

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LESÕES HEPÁTICAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Igor Paula de Castro
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Julho de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LESÕES HEPÁTICAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Igor Paula de Castro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Julho de 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C355L
2012

Castro, Igor de Paula, 1987-

Lesões hepáticas na leishmaniose visceral canina: aspectos histo- patológicos e bioquímicos / Igor Paula de Castro. -- 2012.

39 f. : il.

Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-grama de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Cão - Doenças - Teses. 3. Leishmaniose visceral - Teses. 4. Fígado - Histopatologia - Teses. I. Medeiros, Alessandra Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Pro-grama de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”

Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me dar os meios necessários para conseguir chegar até aqui;

Aos meus pais Ivon e Alcione, irmãos Daniel e Lucas e avós Geralda e Terezinha pelo apoio em todos os momentos;

À professora Alessandra pela orientação, amizade e por tudo que me ensinou nesse período;

Ao Centro de Controle de Zoonoses, na pessoa do Dr. Adalberto de Albuquerque Pajuaba Neto, e principalmente à Dra. Márcia Beatriz Cardoso de Paula e Dra. Ana Cláudia Borges por auxiliarem durante a coleta de dados e disponibilidade em auxiliar no experimento;

Ao Laboratório de Patologia Clínica, em especial ao Prof. Antonio Vicente Mundim e ao Felipe César Gonçalves, pela contribuição direta na execução do trabalho;

À Larissa Fernandes Magalhães e Tais Meziara Wilson, pela grande ajuda durante todo o trabalho, sem a qual não conseguiria chegar até aqui;

Às residentes Ana Letícia Daher Aprígio e Nicolle Pereira Soares pelo auxílio na fase final do trabalho, se dispondo a me ajudar nas horas mais complicadas;

Aos meus amigos em especial Paula, Carol, Gabi, Rodrigo, Marcus Vinicius que compartilharam dos momentos bons e ruins e de alguma forma me ajudaram nesses dois anos de sufoco.

A todos vocês muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
PALAVRAS-CHAVE.....	ii
ABSTRACT.....	iii
KEYWORDS.....	lii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Epidemiologia.....	3
Leishmaniose visceral canina.....	6
Alterações hepáticas na leishmaniose.....	8
Diagnóstico da leishmaniose visceral canina.....	9
Profilaxia da leishmaniose visceral canina.....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
Animais.....	11
Avaliação clínica dos animais.....	11
Avaliação bioquímica dos animais.....	11
Necropsia.....	12
Análise histopatológica.....	12
Análise estatística.....	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

LESÕES HEPÁTICAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

RESUMO - O presente estudo objetivou descrever as alterações histopatológicas no fígado de cães com leishmaniose, avaliando o infiltrado inflamatório predominante, a carga parasitária e as alterações degenerativas, correlacionando-os com a sintomatologia clínica e alterações bioquímicas séricas. Foram utilizados 50 cães, sendo 17 negativos (grupo controle) e 33 sororreagentes para leishmaniose, classificados em assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos. A partir da coleta de 10 mL de sangue em tubos sem anticoagulante e do soro extraído, foram determinadas as concentrações de proteínas totais, albumina, ALT, fosfatase alcalina e GGT. Posteriormente os animais foram eutanasiados e fragmentos hepáticos foram coletados para análise histopatológica. A partir da avaliação histopatológica do tecido hepático, verificou-se que as principais alterações degenerativas observadas foram esteatose e degeneração turva, sem diferença entre os grupos de animais sintomáticos, assintomáticos e oligossintomáticos ($p \leq 0,05$). Não houve diferença na ocorrência de infiltrado inflamatório entre os três grupos, nem em relação ao número de células parasitadas. Com relação às alterações bioquímicas séricas, os três grupos apresentaram valores aumentados de GGT, proteínas totais e globulinas e diminuídos de albumina. Animais infectados naturalmente por *Leishmania* podem apresentar alterações inflamatórias e degenerativas no fígado sem, contudo, apresentarem sintomatologia clínica. Hipoproteinemia associada à hiperglobulinemia, além de um aumento nos níveis de GGT ocorrem tanto em animais sintomáticos como assintomáticos e oligossintomáticos.

Palavras-Chave: cão, fígado, *Leishmania*, lesões, proteínas séricas

LIVER INJURY IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS: HISTOPATHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS

SUMMARY - The present study describes the histopathological changes in liver of dogs with leishmaniasis, assessing the predominant inflammatory infiltrate, parasite load and the degenerative changes and correlate them with clinical symptoms and serum biochemical changes. A total of 50 dogs, 17 negative (control group) and 33 seropositive for leishmaniasis, classified as asymptomatic, oligosymptomatic or symptomatic. From the collection of 10 mL of blood in tubes without anticoagulant and the serum extracted, were determined the concentrations of total protein, albumin, ALT, alkaline phosphatase and GGT. Later the animals were euthanized and liver fragments were collected for histopathologic analysis. From the histopathological evaluation of liver tissue, it was found that the major degenerative changes were observed fatty degeneration and cellular edema, with no difference between groups of animals symptomatic, asymptomatic and oligosymptomatic ($p \leq 0.05$). There was no difference in incidence of inflammatory infiltrate between the three groups, nor in relation to the number of infected cells. Regarding the assessment of serum biochemical changes, all three groups showed increased values of GGT, total protein and globulin and decreased albumin. Animals naturally infected by *Leishmania* may have inflammatory and degenerative changes in the liver, but without presenting clinical symptoms. Hypoproteinemia associated with hyperglobulinemia, and increased levels of GGT in animals occur both symptomatic and asymptomatic and oligosymptomatic.

