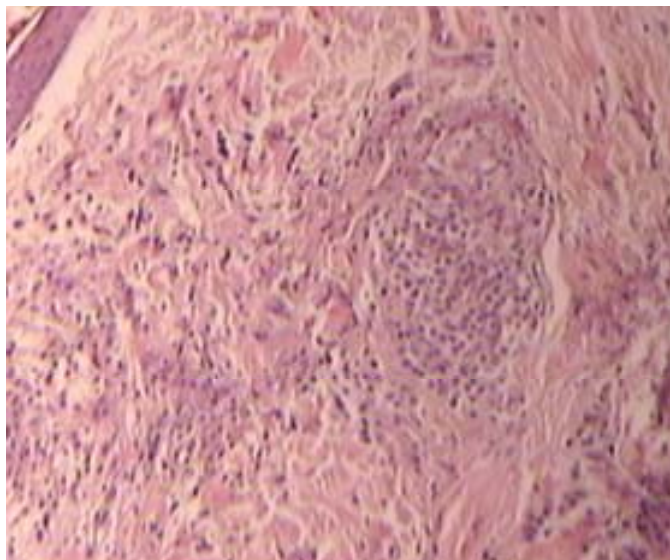


Figura 3 Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Conceição de Jacareí/RJ – Abril de 2007. Infiltrado inflamatório moderado, focalmente extensivo com formação de granuloma (HE 200X original).

As formas amastigotas na pele dos 21 cães parasitados foram observadas de forma dispersa em todos os animais, de intensidade leve nas áreas da reação inflamatória, geralmente na derme papilar (**Figura 4**), sendo que em três cães também foram encontradas no interior do citoplasma de macrófagos.

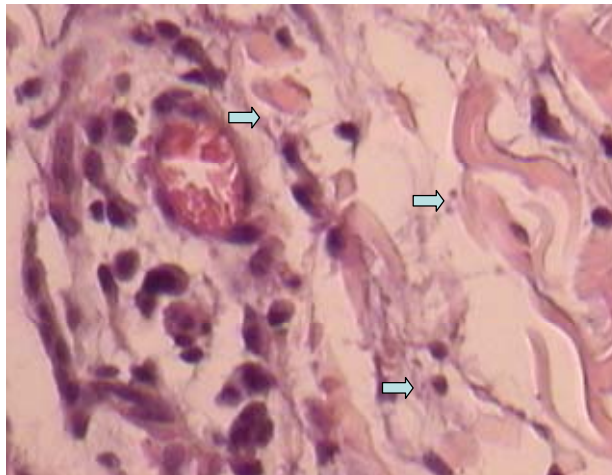


Figura 4 Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Conceição de Jacareí/RJ – Abril de 2007. Amastigotas dispersas (setas) de intensidade leve no interstício em meio à reação inflamatória mononuclear (HE 400X original).

Em relação à fibroplasia, dos 28 cães positivos do RJ, 20 (70,1%) apresentaram fibroplasia, desses, 17 de forma leve e 3 de forma moderada. Pode-se observar que a presença e distribuição da fibroplasia ocorreram nas áreas de infiltrado inflamatório, todos os animais que apresentaram reação inflamatória apresentaram alteração na arquitetura do tecido conjuntivo da derme, com proliferação de fibras finas de colágeno, observadas com a coloração do Picrosirius (**Figura 5 e 6**).

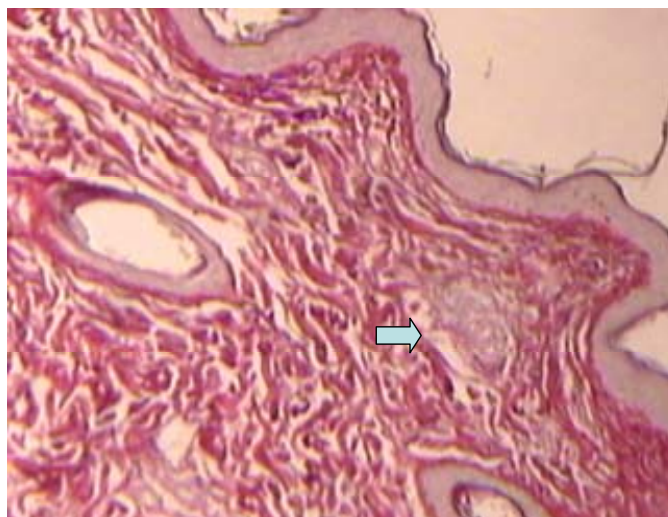


Figura 5 Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Conceição de Jacareí/RJ – Abril de 2007. Fibroplasia leve. Pequenos focos de fibras finas de colágeno na derme papilar (seta) (Picrosirius 100X original).

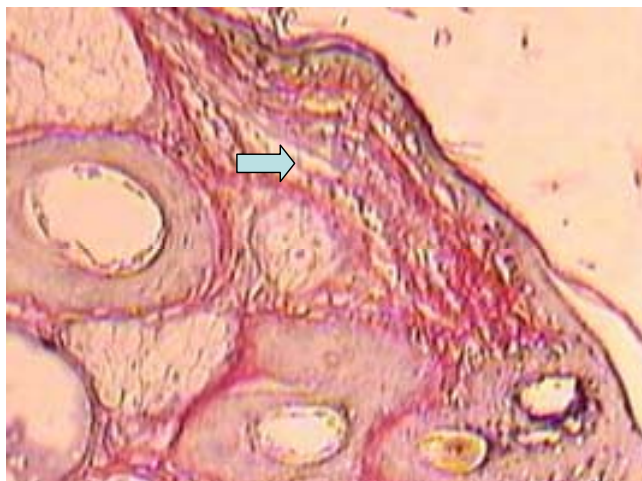


Figura 6 Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Conceição de Jacareí/RJ – Abril de 2007. Fibroplasia moderada. Focos de fibras finas desorganizadas (seta)
(Picrosirius 100X original)

3.5 Mato Grosso do Sul – Campo Grande

Dos 42 cães avaliados, somente um não apresentou positividade ao teste sorológico, sendo também negativo ao exame histopatológico. Assim, dos 41 cães positivos, 9,7% não apresentaram sintomatologia (AS), 17,1% foram classificados como oligossintomáticos (OS) e 73,2% como polissintomáticos (PS) (**Figura 7**).

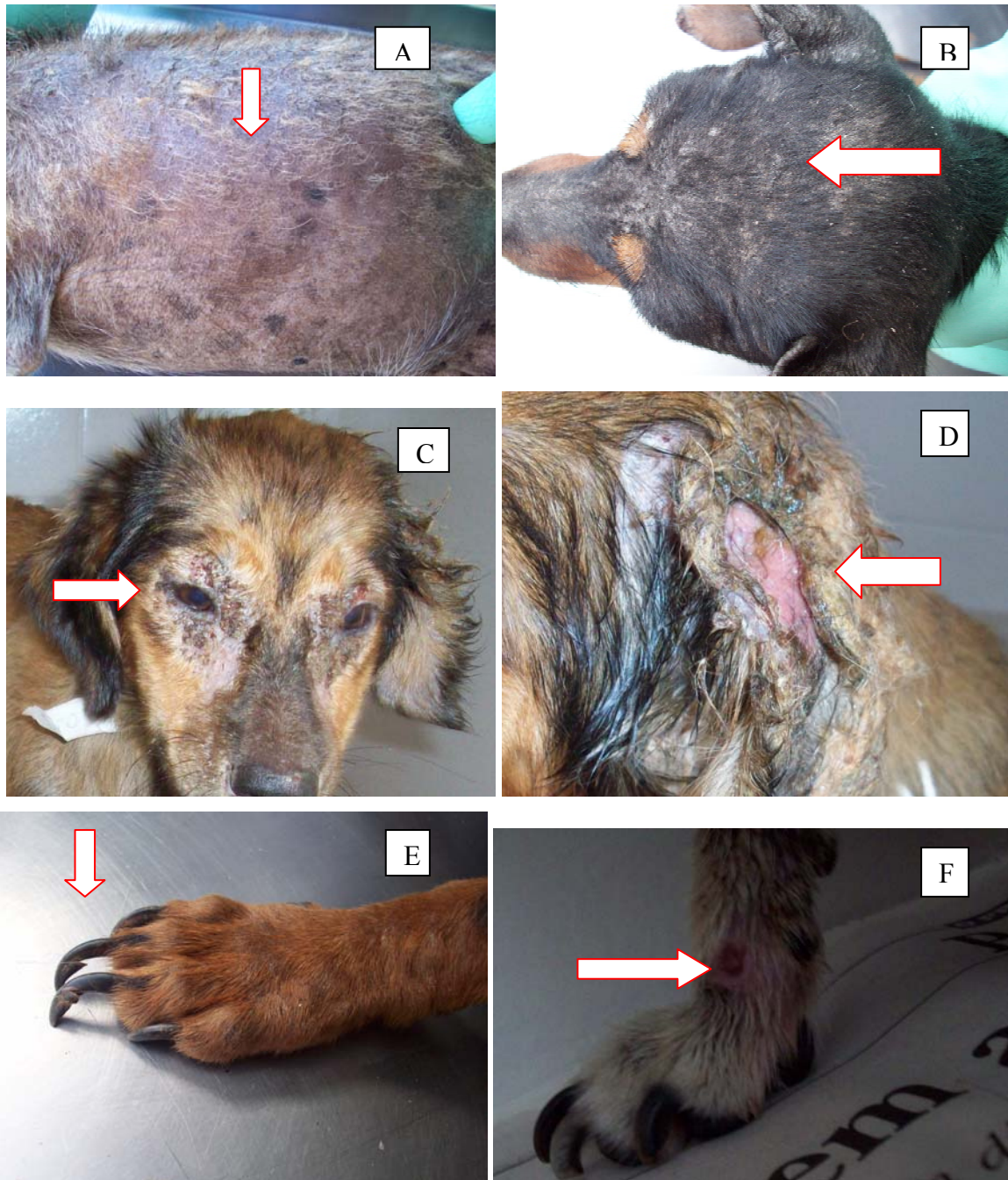


Figura 7 Cães proveniente do Centro de Controle de Zoonoses em Campo Grande/MS, positivos para *Leishmania* spp, apresentando sinais e sintomas clínicos característicos da infecção: (A) alopecia generalizada; (B) alopecia periocular; (C) onicogribose; (D) dermatite descamativa; (E) úlcera de pele em orelha; (F) úlcera de pele em membro. Imagens da coleta realizada em Abril de 2008.

A presença de parasitos na pele foi similar ao encontrado nos cães de Conceição de Jacareí, ou seja, observamos formas amastigotas em 75%, metade (57,1%) e na maioria (76,7%) dos animais AS, OS e PS respectivamente.

O valor da proteína total avaliado apresentou correlação negativa significativa com os títulos sorológicos, ou seja, quanto maior a titulação maior a quantidade sérica de proteína total.

A média do volume globular médio variou significativamente entre os animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos provenientes do município de Campo Grande ($H = 12,648$; $p < 0,01$; AS – OS, ns; AS – PS, $p < 0,05$; OS – PS, ns).

A reação inflamatória foi caracterizada como mista (presença de mononucleares e polimorfonucleares) em 57,6% (19 em 38) dos casos. Ainda, o número de cães que apresentaram intensidade de reação inflamatória leve, moderada e intensa foi semelhante: leve (39,8%), moderada (34,2%) e intensa (26,3%). As células inflamatórias na derme estavam distribuídas de forma focal, focalmente extensiva e difusa, acompanhando a intensidade da reação e do parasitismo, isto é, focal na forma leve, focalmente extensiva na forma moderada e difusa na forma intensa. Ainda, a maioria das lesões foi encontrada ao redor dos folículos pilosos, associados ao plexo vascular da derme (**Figura 8 e 9**).

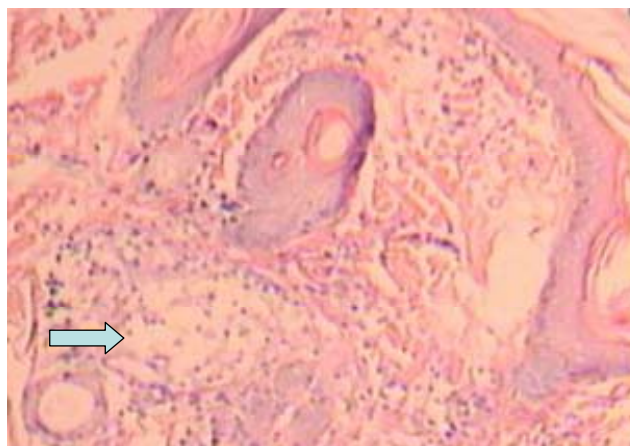


Figura 8 Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Campo Grande/MS – Abril de 2008. Reação inflamatória moderada, focalmente extensiva e área de necrose (seta) (HE 200X original).

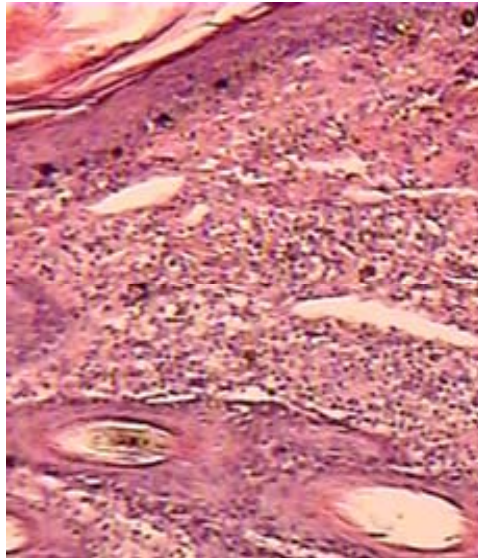


Figura 9 Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Campo Grande/MS – Abril de 2008. Reação inflamatória intensa disposta ao redor dos folículos pilosos, vasos da derme e difusamente (HE 200X original).

À semelhança do RJ, as formas amastigotas se encontravam difusamente dispersas no interstício da pele dos cães de Campo Grande (**Figura 10**), sendo também foram observadas as formas em macrófagos (**Figura 11**).

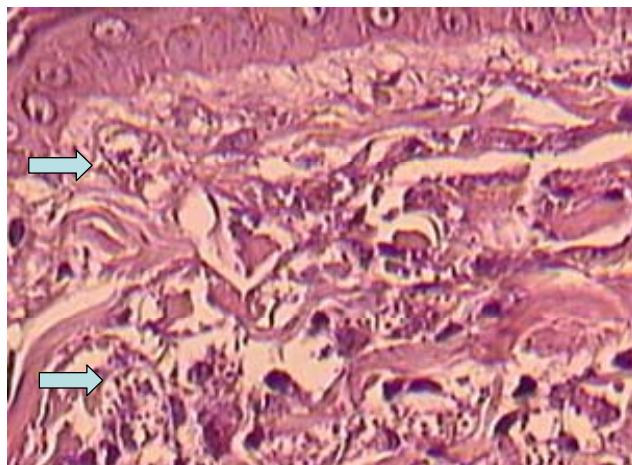


Figura 10 Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Campo Grande/MS – Abril de 2008. Amastigotas de intensidade moderada e distribuição difusa (setas) (HE 200X original).

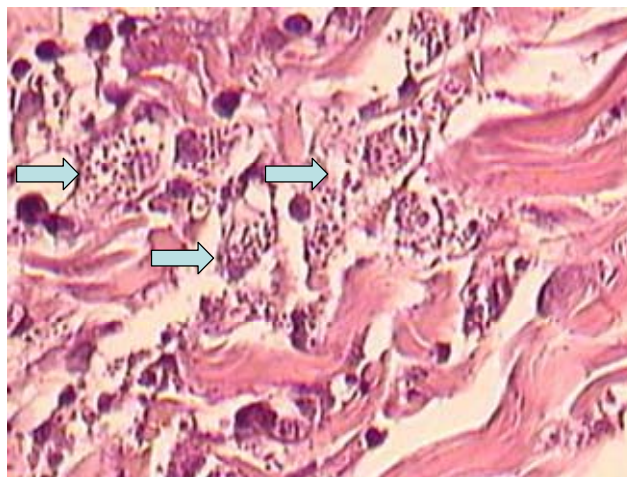


Figura 11 Fotomicrografia de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Campo Grande/MS – Abril de 2008. Distribuição intensa e difusa de formas amastigotas. Notar a presença dos parasitas no interior dos macrófagos (setas) (HE 400X original).