Keywords: dog, *Leishmania*, lesions, liver, serum proteins

I. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma enfermidade causada por um grupo de protozoários do gênero *Leishmania* que, segundo a Organização Mundial da Saúde (2012), pode ser dividida em quatro categorias principais dependendo dos sinais clínicos: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea, leishmaniose muco cutânea e leishmaniose difusa.

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica severa, causada pela espécie *Leishmania chagasi*, cujas manifestações clínicas relacionam-se com o tipo de resposta imunológica expressada pelo animal infectado (BRASIL, 2006). Essa doença, de distribuição mundial, apresenta um alto potencial zoonótico, com grande repercussão na saúde pública (MOREIRA et al., 2008; ALVES et al., 2010).

Os reservatórios da doença existem tanto em ambientes silvestres como urbanos, onde o cão é considerado a principal fonte de infecção na área urbana e sua enzootia tem precedido a ocorrência de casos humanos (BRASIL, 2006).

O quadro clínico não é previsível e está relacionado com a resposta imune do cão, sendo que alguns obtêm a cura clínica espontaneamente, enquanto outros evoluem até a morte em poucas semanas. Normalmente, os cães assintomáticos evoluem para cura clínica espontânea, apresentando uma resposta imune celular positiva (MICHALICK; GENARO, 2005).

Como a LVC pode causar infecções oportunistas advindas da imunossupressão e por esta doença apresentar sinais clínicos comuns a outras enfermidades, o diagnóstico preciso é de difícil obtenção. Por isso, a associação de testes moleculares, sorológicos e imunológicos é importante para confirmar a infecção do animal (SILVA, 2007; TRONCARELLI, et al., 2008).

O diagnóstico preciso é de essencial importância, já que a legislação brasileira não autoriza o tratamento de cães com LVC, sendo recomendada a eutanásia de todos os cães sororreagentes com títulos a partir de 1:40 na RIFI e/ou com exame parasitológico positivo (BRASIL, 2005).

O envolvimento hepático é descrito em cães infectados (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) e geralmente está associado à formação de granulomas nos sinusóides, intravasculares e na região centrolobular do parênquima hepático (GIUNCHETTI et al., 2008). Foram descritos ainda infiltrado portal

(macrófagos, linfócitos e plasmócitos) na cápsula hepática, raros polimorfonucleares, fagócitos exibindo parasitos intracitoplasmáticos e fibrose hepática em cães infectados (TAFURI et al., 1996, RALLIS et al., 2005, GIUNCHETTI et al., 2008, MELO et al., 2008).

A LVC é um excelente modelo para estudo da Leishmaniose Visceral Humana devido a história natural da doença ser similar no homem e cão (MORENO; ALVAR, 2002). Assim é importante avaliar a intensidade das alterações hepáticas e suas correlações para melhor entendimento da patologia da LV. Este estudo colaborará para verificar as correlações entre alterações histológicas e bioquímicas que ocorrem durante o progresso da doença.

Nesse contexto, o presente estudo objetivou descrever as alterações histopatológicas no fígado de cães com leishmaniose, avaliando o infiltrado inflamatório predominante, a carga parasitária e as alterações degenerativas, correlacionando-os com a sintomatologia clínica e alterações bioquímicas séricas.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A Leishmaniose é uma enfermidade zoonótica causada por protozoários tripanossomídeos do gênero *Leishmania*, que são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear e que segundo a Organização Mundial da Saúde (2012), pode ser dividida em quatro categorias principais dependendo dos sinais clínicos: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea, leishmaniose muco cutânea e leishmaniose difusa.

A Leishmaniose Visceral é uma das sete principais endemias mundiais e acomete de um a dois milhões de pessoas a cada ano. Esta doença ocorre em 47 países e possui como agente etiológico três espécies: *Leishmania donovani* na Índia e leste da África; *Leishmania infantum* na China, Ásia Central, Europa e África; *Leishmania chagasi*, América do Sul e Central (CAMARGO et al., 2007).

As modificações ambientais, consequentes do intenso processo migratório, por pressões econômicas ou sociais, o processo de urbanização crescente, o esvaziamento rural e as secas periódicas levam a expansão das regiões endêmicas e o surgimento de novos focos (BRASIL, 2006).

O Brasil registrou 59.129 casos de LV entre os anos de 1980 e 2005, sendo 82,5% na região Nordeste. Paulatinamente, esta parasitose se espalhou para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, sendo que em 2005 a incidência saltou para 44%, contrastando os dados obtidos em 1998 onde se registraram 15% dos casos nestas três regiões (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Pela Leishmaniose Visceral Canina ter elevadas taxas de letalidade e ter se expandido geograficamente para áreas urbanas ao longo dos últimos 25 anos ela vem se tornando um grave problema para a saúde pública (CARRANZA-TAMAYO et al., 2010).

Epidemiologia

Segundo Michalick e Genaro (2005), as espécies, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, são alguns dos agentes etiológicos causadores da Leishmaniose Visceral na Ásia, África e Europa, enquanto que a *Leishmania chagasi* é a responsável pela doença nas Américas. A infecção em humanos ocorre pela *Leishmania donovani*,

enquanto que a *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* são responsáveis por infectar tanto o homem quanto os cães.

Entretanto, recentes estudos genéticos concluíram que as espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* correspondem ao mesmo protozoário, continuando ambas as designações como sinônimas, no Velho e Novo Mundo (BANETH, 2006).

No Brasil, a *Leishmania chagasi* é a principal espécie causadora da LV, sendo frequentemente isolada em pacientes com esta doença, tanto em humanos, quanto em cães e outros reservatórios (BRASIL, 2006).