A fibroplasia foi observada em 31 animais (75,6%), sendo que desses, 7 eram de forma leve, 16 moderada e 8 de forma intensa, acompanhando a presença e intensidade do infiltrado inflamatório. A semelhança dos cães de Conceição de Jacareí, todos os animais que apresentaram reação inflamatória apresentaram também produção de fibras finas de colágeno observadas com a coloração do Picosirius. Diferentemente dos cães do RJ, observou-se nos animais de Campo Grande, áreas de necrose, conseqüentes da destruição das fibras de tecido conjuntivo da derme, com intensa reação inflamatória dispersa (**Figura 12**).

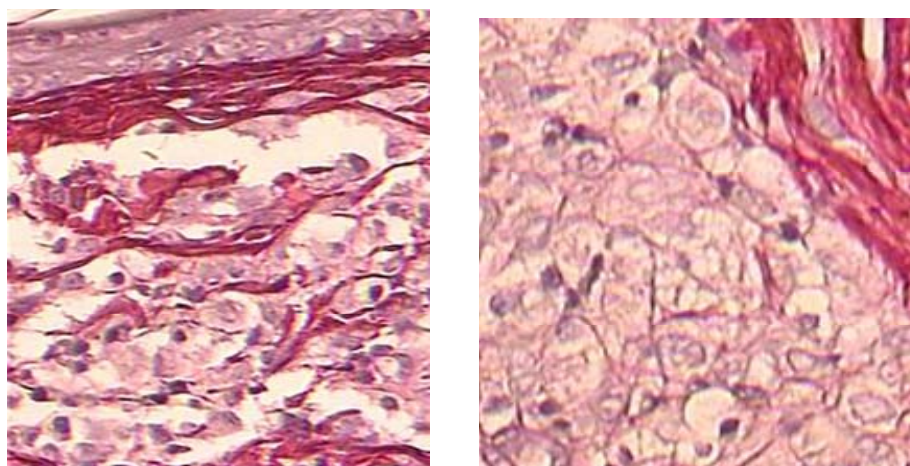


Figura 12 Fotomicrografias de pele íntegra de orelha de cão positivo para *Leishmania* spp, Campo Grande/MS. Notar áreas de necrose com fibras grossas de colágeno destruídas e algumas fibras finas de colágeno (Picosirius 400X original).

4 DISCUSSÃO

O diagnóstico da LV pode se basear em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (FERRER, 1999; LEONTIDES et al., 2002). O teste sorológico de RIFI é amplamente utilizado em estudos epidemiológicos, sendo indicado como o teste de eleição para o diagnóstico da LVC pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do governo brasileiro.

Com as ferramentas de diagnóstico, utilizadas no presente estudo (sorologia e histopatologia), pode-se confirmar a infecção dos cães e avaliar a sensibilidade do teste sorológico. A sensibilidade, capacidade de um teste em detectar animais falso-negativos, encontrada foi de 57,6%, valor abaixo do citado na literatura, que varia entre 68% e 100% (MANCIANTI et al., 1988; LIRA et al., 2005; ZANETTE, 2006; FERREIRA et al., 2007). A ocorrência de casos falso-negativos pode estar associada a “janela imunológica”, consequência de fenômenos imunobiológicos como (a) período pré-patente, necessário para a instalação e início da multiplicação dos parasitas, (b) soro-conversão, que ocorre aproximadamente três meses após a infecção, (c) animais que nunca farão soro-conversão, (d) cães soro-positivos que se tornam soro-negativos, mais ainda permanecem infectados (FERRER et al., 1995; LEONTIDES et al., 2002; FERRER, 2004).

Em virtude da necessidade de notificação compulsória da doença, o diagnóstico de LVC deve ser feito e da forma mais precisa possível. Para tanto, é importante que se conheça o método utilizado, as suas limitações e interpretação clínica. Nesse sentido, quando se utilizou a histopatologia como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da LVC, a eficácia da detecção dos animais infectados dobrou quando somente o teste sorológico foi utilizado. Assim, pode-se observar a proporção de cães em Conceição de Jacareí/RJ que possuem parasitos na pele íntegra, que não são retirados nos programas de vigilância quando se utiliza apenas o teste sorológico, é semelhante ao número de animais soropositivos que são retirados. Isso resulta em cães falso-negativos que permanecem na área, constituindo um fator de risco potencial, exercendo um importante papel na manutenção do ciclo de transmissão doméstico da *L. infantum*. Deve-se considerar ainda que, o fato de não encontrar-se formas amastigotas em um fragmento de pele íntegra não quer dizer necessariamente que o animal não possa estar parasitado em outro local de pele não amostrado.

A LVC caracteriza-se por apresentar um largo espectro de sintomatologia clínica. Deste modo, os cães infectados podem desenvolver um ou mais sintomas brandos (oligossintomáticos), uma forma clínica grave (polissintomáticos) levando à morte do animal,

ou não apresentarem sintomatologia. As principais manifestações clínicas como as lesões de pele, hipertrofia generalizada dos linfonodos e hepatoesplenomegalia foram encontradas tanto nos cães de Campo Grande/MS, como nos cães de Conceição de Jacareí/RJ. Entretanto, a intensidade e frequência de sinais clínicos observados nos cães no presente estudo variaram entre as duas localidades estudadas. A sintomatologia da LVC tem sido associada às alterações no sistema imune como a diminuição de linfócitos T e ausência da hipersensibilidade do tipo tardia para antígenos de *Leishmania* (PINELLI et al., 1994). Nesse contexto, as diferenças no microambiente do hospedeiro podem estar influenciando na patogenia e severidade da infecção nas diferentes áreas. De fato, sabe-se que em infecções naturais, os hospedeiros estão expostos a uma grande diversidade de micro-organismos patogênicos, resultando em complexas associações benéficas ou não para determinado agente infeccioso e para o hospedeiro. Outros fatores que também influenciam na patogenia da infecção e conseqüentemente no desenvolvimento de diferentes sintomas da LVC incluem diferentes sítios de inoculação e tamanho do inóculo.

A perda de peso, outra manifestação comum em cães infectados por *L. infantum*, não foi observada neste estudo, embora Marzochi et al. (1985) salientem que o emagrecimento dos cães em áreas de LV ocorra com frequência. Do mesmo modo, os resultados não mostraram associação entre títulos sorológicos e sintomatologia clínica. Significante declínio das células T (CD4+) e um vigoroso estímulo da imunidade humoral são características da LVC, porém, uma possível associação entre os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e a severidade de sintomas da doença clínica é discutido e controverso (ALMEIDA et al., 2005).

Os aspectos clínicos da infecção por *Leishmania* spp observados nos cães estudados em Conceição de Jacareí/RJ, são similares aos animais da região Nordeste (DEANE, 1956) em áreas do Mediterrâneo, Sul da Europa e Norte da África (MALANOS, 1947). A proporção de cães assintomáticos (57,1%) foi similar ao observado por Marzochi et al. (1985), Genaro (1995) e Feitosa et al. (2000) que afirmam ser freqüente a observação de cães acometidos pela doença com ausência de sintomas.

A linfadenopatia foi o principal sinal clínico observado entre os animais sintomáticos de Conceição de Jacareí/RJ. Keenan et al. (1984) mencionaram que a linfadenopatia, ocorre entre 27 e 55 dias pós-inoculação experimental de *L. infantum* em cães. A linfadenopatia observada nos cães soropositivos também foi registrada por Ciaramella et al. (1997). Outro sinal clínico freqüentemente observado nos cães do RJ foram as dermatopatias como alopecia e úlceras. Este achado difere dos anteriores descritos na literatura, onde as lesões de pele

foram mais comuns entre os sinais clínicos da infecção por LVC (CIARAMELLA et al., 1997; BANETH et al., 2001; FERRER, 2002; AMUSATEGUI et al., 2003; SOLANO-GALLEGO et al., 2004). As lesões de pele encontradas nos cães de Conceição de Jacareí/RJ foram semelhantes às relatadas por Marzochi et al. (1985) e Ciaramella et al. (1997), em cães soropositivos para leishmaniose.

Observou-se que o perfil clínico dos cães estudados em Campo Grande/MS é predominantemente polissintomático. Os sinais clínicos identificados nos cães PS para LVC incluíram alterações compatíveis com o quadro clínico clássico, conforme descrito por Santa Rosa & Oliveira (1997) e Soares (2003). Os cães sintomáticos (oligossintomáticos e polissintomáticos) apresentaram diferentes tipos e graus de sintomas. Os sinais clínicos mais freqüentes foram lesões cutâneas que incluíam alopecia, úlceras e descamação, como observado por Ribeiro (2007). As dermatites e alopecias, comuns nos cães de Campo Grande/MS, podem ter sua origem nas lesões encontradas ao redor dos folículos pilosos, associados ao plexo vascular da derme. As características clínicas como linfadenopatia (SOARES, 2003) e onicogribose (ALMEIDA, 2005) também foram observadas nos animais sintomáticos. A onicogribose, encontrada em metade dos cães estudados em Campo Grande/MS, foi considerado um sinal patognomônico para LVC por Ciaramella et al. (1997) e Baneth et al. (2001). Marzochi et al. (1985) atribuem essa alteração à baixa atividade dos cães e conseqüente falta de desgaste das unhas. O reduzido número de animais com ausência de sintomatologia na amostra de Campo Grande muito provavelmente ocorreu devido ao fato da coleta ter sido realizada no CCZ, embora seja importante registrar, que a maioria dos cães com LV que são admitidos no HOVET- UCDB são animais assintomáticos, cujo diagnóstico é confirmado após a prova parasitológica de punção de linfonodos (ANDRADE, comunicação pessoal).

As alterações laboratoriais encontradas no hemograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum* são inespecíficas. Em relação à série leucocitária, alguns autores relatam a ocorrência de leucopenia (KEENAN et al., 1984; SLAPPENDEL, 1988) enquanto outros relatam a ocorrência de leucocitose com neutrofilia como um achado ocasional (CIARAMELLA et al., 1997; BOURDOISEAU et al., 1997). O presente estudo mostrou que o número de neutrófilos variou significativamente de acordo com a sintomatologia dos animais, porém os valores médios encontram-se dentro dos limites de normalidade (JAIN, 1993). A média de neutrófilos no sangue dos cães com LVC em Conceição de Jacareí/RJ foi significativamente menor nos animais oligossintomáticos. A variação na contagem de

neutrófilos circulantes na LVC é amplamente relatada na literatura (MORENO et al., 1998; KOUTINAS et al., 1999; IKEDA et al., 2002; AMUSATEGUI et al., 2003). Neste estudo, a maioria dos animais portadores da LVC apresentou resultados de leucometria global dentro dos parâmetros de normalidade descritos por Jain (1993), estando de acordo com os achados de Campos (2005) e Costa-Val et al. (2007).

O valor da proteína total nos animais de Campo Grande/MS apresentou uma correlação negativa significativa com os títulos sorológicos, ou seja, quanto maior a titulação maior a quantidade sérica de proteína total. De fato, a hiperproteïnemia e a hipergamaglobulinemia são os achados mais freqüentemente observados na LVC, decorrentes de ativação policlonal de células B e da produção de anticorpos (FERRER, 1992; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; ALMEIDA et al., 2005; COUTINHO, 2005). À semelhança dos resultados encontrados, Abranches et al. (1991) não encontrou correlação entre a severidade da doença clínica e os títulos de IgG. Embora estes autores tenham relatado que, com o aparecimento dos sinais clínicos, os títulos de anticorpos tendem a aumentar. Esse achado também foi reportado por Pinelli et al. (1994) e Genaro et al. (1995) em infecção experimental de cães por *L. infantum*.

Os resultados estatísticos não demonstraram diferença significativa na contagem de eritrócitos entre os animais infectados e não infectados. Entretanto, o aumento no valor da hemoglobina encontrada nos cães positivos de Conceição de Jacareí/RJ pode estar associado a anemia regenerativa. Segundo Abranches et al. (1991), Ciaramella et al. (1997), Koutinas et al. (1999), Ikeda et al. (2002), e Reis et al. (2006), anemia normocítica normocrômica, é uma observação comum entre os cães infectados por *L. infantum*, em função do aumento do número de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, que contribuem para a diminuição da produção de eritrócitos na medula óssea. Os resultados mostraram que os valores do volume globular médio (VGM) nos animais assintomáticos são significativamente superiores aos valores dos animais polissintomáticos, porém com valores abaixo do mínimo de referência. Esses dados indicam que os cães infectados estavam com uma anemia normocítica normocrômica, como o descrito na literatura (REIS et al., 2006; WANER & HARUS, 2000), mesmo que estes não apresentem sinais clínicos da infecção por *Leishmania* spp. A anemia poderia ser responsabilizada por alguns sinais clínicos da LVC como apatia, emagrecimento progressivo e caquexia. Outros trabalhos demonstraram que os cães sintomáticos (SD) apresentavam severa anemia (AMUSATEGUI et al., 2003; REIS et al., 2006), entretanto nossos resultados não confirmam esses achados.

Em relação ao infiltrado inflamatório, foi observado que o mesmo constituiu um achado histológico comum na pele dos cães infectados, estando sempre associado à presença dos parasitas. Porém, percebem-se diferenças entre os animais de Conceição de Jacareí (RJ) e Campo Grande (MS): o infiltrado foi mais evidente em Campo Grande, onde 2/3 dos animais apresentaram as formas moderado e intenso, além da presença de neutrófilos em mais de 50% dos cães de Campo Grande, caracterizando o infiltrado em misto. A presença do infiltrado polimorfonuclear (neutrófilos) preferencialmente encontrados nos cães de Campo Grande/MS é explicada pela relação direta que essas células têm com o parasitismo observado nesses animais. De fato, nas leishmanioses os neutrófilos participam da fase inicial da infecção na tentativa de controlar a multiplicação dos parasitas, liberando durante esse processo enzimas lisossomais (mieloperoxidase, lisosima, elastase, proteinases, colagenases, gelatinase, fosfatase alcalina) responsáveis pela degradação da MEC da pele dos cães. Alguns autores reportam que a associação da presença de polimorfonucleares na pele íntegra de cães com características clínicas sugestivas de LVC poderia aumentar a eficácia do diagnóstico (MELO 2005).

As severas alterações no tecido conjuntivo da derme dos animais, associadas à perda da arquitetura normal e conseqüente substituição das fibras grossas de colágeno pelas fibras finas, foram freqüentemente evidenciadas nos cães que apresentaram um intenso infiltrado inflamatório, áreas de necrose e presença abundante de formas amastigotas. As intensas modificações ocorridas na MEC mostraram evidências de que as fibras de colágeno (preferencialmente as do tipo I) podem estar favorecendo as formas amastigotas a se evadirem da resposta imune. Provavelmente este fenômeno ocorra devido ao fato de os parasitas apresentarem receptores para o colágeno, facilitando a penetração na matriz de tecido conjuntivo da derme antes de serem fagocitados por macrófagos (LIRA et al., 1997). Esta interação é um fenômeno importante para a patogênese da infecção e poderia explicar o tropismo específico do parasita para a pele, uma vez que o colágeno é o componente mais abundante da matriz extracelular.