A *Leishmania* apresenta um ciclo de vida heteroxeno, isto é, precisa de dois hospedeiros, um invertebrado (inseto vetor) e o outro vertebrado, para completar o seu ciclo de vida. Por isso, uma fração do seu desenvolvimento acontece em um flebótomo do gênero *Lutzomyia* (hospedeiro invertebrado), o qual transmite o protozoário para o hospedeiro vertebrado (ROZE, 2005; TOMÁS; ROMÃO, 2008).

No Brasil, até o momento, existem duas espécies de flebótomos que transmitem a doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo que a primeira é considerada a principal transmissora da *Leishmania (Leishmania) chagasi* neste país, visto que se adapta ao peridomicílio e a diferentes temperaturas. Por outro lado, estudos recentes revelaram que no Mato Grosso do Sul o *L. cruzi* foi incriminado como vetor (BRASIL, 2006).

As fêmeas do vetor são as responsáveis pela transmissão da *Leishmania* spp., visto que, além de serem fitófagas como os machos, elas são hematófagas ingerindo sangue de variadas espécies a fim de obterem nutrientes necessários para o desenvolvimento dos seus ovos (ROSYPAL et al., 2003; AFONSO; ALVES - PIRES, 2008).

O hospedeiro vertebrado se infecta com as promastigotas, forma flagelada do protozoário, após a picada do vetor, as quais são fagocitadas, na epiderme, por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos. Após penetrarem nestas células, as promastigotas se diferenciam em amastigotas e se multiplicam até o rompimento dos macrófagos, liberando estas formas que serão novamente fagocitadas por outros macrófagos em um processo contínuo. Desta forma, há a disseminação hematogênica para linfonodos, fígado, baço e medula óssea, órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. O vetor se infecta ao picar o hospedeiro vertebrado

infectado e ingerir macrófagos com as formas amastigotas, as quais se diferenciam em promastigotas e se multiplicam no intestino do mosquito. As promastigotas viram paramastigotas e colonizam o esôfago e a faringe do vetor e assim, se diferenciam nas formas infectantes, as promastigotas metacíclicas (BRASIL, 2006).

Os flebótomos possuem uma atividade noturna e o seu deslocamento é realizado por meio de voos curtos e irregulares, que na maioria das vezes não ultrapassa 1 ou 2 km de distância do local de reprodução, exceto quando favorecidos pelo vento. Em países de clima temperado, como a Bacia do Mediterrâneo e a Ásia, tais vetores são ativos nos meses mais quentes, ou seja, entre a primavera e o final do outono, ao passo que em países de clima tropical, como a América Latina, certas espécies atuam durante todo o ano (BANETH, 2006).

Com o aumento da temperatura, o período de desenvolvimento do parasita no flebótomo é menor e o período de atividade dos insetos adultos, as gerações anuais e a densidade do vetor são maiores. Por isso, com o aumento da temperatura ambiental, o risco de transmissão do protozoário pelos insetos vetores, no futuro, poderá ter um maior risco (AFONSO; ALVES-PIRES, 2008).

De acordo com Bourdeau (2009), o protozoário *Leishmania* apresenta uma maior relação com o vetor do que com o hospedeiro vertebrado, uma vez que a competência do flebótomo parece estar ligada com a capacidade dos promastigotas se acoplarem especificamente a receptores, no intestino do inseto. Por isso, quando essas ligações não acontecem, os parasitas, após se replicarem, são excretados com as fezes do flebótomo (BANETH, 2006).

De outra forma, alguns cães positivos para leishmaniose e com sintomatologia típica da doença podem não ter formas amastigotas na pele (TAFURI et al., 2001), diminuindo sua participação como fonte de infecção para os flebótomos. O cão é a principal fonte de infecção nas áreas urbanas. A infecção destes tem sido mais prevalente do que no homem e na maioria dos casos precede os casos humanos (SILVA, 2008).

Em países do Sul da Europa, Médio Oriente, Ásia e Norte da África, o cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório doméstico e peridoméstico de *Leishmania infantum* e de *Leishmania chagasi* em países da América Central e do Sul. Entretanto, o reservatório da *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* não se

restringe à apenas o cão doméstico, mas também várias espécies de canídeos selvagens, como o lobo, o chacal e a raposa (PEREIRA, 2008). Além disso, o parasita *Leishmania* pode infectar naturalmente outras espécies como gato, marsupiais e roedores (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007).

Leishmaniose visceral canina

A variação de características clínicas da leishmaniose canina é grande por existirem vários mecanismos patogênicos do protozoário, por depender de como será a reação imunológica do hospedeiro e por acometer diferentes órgãos (SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2008).

No cão a evolução desta doença é lenta e seu início é de difícil reconhecimento, sendo variável de animal para animal o tempo de aparecimento dos sinais clínicos, podendo levar meses ou até muitos anos. Isso decorre de como atua a resposta imunológica do animal após o contato com o parasita, podendo este se tornar um portador assintomático, porém fonte de infecção, ou apresentar várias manifestações clínicas e evoluir para o óbito (TARTAROTTI et al., 2011)

Conforme estudo de sequenciamento genético realizado por Ferrer (2002) existem cães com certas mutações em genes específicos que os tornam mais resistentes a leishmaniose comparado aos animais que não as possuem, concluindo que a prevalência da infecção é maior do que se conhecia. Foi comprovado, em áreas endêmicas, que vários casos da doença surgem secundariamente a algum fator imunodepressivo, pelo fato deste alterar o tipo de resposta imunitária que o animal desenvolve, ocasionando equilíbrio entre hospedeiro e parasita, surgindo assim as manifestações clínicas da leishmaniose.