No presente estudo, observamos que nos animais com sintomatologia clínica que continham poucas ou nenhuma formas amastigotas, o infiltrado inflamatório era constituído principalmente de linfócitos e macrófagos. Quando muitos parasitas estavam presentes, o infiltrado era adicionalmente constituído por polimorfonucleares (neutrófilos). Esses resultados também foram reportados por Verçosa et al. (2008). Embora a reação inflamatória na pele de cães com LV seja descrita por alguns autores como granulomatosa (SLAPPENDEL

& FERRER, 1990), encontrou-se somente um animal com essa característica. Ainda, a alta carga parasitária observada na pele íntegra dos animais com ausência de sintomas clínicos, concorda com o observado por Costa e colaboradores (2007).

As diferenças na quantidade de animais AS, OS e PS observadas nas duas localidades estudadas parece não influenciar na presença ou ausência dos parasitas na pele íntegra, ou seja, as formas amastigotas são encontradas independentemente da sintomatologia observada e da área geográfica de ocorrência. Importante foi encontrar, tanto em Conceição de Jacareí como em Campo Grande, 75% de cães assintomáticos com parasitas na pele. Deste modo, a pele pode ser considerada um importante reservatório de formas amastigotas em cães assintomáticos. Na realidade, em áreas endêmicas, os cães com sintomatologia clínica são aqueles logo direcionados ao exame sorológicos e conseqüentemente descartados. Assim, os cães sem sintomatologia clínica (e com parasitas na pele) constituem importantes fontes de infecção para os vetores. O mesmo raciocínio diz respeito aos animais soro-negativos de Conceição de Jacareí, metade deles apresentou formas amastigotas, atuando como mantenedores do ciclo enzoótico na área.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em função dos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que o número de animais soro-positivos retirados nos Programas de Controle de Leishmaniose Visceral, é igual ao número de animais soro-negativos, porém infectados e possuem parasitos na pele, mantendo a infecção no ambiente.

Em Conceição de Jacareí/RJ, os animais assintomáticos são a maioria dentre os soros-positivos para RIFI, ao contrário de Campo Grande/MS, onde os animais soros-positivos apresentam-se predominantemente sintomáticos.

O exame histopatológico como ferramenta auxiliar no diagnóstico demonstrou que tanto o parasitismo tecidual, quanto o caráter inflamatório encontrado correlacionam-se com as alterações da matriz extracelular na pele dos animais infectados.

O diagnóstico da leishmaniose visceral deve ser reavaliado, desta forma, novas formas de diagnóstico de rotina são prioritárias e fundamentais, sendo que somente com estes dados será permitido diagnosticar se o cão está parasitado eficientemente, propondo assim medidas de vigilância ativa e de prevenção e controle mais diligentes, promovendo uma melhoria na condição da saúde pública e dos animais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; SANTOS GOMES, G.M; JANZ, G. Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol**, v.77: 557-561, 1991.

ADLER, S. Leishmania. In: **Advances in Parasitology**. New York, Academic Press, v. 2, 1964.

ALENCAR, J.E. **Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil**. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 1959, 342p.

ALEXANDER, B.; CARVALHO, R.L.; McCALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8: 1480-5, 2002.

ALMEIDA, M.A.; JESUS, E.E.; SOUSA-ATTA, M.L.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.; ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v.127(3): 227-32, 2005.

ALVAR J, CANAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v.57: 1-88, 2004.

AMUSATEGUI I, SAINZ A, RODRÍGUEZ F, TESOURO MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **Eur J Epidemiol.**, v.18(2): 147-56, 2003.

AZEVEDO, M.A.A. **Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no município do Poxoréo – MT** / Márcia Ávila Andrade de Azevedo. Botucatu: [s.n.], 2004. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2004, 49p.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L. & SANTOS, A.S. **BioEstat 4.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, Belém, 2005.

BANETH, G. et al. Allopurinol treatment diminishes the infectivity of dogs leishmaniasis to *Lutzomyia longipalpis* sand flies. **Isr. Vet. Med. Assoc.**, v.56 (2): 55-60, 2001.

BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.106: 315-324, 2006.

BONFANTI U, ZATELLI A. Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. **Am J Vet Res**, v.65(7): 964-71, 2004.

BOURDOISEAU, G., MARCHAL, T., MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymphonodes. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.9: 439-40, 1997.

BRANDONISIO, O; SPINELLI, R. & PEPE, M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. **Microbes and Infection**, v.6: 1402–09, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 120 p.

CAMPOS, K.C.H. **Avaliação citológica da medula óssea, estoques de ferro medular, hemograma e níveis séricos de proteína total, albumina e globulina em cães (*Canis familiares*) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi***. Niterói; Mestrado [Dissertação em Cirurgia e Clínica Veterinária] – Universidade Federal Fluminense. 2005.

CASTELLANO, L. R. C. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. **VITAE Biomédica**, Caracas, Venezuela, v.25: 1-10, 2005.

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral. (Calazar) – Normas Técnicas.** Brasília: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 1996, 86p.

CATARSINI, O. Epidemiologia e manifestazione cliniche della leishmaniosi del cane. **Revista Parasitologica**, v.44: 83-87, 1981.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v.141(21): 539-43, 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25(5): 358-68, 2003.

COLES, E. H. **Veterinary clinical pathology.** Philadelphia: W. B. Saunders, 1986, 615p.

CORRÊA, A. A. A. **Estudo morfofisiológico das lesões cutâneas por *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Reavaliação da histopatologia com enfoque na Matriz Extracelular.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz. - Rio de Janeiro. 2002, 134p.

COSTA VAL, A.P. **Tratamento da leishmaniose visceral canina com antimônio pentavalente encapsulado em lipossomas** (Doutorado). Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2004, 125p.

COSTA-VAL AP, CAVALCANTI RR, GONTIJO NF, MICHALICK MSM, ALEXANDRER B, WILLIAMS P, et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet J**, v.174(3): 636-43, 2007.

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.128(2):149-55, 2004.

COUTINHO, J.F.V. **Estudo clínico-laboratorial e histopatológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* com diferentes graus de manifestação física.** José Flávio Vidal Coutinho. Natal:[s.n.]. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte / Departamento de Bioquímica, 2005, 102p.

CUNHA, AM. & CHAGAS, E. Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.32:329-37, 1937.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital**, v.45(4):419-21, 1954.

DEANE, L.M., DEANE, M.P. Observações Preliminares sobre a Importância Comparativa do Homem, do Cão e da Raposa (*Lycalopex vetulus*) como Reservatório da *Leishmania donovani* em Área Endêmica de Calazar, no Ceará. **O hospital**, v.48:79-97, 1955.

DEANE, L.M. **Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, Brasil**, p.44-67, 1956.

DE LUNA R, FERRANTE M, SEVERINO L, AMBROSIO R, PIANTEDOSI D, GRADONI L, LUCISANO A, PERSECHINO A. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. **J Comp Pathol**, v.122(2):213-16, 2000.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A & COREY, R. Effect of Eliminating Seropositives Canines on transmission of Visceral Leishmaniasis in Brasil. **Clinical Infectious Diseases**, v.25:1240-42, 1997.

D'OLIVEIRA JR.,A.; COSTA, S.R.M.; BARBOSA, A.B.B.; ORGE, M.G. & CARVALHO,E. Assymptomatic *Leishmania chagasi* infection in Relatives Neighbors of Patients with Visceral Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92(1): 15-20, 1997.

DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Notes sur la leishmaniose viscerale canine. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v.28:426-31, 1935.

DOS SANTOS SO, ARIAS J, RIBEIRO AA, DE PAIVA HOFFMANN M, DE FREITAS RA, MALACCO MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v.12(3):315-17, 1998.

DOS SANTOS WL, DAVID J, BADARO R, DE FREITAS LA. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis. **Parasitol Res**, v.92:89-94, 2004.

ESTERRE, P.; DEDET, J.P.; FRENAY, C.; CHEVALLIER, M.; GRIMAUD, J.A. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study, **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, v.421(3):239-47, 1991.

EVANS, G.T.; TEIXEIRA, J.M.; Mc.AULIFFE, I.T.; VASCONCELOS, I.A.B.; SOUZA, A.Q.; LIMA, J.W.O. & PEARSON, R.D. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northwest of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v.166:1124-32, 1992.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v.15(28):36-44, 2000.