De acordo com Rey (2001), a formação de reações inflamatórias granulomatosas e a produção de complexos imunes circulantes são os mecanismos patogênicos que causam os sintomas e as lesões da leishmaniose.

Os sinais clínicos dos cães diagnosticados com leishmaniose canina são bastante diversificados podendo ser consequência da própria doença ou resultar de doenças concomitantes (BARBOSA, 2011). Segundo Barros (2011), os principais sintomas observados nos animais infectados, em ordem de frequência, são linfadenopatia, lesões alopecicas, esplenomegalia e hepatomegalia, mucosas

hipocoradas, anorexia, ulcerações cutâneas, seborréia seca e onicogribose. Além destas, já foram relatados a ocorrência de lesões oftálmicas (KOMNENOU; KOUTINAS, 2007), lesões do aparelho locomotor (ALEXANDRE-PIRES; CORREIA, 2008; KOHN, 2007), lesões cardíacas, problemas pulmonares, alterações na medula óssea, sintomas neurológicos (ALEXANDRE-PIRES; CORREIA, 2008), problemas gastrointestinais (NELSON; COUTO, 2003; ELLIOTT; LEFEBVRE, 2008) e problemas nos órgãos genitais masculinos (DINIZ et al., 2005; ROZE, 2005).

O sistema complemento é ativado a partir da inoculação de promastigotas na epiderme do animal. Além de beneficiar a ligação dos fatores do complemento à *Leishmania*, há formação de produtos de clivagem das proteínas do sistema complemento que direcionam os macrófagos para o local da infecção e induzem a expressão de receptores do complemento (CR) nessas células. A maior parte dos promastigotas é destruída, por este sistema, uma vez que promovem lise do parasita, por meio de lesões nas suas membranas celulares (SANTOS-GOMES et al., 2008). Porém, as formas parasitárias que ainda permanecerem serão fagocitadas pelas células imunitárias e assim atingirão as células hospedeiras (TOMÁS; ROMÃO, 2008).

Uma vez infectado por *Leishmania*, os cães podem se tornar clinicamente resistentes ou susceptíveis, já que nem todos os animais infectados desenvolvem a doença. Os animais que resistem à infecção, seja pela eliminação do parasita ou por sua restrição, permanecem assintomáticos. Por outro lado, os susceptíveis desenvolvem a infecção e apresentam sintomas, podendo ocorrer o controle espontâneo da infecção, seguido de uma possível sorologia negativa, ou evoluir para uma situação de doença crônica (MICHALICK e GENARO, 2005; BANETH, 2006).

Nos animais susceptíveis há a formação de complexos imunes circulantes advindos dos antígenos do gênero *Leishmania*, das imunoglobulinas IgG ou IgM e frações do complemento, especialmente C3. Isso é decorrente da intensa ativação de linfócitos B e da produção de anticorpos (CAMPILLO et al., 1999).

Alterações hepáticas na leishmaniose

A doença hepática e diversas alterações histopatológicas associadas têm sido descritas na LVC e doença visceral humana (MELO et al. 2008).

Na leishmaniose, semelhante a outras doenças causadas por parasitas intracelulares, a resposta imunológica celular é primordial na determinação da recuperação ou resistência às doenças (KAYE et al., 2004). No entanto, a eficácia antimicrobiana da resposta granulomatosa existente no fígado, parece não ser totalmente eficaz, dependendo de fatores determinantes do hospedeiro e dos agentes patogênicos (MURRAY, 2001).

No fígado de animais com LVC geralmente é encontrado infiltrado mononuclear (plasmo-histio-linfocitário) nos espaços porta e no interior dos lóbulos (TAFURI et al., 2001). Além de necrose hepatocelular multifocal, degeneração vacuolar e infiltração de macrófagos parasitados (SLAPPENDEL, 1988).

Um outro achado comum em fígado de cães com LV são os granulomas intralobulares, consistindo predominantemente de macrófagos parasitados ou não, células epitelióides, um pequeno número de linfócitos e raramente neutrófilos (TAFURI et al., 1996). Estudos realizados em camundongos BALB/c infectados por *Leishmania donovani*, mostraram que a formação de granuloma é órgão-específico (MURRAY, 2001) e nem sempre está associado com o controle da infecção (LEMOIS et al., 2000). Para alguns autores a infecção hepática é autolimitante e a resposta imune hepática é um bom exemplo de resposta inflamatória granulomatosa, predominada por células mononucleares envolvendo células de Kupffer, monócitos, células TCD4+ e TCD8+ (ENGWERDA et al., 2004).

Na análise laboratorial, podem ser observados aumento da alanina aminotransferase (DIAS et al., 2008), hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (FREITAS et al., 2012). Segundo Noli (1999), a hipoalbuminemia pode ser secundária ao comprometimento hepático, ocorrendo também devido à proteinúria ou desnutrição nos casos de animais nefropatas e/ou anoréxicos, sendo achados frequentes decorrentes da ativação policlonal de células B e da produção de anticorpos (COUTINHO, 2005).

Diagnóstico da leishmaniose visceral canina

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina é na maior parte das vezes um desafio para o Médico Veterinário, uma vez que além da doença apresentar uma

enorme variedade de sintomas, esta possui um grande número de cães infectados e que são assintomáticos (SILVA et al., 2006).

Nenhum teste diagnóstico sozinho, já disponível, apresenta 100% de sensibilidade e especificidade para esta enfermidade. Por isso, é importante o esclarecimento sobre o método utilizado, suas limitações e interpretação clínica, uma vez que segundo o Artigo 9º, do decreto nº51. 838, de 14 de março de 1963, todos os cães diagnosticados positivos para a leishmaniose, devem ser eutanasiados (NOGUEIRA et al., 2009; BRASIL, 1963).

Desta maneira, o diagnóstico final da leishmaniose requer a associação do histórico do animal, do exame físico, dos exames laboratoriais (hemograma, bioquímica, proteinograma, perfil de coagulação, urinálise) e das técnicas laboratoriais específicas para este parasita (SOLANO – GALLEGO; BANETH, 2008).

Os métodos de diagnóstico laboratoriais são divididos em três classes: parasitológicos (visualização do parasita), sorológicos (detecção de anticorpos anti-*Leishmania*) e moleculares (confirmação e amplificação do DNA da *Leishmania*) (FERRER, 1999; SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2008).

Atualmente, os métodos diagnósticos laboratoriais mais utilizados são os parasitológicos e os sorológicos, que incluem os testes de ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de imunofluorescência (RIFI). Essas técnicas sorológicas, por terem alta sensibilidade, são recomendadas pelo Ministério da Saúde para que possam ser feitos os inquéritos sorológicos (BRASIL, 2006).

Profilaxia da leishmaniose visceral canina

O Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento elaboraram portaria que proíbe em todo o Brasil, o tratamento de cães com leishmaniose. Essa se fundamentou no fato de não haver nenhum medicamento que assegure a cura parasitológica da doença nos cães. Existe também a problemática de que o cão continuará sendo reservatório, fonte de infecção da doença, além da possibilidade do microrganismo se tornar resistente aos fármacos disponíveis para o tratamento humano de leishmaniose (BRASIL, 2008). Em contrapartida, os humanos infectados pela *Leishmania* devem ser submetidos ao tratamento, uma vez que esta é potencialmente fatal (BANETH, 2006).

Apesar de existirem vacinas registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento contra a leishmaniose canina, estas não são recomendadas por não terem efetividade comprovada no controle da enfermidade ou proteção imunológica aos animais. Ademais, cães vacinados poderão reagir aos testes sorológicos e por isso considerados animais infectados (TARTAROTTI et al., 2011).

Uma das medidas mais importantes no controle da leishmaniose é o combate do inseto vetor, que pode ser feito por meio da pulverização de inseticidas nas casas; construção de armadilhas elétricas e plantação de vegetações desfavoráveis aos insetos vetores, como as buganvílias, o rícino ou o limonete (CAMPILLO et al., 1999; PEREIRA DA FONSECA; SANTOS-GOMES, 2008).

No quesito prevenção, o Médico Veterinário tem o papel de explicar para os donos dos cães as medidas que podem ser feitas contra os vetores, já que elas participam diretamente na diminuição da ocorrência desta doença e reduz a possibilidade de infecção do homem, visto que diminuirá a população de vetores (BARBOSA, 2011). Além disso, existem outras recomendações para reduzir a incidência da leishmaniose visceral canina, que são: monitoramento e vigilância dos animais, diagnóstico e tratamentos adequados para os humanos, eutanásia de cães positivos, modificação do ambiente e controle químico (TARTAROTTI et al., 2011).

III. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob o protocolo de registro CEUA/UFU 034/11.

Foram utilizados 50 cães de diferentes raças, sexos e idades, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Uberlândia – Minas Gerais, sendo 17 negativos (grupo controle) e 33 sororreagentes nos testes de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), conforme preconizado por Brasil (2006).

Avaliação clínica dos animais

Os animais foram submetidos a exame clínico completo segundo a Ficha Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. As alterações clínicas observadas foram registradas para tabulação de dados e posterior classificação dos animais, conforme a quantidade de sinais clínicos, em: assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos de acordo com Brasil (2006).

Avaliação bioquímica sérica

Após o exame clínico, foi colhido de cada cão aproximadamente 10 mL de sangue, por meio de punção venosa radial, em tubos sem anticoagulante. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório Clínico Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram processadas.

As amostras de sangue foram centrifugadas durante 5 (cinco) minutos a 720xg no soro extraído, foram determinadas as concentrações de proteínas totais (método biureto), albumina (método verde de bromocresol), alanina aminotransferase (método cinético UV IFCC), fosfatase alcalina (método cinético otimizado IFCC) e gamma-glutamilttransferase (método Szasz modificado), em analisador automático multicanal (ChemWell®), previamente calibrado com Calibra H e aferido com soro controle universal Qualitrol H. O calibrador, soro controle e kits comerciais utilizados foram fabricados pela Labtest Diagnóstica®. As concentrações de globulinas foram

calculadas pela diferença entre as proteínas totais e albumina. Os resultados foram confrontados com os valores de referência citados por KANEKO et al. (2008).

Necropsia

Após exame clínico e coleta de amostras, os animais foram eutanasiados segundo protocolo adotado no CCZ, ou seja, foram previamente contidos fisicamente e posteriormente anestesiados com cloridrato de cetamina 10 mg/kg e xilazina na dose de 1 mg/kg por via intramuscular. Após este procedimento foi administrado tiopental na dose de 12,5mg/kg por via intravenosa. Após a verificação de status anestésico profundo, com perda de consciência, reflexo muscular e de estímulos nocivos, foi administrado de 1 a 2 mmol/Kg de cloreto de potássio, com infusão rápida intravenosa ou intracardiaca. Após a eutanásia, os animais foram enviados ao Laboratório de Patologia Animal da UFU, sendo submetidos à necropsia.

A técnica foi realizada seguindo-se a sequência de inspeção de órgãos da Ficha de Necropsia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia. Em seguida os fígados foram avaliados e fragmentos coletados, sendo descritas as alterações macroscópicas observadas e registradas, por meio de fotografias, se necessário.