FERREIRA EC, DE LANA M, CARNEIRO M, REIS AB, PAES DV, DA SILVA ES, et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet Parasitol**, v.31:146-155, 2007.

FERRER J, MARTÍN-RODERO A, FLORES F. Contact resistance in the scanning tunneling microscope at very small distances. **Phys Rev B Condens Matter**. v.15(14):10113-115, 1988.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: Kirk RW, Bonagura JD. **Terapeutica Veterinaria de los Pequeños Animales**. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill; v.11:296-301, 1995.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: an update. In: proceeding of the international canine leishmaniasis forum. **Anais...** Barcelona, p. 6-10, 1999.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. **Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum**. Sevilla, Espanha. 2002.

FERRER, L. Canine leishmaniosis: evaluation of the immunocompromised patient. In: WSAVA CONGRESS CHOOSES, 8., 2004, GRANADA. *Proceedings*.....Disponível em: www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=PR02653 Acesso em: 12 dez 2004.

FUNASA. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1988. **Boletim epidemiológico da Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, MS. Ano III**, 1999.

GRAVINO A.E. Interpretation of laboratory data during cryptic leishmaniasis in dog. **Parasitologia**, v.46(1):227-29, 2004.

GREENE, C.E. et al. Leishmaniasis. In : _____. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. St. Louis: Saunders Elsevier. v.73:685-697, 2006.

GENARO O. **Leishmaniose Visceral americana**. In: Neves DP. Parasitologia Humana. 9 ed. São Paulo: Atheneu; p.64-81, 1988.

HALDAR, J.P.; GHOSE, S.; SAHA K.C & GHOSE A.C. Cell mediated immune response in Indian Kala-azar and post Kala-azar dermal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v.42:702-07, 1983.

HOMMEL, M. The genus *Leishmania*. Biology of the parasite and clinical aspects. **Bulletin du Institute Pasteur**, v.75:5-102. 1978.

IBGE 2007. Disponível em < <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1> > acesso em: 20 de julho de 2008.

IKEDA FA, CIARLINI PC, FEITOSA MM, GONÇALVES ME, LUVIZOTTO MVR, LIMA VMF. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Clínica Veterinária**, v. 8(47):42-48, 2003.

JAIN NC. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia Básica**. 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 427 p.

JÜTTNER C, RODRÍGUEZ SÁNCHEZ M, ROLLÁN LANDERAS E, SLAPPENDEL RJ, FRAGÍO ARNOLD C. Evaluation of the potencial causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. **Vet Rec**, v.149(6):176-79, 2001.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H.K.; JOHNSON, A. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Vet. Pathol.**, v.2:74-79, 1984.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old world canine leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.15(7):949-59, 1993.

KOUTINAS AF, POLIZOPOULOU ZS, SARIDOMICHELAKIS MN, ARGYRIADIS D, FYTIANOU A, PLEVRAKI KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J Am Anim Hosp Assoc**, v.35(5):376-83, 1999.

LAINSON, R., SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v.273: 595-99, 1978.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICH, R. 2 ed. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press. 1987, 121p.

LAINSON,R.; DYE, C.; SHAW, J.J.; MACDONALD, D.W.; COURTENAY, D.O.; SOUZA,A.A. & SILVEIRA,F.T. Amazonian Visceral Leishmaniasis distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relations to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.85:135-137, 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência Cultura**, v.44, 1992.

LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; PERIERES, J. & VOLLHARDT, Y. Écologie des leishmanioses dans le sud de France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Élaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. **Annales de Parasitologie**, v.54:277-95, 1979.

LAVERAN, A.; MENSIL, F. Sur un protozaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. & Mesn.). Parasite d'une fièvre de l'Ind. **Com. R. Hébr. Séanc. Acad. Sci.**, v.137:957-61, 1903.

LAVERAN, A. Leishmanioses. Kala-Azar, Bouton d'orient, Leishmaniose Américaine. **Masson et Cie.**, (ed), Paris, 1917, 521p.

LESTOQUARD, F. & DONATIEN, A. Parasitisme de la matrice ungueale dans la leishmaniose générale du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v.31, p.483-87, 1938.

LEONTIDES LS, SARIDOMICHELAKIS MN, BILLINIS C, KONTOS V, KOUTINAS AF, GALATOS AD, MYLONAKIS ME. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet Parasitol**, v.16:109(2):19-27, 2002.

LIMA, W.G.; OLIVEIRA, P.S.; CALIARI, M.V.; GONÇALVES, R.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.117:129-36, 2007.

LINDSAY, D.S. Canine Leishmaniasis in the United States. **Proceedings Western Veterinary Conference**, 2004.

LIRA, R.; ROSALES-ENCINA, J. L. & ARGUELOS, C. *Leishmania mexicana*: binding of promastigotes to type I collagen. **Experimental Parasitology**, v.85:149–57, 1997.

LIRA, R. A.. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz – NESC/CPqAM/FIOCRUZ. 2005.

LUNA, L.G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**, 3 ed. New York: McGraw Hill, 1968, 258p.

LUVIZOTTO, M. C. R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Manual Técnico Leishmaniose Visceral Canina**. Fort Dodge. p.28-29, 2006.

LUTZ A, NEIVA A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.4:84-95, 1912.

MANCIANTE, F., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonisl treatment. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v.82:566-67, 1988.

MAROLI, M.; KHOURY, C. Prevention and control of leishmaniasis vectors: current approaches. **Parasitologia**, v.46(1):211-15, 2004.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; SOUZA, P.P.; TOLEDO, L.M.; FILHO, F.B.R. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.1(4):432-446, 1985.

MATHIAS, R.. **Imunoglobulina na patogenia da leishmaniose visceral em hamsteres / Regiane Mathias**. São Paulo: [s.n.], Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2004, 67p.

MATTOS JR, D.G.; PINHEIRO, J.M.; MENEZES, R.C. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, (1):119-22, 2004.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The stranger case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, v.16:188-89, 2001.

MELO, F.A. **Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados / Ferdinan Almeida Melo**. Viçosa: [s.n.], 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2005, 75p.

MENDES, W.D.A.S.; SILVA, A.A.; TROVÃO, J.D.E.R.; SILVA, A.R.; COSTA, J.M. Space expansion of the American visceral leishmaniasis in São Luís, Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35: 227-31, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília: 2006, 120 p.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN ANDRÉS, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.88:491-93, 1994.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v.20:15-27, 1996.

MORENO P, LUCENA R, GINEL PJ. Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. **Vet Rec**, v.24(4):81-83, 1998.

NICOLLE, C. Isolament et culture des corps de Leishman. **Arch. Inst. Pasteur Tunis**. v.3:55-56, 1908.

NUNES, V. L. B. & GALATI, E. A. B.; *et al.*; **Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil**. 2000.

PALATNIK-DE-SOUSA CB, DOS SANTOS WR, FRANÇA-SILVA JC, DA COSTA RT, REIS AB, PALATNIK M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.65(5):510-17, 2001.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E.G.; MELRO, M.C.B.F.; OLIVEIRA, G.C.S.; DOS SANTOS, W.L.C.; PONTES-DECARVALHO, L.C. & OLIVEIRA-DOSSANTOS, A.J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for visceral leishmaniasis. Implications for disease control. **Acta tropica**, v.69:75-83, 1998.

PEARSON, R.D., SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v.22:1-13, 1996.

PINELLI, E., KILLINK-KENDRICK., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., DEL REAL, G., RUISTEMBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infections and Immunity**, v.62:229-35, 1994.

PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B. *et al.* **Laboratory methods in histotechnology**. Armed Forces Institut of Pathology, Washington D.C. 1992, 278p.

REIS AB, TEIXEIRA-CARVALHO A, VALE AM, MARQUES MJ, GIUNCHETTI RC, MAYRINK W et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v.12:102-16, 2006.

RIBEIRO, V.M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária.**, v.11:13-14, 1997.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Revista Clínica Veterinária**, v.2(11):24-28, 1997.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.**, v.12:315-17. 1998.