Análise histopatológica

Fragmentos hepáticos foram coletados para análise histológica e fixados em solução de formol tamponado a 10%.

Posteriormente, tais fragmentos foram incluídos em parafina, cortados em 5µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina para identificação das principais alterações morfológicas no fígado, segundo TOLOSA et al. (2003).

Por meio do microscópio óptico, objetiva de 40x, foi feita a avaliação histopatológica, em que se observou 20 campos por corte de tecido, nas regiões periportal, mediozonal e centrolobular.

As alterações hepáticas foram classificadas como degenerativas e/ou inflamatórias. Na presença de tais alterações a intensidade era classificada como: + (discreta), ++ (moderada) e +++ (acentuada).

Na caracterização do processo inflamatório, além da intensidade também era registrado o tipo de células inflamatórias presentes.

Para avaliação do grau parasitário adotou-se o seguinte procedimento: Tecido negativo: ausência de amastigotas (-). Tecido fracamente positivo (+), quando apenas alguns macrófagos foram visualizados com amastigotas, mas concentrados apenas em algumas áreas. Tecido moderadamente positivo (++), quando em torno de 50% do tecido estava comprometido com macrófagos infectados. Fortemente positivo (+++), quando a secção tecidual analisada encontrava-se quase que completamente comprometida, tanto pelas lesões, quanto pela presença dos macrófagos parasitados, de acordo com TASCA et al. (2009).

Análise estatística

A fim de estabelecer diferença entre os tipos de inflamação dentre os diferentes grupos de animais, foi aplicado o teste de Wilcoxon com nível de significância de 5%. Teste também aplicado a fim de verificar a existência de significância entre os parâmetros bioquímicos séricos nas situações de aumentado, diminuído e normal entre os três grupos de animais.

Para avaliar a frequência de degenerações, inflamação, granulomas e parasitismo entre os grupos, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado, com significância de 5% em uma prova bilateral.

Os valores médios dos parâmetros bioquímicos foram avaliados pelo teste de U de Mann-Whitney com significância de 5%.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, sete animais foram classificados como assintomáticos (22%), 13 oligossintomáticos (39%) e 13 como sintomáticos (39%). Os sinais clínicos mais frequentes foram: alopecia em membros e ponta de orelha (79%), hepatomegalia (73%), linfadenomegalia (60%) e onicogribose em 27% dos animais avaliados.

Carvalho (2009) estudando as manifestações clínicas de cães com LV em Campo Grande encontrou 27,7% de animais assintomáticos, 31,8% de oligossintomáticos e 40,5% de sintomáticos. Já Tasca et al. (2009) observaram 4,5% de cães assintomáticos, 54,5% de oligossintomáticos e 40,1% de cães sintomáticos.

Acredita-se que a doença evolui de um quadro normal, sem sinais clínicos, para um estado grave e terminal apresentado pelos animais sintomáticos. Diversos fatores podem estar relacionados com a forma clínica apresentada pelo cão. Muitos animais apresentam-se susceptíveis e desenvolvem uma doença ativa, enquanto outros se mostram resistentes à infecção e permanecem assintomáticos, além disso, o estado nutricional do animal pode influenciar diretamente no desenvolvimento da doença (NETO, 2008).

Barros (2011) também observou como principais sinais clínicos nos animais infectados, em ordem de frequência, a linfadenopatia, lesões alopécicas, esplenomegalia e hepatomegalia, sendo menos frequentes mucosas hipocoradas, anorexia, ulcerações cutâneas, seborréia seca e onicogribose.

Em relação às lesões alopécicas, que foi o sinal clínico mais frequente, Ciamarella et al. (1997) descreveram que tais lesões geralmente se iniciam na cabeça (especialmente orelhas e região dos olhos) e estendem-se para o restante do corpo. Segundo Hommel (1978), a alopecia estaria associada a ação direta da *Leishmania* spp. sobre o folículo piloso ou por distúrbios no metabolismo do ácido pantotênico causado por lesões hepáticas, ou ainda pela deposição de imunocomplexos na membrana basal da pele induzindo um processo auto-imune que desencadearia a alopecia.

A partir da avaliação histopatológica do tecido hepático, verificou-se que as principais alterações degenerativas observadas foram esteatose e degeneração turva (Tabela 1). Apesar da frequência destas alterações variar entre os grupos de animais classificados clinicamente como assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, não houve diferença estatística na ocorrência das degenerações ($p \geq 0,05$).

Tabela 1. Frequência de lesões hepáticas observadas em cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*, Uberlândia – MG, 2012.

Tipo de Lesão	Assintomáticos (n=7)	Oligossintomáticos (n=13)	Sintomáticos (n=13)
Esteatose	2 (28%) ^a	1 (7%) ^a	4 (31%) ^a
Degeneração Turva	2 (28%) ^a	9 (69%) ^a	4 (31%) ^a
Granulomas	5 (71%) ^a	9 (69%) ^a	10 (77%) ^a
Infiltrado Inflamatório	7 (100%) ^a	10 (77%) ^a	12 (92%) ^a
Parasitismo	1 (14%) ^a	3 (23%) ^a	5 (38%) ^a

* Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste de Qui-Quadrado ($p \geq 0,05$).

Pimentel et al. (2008) verificaram que esteatose, caracterizada pela consistência friável, cor amarelada do órgão e microscopicamente pela presença de gotículas de lipídeos no citoplasma dos hepatócitos ocorreu em 80% dos animais sororreagentes em Recife. Estes autores não agruparam os cães de acordo com a sintomatologia clínica, porém, no presente estudo, somente 31% dos animais sintomáticos apresentaram esteatose.