SANTOS, W.L.C.; DAVID, J.; BADARÓ, R.; DE-FREITAS, L.A.R. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis. **Parasitol. Res**, v.92:.89-94, 2004.

SANTOS, V.C. **Determinação do pH e estudo dos mecanismos envolvidos em seu controle no intestino médio de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Díptera: Psychodidae) durante a digestão de sangue e açúcares** / Vânia Cristina dos Santos. Belo Horizonte: [s.n.], 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Biológicas, 2006, 124p.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD. **Manual de**

Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo /
Coordenação Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves - São Paulo: A Secretaria, 2006, 158p.

SILVA, A. L. A. **Estudo sobre a visceralização da *Leishmania (Leishmania) amazonensis*** (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) **no modelo murino**. Tese (doutorado). Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2003.

SILVA, E. A., ANDREOTTI, R. & HONER, M. R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. [Behavior of *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of American visceral leishmaniasis, in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40(4):420-25, 2007.

SILVA, V.C. **Identificação de reservatórios de zoonoses em insetos vetores por espectrometria de massa.** / Vladimir Costa Silva. Brasília: 2006. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília – UnB / Brasília – DF, 2006, 68p.

SLAPPENDEL RJ. Canine leishmaniasis: A review based on 95 in Netherlands. **Vet Q** v.10(1):1-16, 1988.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical Microbiology and Infectious Disease of the Dog and Cat**. Philadelphia: W.B.Saunders Co., p.450-458, 1990.

SOARES, M.J.V. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-laboratoriais, histopatologia renal e testes específicos para diagnóstico / Maria de Jesus Veloso Soares**. Jaboticabal. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista - UNESP / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal, 2003, 74p.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON; H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **J Comp Pathol.**, v.130:7-12, 2004.

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.3:203-12, 2001.

TRAVI BL, TABARES CJ, CADENA H, FERRO C, OSORIO Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am J Trop Med Hyg**, v.64(3):119-24, 2001.

VALLADARES JE, RUIZ DE GOPEGUI R, RIERA C, ALBEROLA J, GÁLLEGO M, ESPADA Y, et al.. Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. **Res Vet Sci**, v.64(3):195-98, 1998.

VEXENAT, J.A.; FONSECA DE CASTRO, J.A. CAVALCANTE, R.; TAVARES, J.P.; SILVA, M.R.E.; BATISTA, W.H.; FURTADO CAMPOS, J.H.; HOWARD, M.K.; FRAM, I.; McNERNEY, R.; WILSON, S. & MILLES, M.A. Visceral Leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil. Preliminary Observations on the Detection and transmissibility of Canine and Sandflies Infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89(2): 131-35, 1994.

XAVIER, S.C.; DE ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Vet. Res.**, v.8: 2-17, 2006.

WHO, World Health Organization on Control of the Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. **Tech. Rep. Ser.** v.793:1-158, 1990.

WHO. **World Health Organization Manual on Visceral Leishmaniasis Control.** Division of Control of Tropical Diseases, Geneva, 1996.

WHO. **World Health Organization Manual on Division of control of tropical diseases. Disease sheet: Leishmaniasis (the disease)**, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).<<http://www.who.int/leishmaniasis/en>> acesso em: abril de 2007.

ZANETTE, MF. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina.** Dissertação mestrado. Faculdade de odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista de Araçatuba, 2006, 70p.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis.** Prentice-Hall, New Jersey, 1999

ANEXOS

Anexo A – Ficha clínica

UFRRJ

FICHA CLÍNICA CÃES PROJETO LEISHMANIOSE

Proprietário: _____ Registro: _____

Procedência: _____

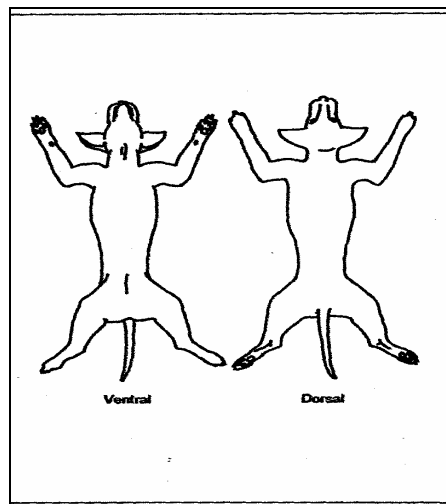
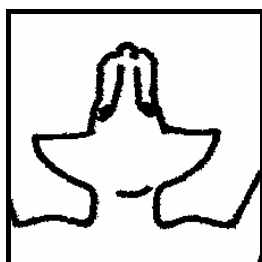
Nome do animal: _____ Idade: _____

Raça: _____ Sexo: _____ Porte: _____ Data: _____

SINAIS CLÍNICOS

Dermatológicos:

- | | | |
|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> alopecia localizada | <input type="checkbox"/> alopecia difusa | |
| <input type="checkbox"/> úlceras localizadas | <input type="checkbox"/> úlceras difusas | |
| <input type="checkbox"/> dermatite descamativa | <input type="checkbox"/> dermatite esfoliativa | <input type="checkbox"/> dermatite seborréica |
| <input type="checkbox"/> hiperqueratose nasal | <input type="checkbox"/> onicogribose | |



Oftalmológicos:

- | | | |
|--|--|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> ceratoconjutivite | <input type="checkbox"/> opacidade da córnea | <input type="checkbox"/> conjutivite |
|--|--|--------------------------------------|

Linfoadenopatia:

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> localizada | <input type="checkbox"/> generalizada |
|-------------------------------------|---------------------------------------|

Outros Sinais:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> paresia dos quartos posteriores | <input type="checkbox"/> perda progressiva de peso |
| <input type="checkbox"/> hepatomegalia | <input type="checkbox"/> esplenomegalia |