Laurenti (2010) cita que na leishmaniose visceral em humanos os hepatócitos apresentam esteatose de intensidade variada, além de escassas alterações regenerativas ou necrose de células isoladas. Este mesmo autor observa que em modelos experimentais, como hamsteres inoculados com formas amastigotas de *L. chagasi*, os aspectos histopatológicos são semelhantes aos padrões típicos observados na doença humana.

A degeneração gordurosa (Figura 1) pode ser associada à diminuição da produção de fosfolipídeos (VAZ et al., 2006) devido às quedas metabólicas das células em função da cronicidade da doença, da hiperplasia e hipertrofia das células do sistema

fagocítico mononuclear, além de alterações homeostáticas que ocorrem no órgão (BOGLIOLO, 2009).

A degeneração turva dos hepatócitos, observada nos três grupos de animais, também foi relatada por Molano et al. (2003) e Rallis et al. (2005) com incidência de 57,7%. No mesmo estudo, os referidos autores não encontraram correlação entre a degeneração e a carga parasitária ou o tipo de reação inflamatória no órgão, como observado no presente estudo. Porém, Kumar et al. (2005) explicam que a degeneração hidrópica pode ser causada pela redução do fluxo sanguíneo para o órgão, causada pelo infiltrado inflamatório periportal.

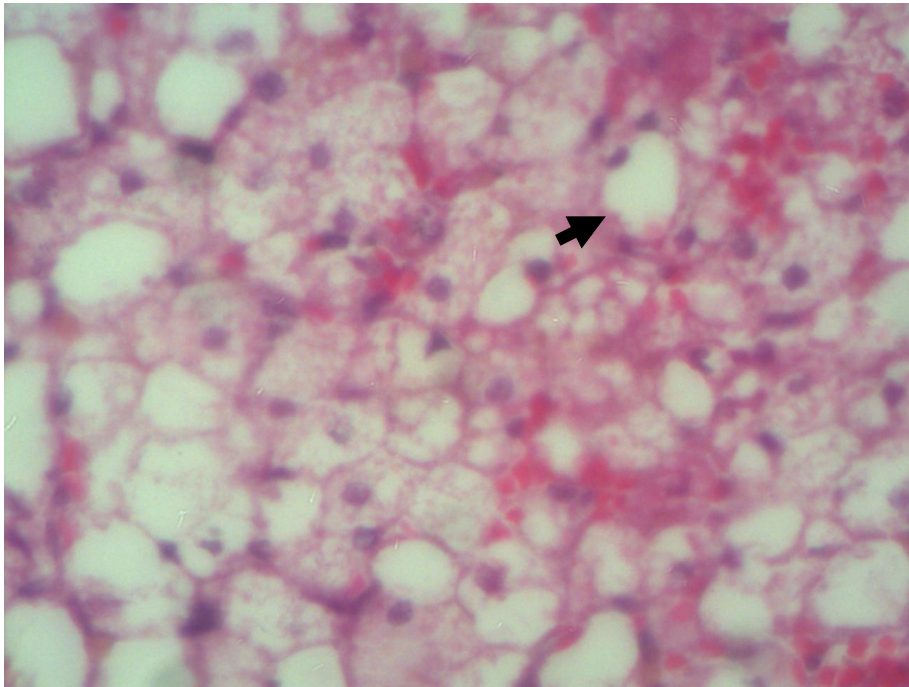


Figura 1. Vacúolos contendo gotículas de lipídeos no citoplasma de hepatócitos (seta) em cão naturalmente infectado por *Leishmania chagasi*, Uberlândia – MG, 2012. HE. 40x.

No fígado de cães dos três grupos analisados foi observada reação inflamatória crônica, caracterizada por infiltração de células mononucleares no espaço porta e parênquima hepático, juntamente com granulomas intralobulares (Figura 2). Embora seja claro que o processo inflamatório é estimulado pelo parasitismo, ele não é suficiente para erradicar a infecção (MARQUEZ; MARTINEZ, 2001).

No presente trabalho observou-se granulomas hepáticos nos cães, independente da apresentação clínica, sendo que não houve diferença estatística entre os grupos com relação à ocorrência de granulomas ($p \geq 0,05$).

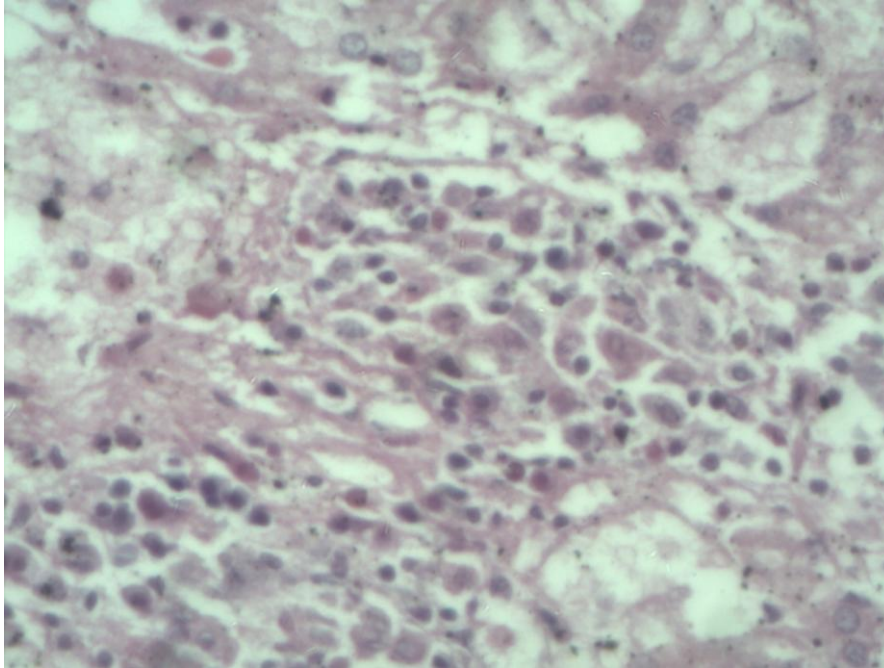


Figura 2. Granuloma intralobular em fígado de cão naturalmente infectado por *Leishmania chagasi*, Uberlândia – MG, 2012. HE. 40x.