Anexo B – Dados clínicos dos cães de Conceição de Jacareí/RJ

Idem	Loca	Sexo	Idad	Clinic	Alc	U	De	L	Hips	Oni	Cera	Linfoa	Hepa	Esple	EsCo	HT%	RBC	VGM	CHGN	LBC	NEU	LINF	EO	BA	MO	Hb	PTT	ALB	LEIS†	T. CRU
CF-001	RJ	M	3	AD											B	49	7490000	65,4	20,4	10050	7638	1106	503	0	804	10	5,9	4,1	NEG	1/40
CF-002	RJ	M	2	AD											B	48	9890000	48,5	24,0	12900	7224	1806	1548	0	2322	11,5	6,2	4,1	1/40	1/10
CF-003	RJ	F	2	OD	X		X								R	34	4230000	80,4	40,6	8100	3240	2916	810	0	1134	13,8	8,1	4,3	1/40	1/40
CF-004	RJ	M	3	SD	X		X				X	X			B	24	4210000	57,0	30,0	11650	7922	2913	233	0	583	7,2	6,6	0,6	1/80	1/80
CF-005	RJ	F	2	SD	X		X					X			B	38	9010000	42,2	30,8	9950	7363	1791	597	0	199	11,7	5,1	2,4	1/80	1/80
CF-006	RJ	F	2	OD	X		X								R	16	1920000	83,3	67,5	12150	4253	5832	608	0	243	10,8	4,2	2,0	1/40	1/10
CF-007	RJ	M	1	SD								X			B	18	3490000	51,6	39,4	9200	6532	1104	644	0	920	7,1	4,3	2,3	NEG	1/80
CF-008	RJ	M	até 1	SD								X			R	20	3300000	60,6	89,0	12900	8901	2709	516	0	774	17,8	4,9	2,0	NEG	1/80
CF-009	RJ	M	1	SD								X			R	22	3440000	64,0	47,7	23250	19065	3720	0	0	465	10,5	8,0	4,0	1/80	1/20
CF-010	RJ	F	1	SD	X		X								B	33	5230000	63,1	18,5	17300	11764	2941	519	0	1730	6,1	5,8	3,4	NEG	neg
CF-011	RJ	M	até 1	AD											B	37	6150000	60,2	22,2	8750	5250	2100	1138	0	263	8,2	6,7	3,6	NEG	1/40
CF-012	RJ	F	até 1	OD											R	33	6250000	52,8	37,0	8400	2016	3864	588	0	1932	12,2	7,7	6,6	1/80	1/20
CF-013	RJ	M	até 1	AD											B	36	7370000	48,8	31,9	7100	6035	710	213	142	0	11,5	8,0	4,1	1/40	1/20
CF-014	RJ	M	até 1	AD											B	42	6170000	68,1	29,8	17900	13604	2327	895	0	1074	12,5	6,9	4,1	1/40	1/40
CF-015	RJ	M	10	OD											R	39	6110000	63,8	27,7	12600	6300	2646	1512	0	2142	10,8	6,6	4,3	NEG	1/10
CF-016	RJ	M	1	SD							X				C	28	3990000	70,2	25,4	11050	7183	3094	221	0	553	7,1	6,2	0,6	NEG	1/10
CF-017	RJ	M	5	SD	X		X					X			R	27	5410000	49,9	51,1	8350	5428	2589	84	0	251	13,8	8,0	1,6	NEG	1/20
CF-018	RJ	M	1	OD			X								B	43	6810000	63,1	24,7	5250	1785	2153	368	0	945	10,6	6,9	2,7	1/40	1/40
CF-019	RJ	M	5	SD	X		X								B	44	3000000	146,7	13,9	2100	1176	609	42	0	273	6,1	6,2	6,8	NEG	1/40
CF-020	RJ	M	2	OD											R	43	5530000	77,8	23,3	11800	8378	2832	590	0	0	10	8,0	4,3	NEG	1/40
CF-021	RJ	M	3	SD							X				R	43	6730000	63,9	36,7	13500	8235	2970	675	0	1620	15,8	6,8	2,9	NEG	1/40
CF-022	RJ	M	2	AD											B	31	4850000	63,9	23,2	10600	8162	1696	424	0	318	7,2	9,2	1,6	NEG	1/40
CF-023	RJ	M	3	AD											B	39	4810000	81,1	30,0	11250	7088	2925	338	0	900	11,7	7,2	2,2	NEG	1/80
CF-024	RJ	M	2	SD	X		X			X	X				B	42	5530000	75,9	42,4	13500	8505	3645	0	0	1350	17,8	7,1	2,4	NEG	1/40

Anexo B – Dados histopatológicos dos cães de Conceição de Jacareí/RJ (continuação)

Ident	Infiltrado Inflamatório			Parasitas			Fibroplasia										
	Não	Leve	Inten	PMN	Linf	Macr	Plasm	Não	Macr	Disp	Leve	Mode	Inten	Não	Leve	Mod	Inten
CF11	x							x						x			
CF12		x			x	x			x						x		
CF14		x			x	x											
CF15		x			x	x											
CF16		x			x	x			x						x		
CF17		x			x	x			x								
CF18		x			x	x											
CF19	x																
CF20		x				x			x						x		
CF21		x			x	x											
CF22		x			x	x			x								
CF23	x																
CF24		x			x	x			x						x		
CF27	x																
CF28		x				x			x						x		
CF29		x				x			x						x		
CF30		x			x	x			x						x		
CF31		x			x	x			x						x		
CF32		x			x	x			x						x		
CF33		x			x	x			x						x		
CF34		x			x	x			x						x		
CF35		x			x	x			x						x		
CF36		x				x									x		
CF37		x				x											
CF38		x				x											
CF39		x				x											
CF40	x																
CF41		x				x											
CF42		x				x											
CF43		x				x											
CF44		x				x											
CF45		x				x											
CF46		x				x											
CF47		x				x											
CF48	x																
CF49		x				x											
CF53		x				x											
CF54	x																
CF55		x				x											
CF58		x				x											
CF59		x				x											
CF67		x				x											
CF68		x				x											

Anexo C – Dados clínicos dos cães de Campo Grande/MS (continuação)

Ident	Infiltrado Inflamatório										Amastigotas					Fibroplasia							
	Sem	Leve	Mode	Inten	P1MN	Linf	Macr	Mon	mast	Plasm	Gig	Aus	Mac	Disp	(+)	(++)	(+++)	Não	Leve	Mod	Int		
MS01	X		X		X	X		X				X		X					X			X	
MS02		X	X			X						X		X						X			
MS03			X			X						X		X						X			
MS04		X		X		X						X		X						X			
MS05			X			X						X		X						X			
MS06		X				X						X		X						X			
MS07		X				X						X		X						X			
MS08		X				X						X		X						X			
MS09		X				X						X		X						X			
MS10			X			X						X		X						X			
MS11		X		X		X						X		X						X			
MS12			X			X						X		X						X			
MS13			X			X						X		X						X			
MS14			X			X						X		X						X			
MS15		X				X						X		X						X			
MS16		X				X						X		X						X			
MS17			X			X						X		X						X			
MS18			X			X						X		X						X			
MS19			X			X						X		X						X			
MS20			X			X						X		X						X			
MS21			X			X						X		X						X			
MS22			X			X						X		X						X			
MS23			X			X						X		X						X			
MS24		X				X						X		X						X			
MS25		X				X						X		X						X			
MS26			X			X						X		X						X			
MS27	X					X						X		X						X			
MS28			X			X						X		X						X			
MS29		X				X						X		X						X			
MS30			X			X						X		X						X			
MS31			X			X						X		X						X			
MS32	X					X						X		X						X			
MS33		X				X						X		X						X			
MS34		X				X						X		X						X			
MS35			X			X						X		X						X			
MS36		X				X						X		X						X			
MS37		X				X						X		X						X			
MS38		X				X						X		X						X			
MS39		X				X						X		X						X			
MS40	X					X						X		X						X			
MS41			X			X						X		X						X			
MS42			X			X						X		X						X			
MS43			X			X						X		X						X			
MS45		X				X						X		X						X			

Anexo D – Análise estatística Conceição de Jacareí/RJ

Parâmetros	Positivos	Negativos	T
Ht%	35,3±7,89	35,3±6,34	-0,014
VGM	71±19,26	75,27±30,35	-0,959
CHGM	34,6±9,75	29,03±10,3	1,623
LBC	12363,6±2854,03	10906,25±4681,84	0,989
NEUT	7907,2±3140,13	6843,25±3458,68	0,285
LINF	2960,7±1425,2	2449±1211,82	1,296
EO	595,8±584,67	808,63±651,99	-0,659
BA	11,5±47,28	0	---
MO	821,3±622,65	697,88±651,92	-0,134
Hb	11,8±2,86	9,81±2,42	1,797*
PTT	6,3±1,21	6,35±0,52	-0,489
ALB	3,5±1,21	3,58±1,79	0,323
RBC	5170606,1±1280966	4985000±1079365	0,265

* Valor significativo $p < 0,05$

Valores médios dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais positivos e negativos do município de Conceição de Jacareí/RJ. Comparação realizada através do teste *t* de Student.

Anexo E – Análise estatística Campo Grande/MS

Parâmetros	Positivos	Negativos	T
Ht%	35,3±7,89	35,3±6,34	-0,014
VGM	71±19,26	75,27±30,35	-0,959
CHGM	34,6±9,75	29,03±10,3	1,623
LBC	12363,6±2854,03	10906,25±4681,84	0,989
NEUT	7907,2±3140,13	6843,25±3458,68	0,285
LINF	2960,7±1425,2	2449±1211,82	1,296
EO	595,8±584,67	808,63±651,99	-0,659
BA	11,5±47,28	0	---
MO	821,3±622,65	697,88±651,92	-0,134
Hb	11,8±2,86	9,81±2,42	1,797*
PTT	6,3±1,21	6,35±0,52	-0,489
ALB	3,5±1,21	3,58±1,79	0,323
RBC	5170606,1±1280966	4985000±1079365	0,265

Valor significativo em $p < 0,05$.

Valores médios dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais positivos e negativos do município de Campo Grande/MS. Comparação realizada através do teste *t* de Student.