Granulomas intralobulares também foram relatados por Tafuri et al. (2004) e Rallis et al. (2005) em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, sendo a gravidade das lesões determinada por variações individuais da resposta imunológica do indivíduo (GONZALEZ et al., 1988).

Os granulomas originam-se em resposta à presença de parasitos incorporados em macrófagos que se multiplicam em seu citoplasma, numa tentativa de controlar sua multiplicação. Isso resulta em estímulo da imunidade humoral e como consequência a infiltração linfoplasmocitária ao redor dos macrófagos infectados. Eventualmente os granulomas adquirem uma disposição concêntrica, com os macrófagos no centro e linfócitos e plasmócitos na periferia (CORBEIL et al., 1976).

De acordo com Murray (2001) um granuloma imunologicamente ativo é necessário para uma ação antimicrobiana efetiva. Para sua formação, requerem um

antígeno específico vindos de uma resposta imune mediada por células e se desenvolvem lentamente, podendo persistir por longos períodos e são mais propensos a estar presentes em infecções provocadas por patógenos intracelulares (McELRATH et al., 1988).

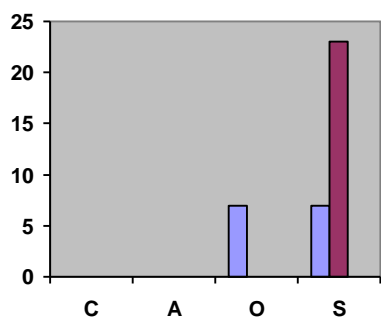
Na leishmaniose, semelhante a outras doenças causadas por parasitas intracelulares, as respostas imunes celulares são fundamentais na determinação da cura ou a resistência à doença, tanto em humanos quanto em murinos (KAYE et al., 2004). Na LVH, a presença de granuloma hepático parece estar correlacionada com o controle espontâneo e manutenção de um estado subclínico de infecção. O mesmo parece ocorrer em cães, como observado neste estudo onde cães assintomáticos também apresentaram granulomas hepáticos.

No entanto, a eficácia antimicrobiana da resposta granulomatosa é imprecisa e depende dos patógenos determinantes (MURRAY, 2001).

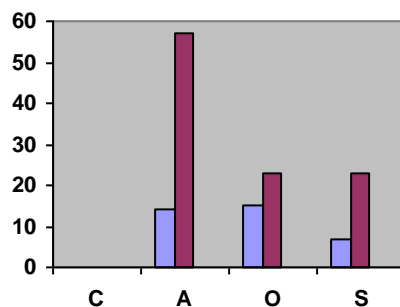
Não houve diferença na ocorrência de infiltrado inflamatório entre os três grupos. Porém, independente do tipo de inflamação os animais assintomáticos foram os que apresentaram com maior frequência processo inflamatório (100%), seguido dos sintomáticos com 92% (Tabela 1).

No grupo de animais assintomáticos o tipo de inflamação predominante foi o linfocitário com moderada intensidade (57%), assim como no grupo de oligossintomáticos (23%). Os animais sintomáticos apresentaram em igual proporção processo inflamatório linfocitário e histiocitário (23%), ambos de intensidade moderada (Figura 3). Porém não foi possível estabelecer um padrão dominante de infiltrado inflamatório em cada um dos três grupos avaliados pelo teste de Wilcoxon.

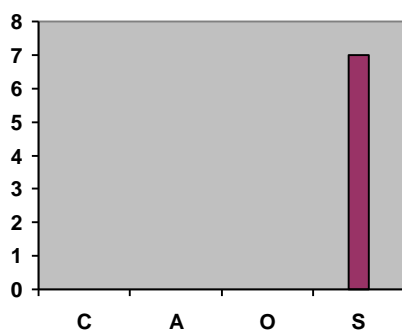
Histiocitário (%)



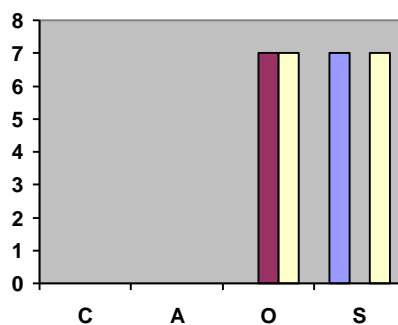
Linfocitário (%)



Plasmocitário (%)



Histioplasmocitário (%)



Linfoplasmocitária (%)

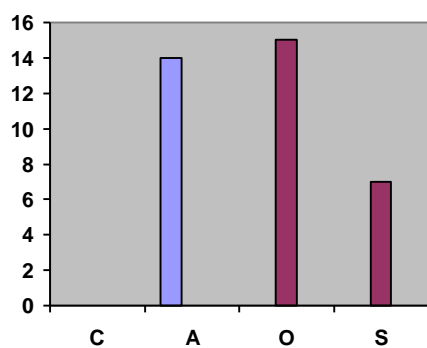


Figura 3. Distribuição dos tipos de infiltrado inflamatório de acordo com a sintomatologia clínica em cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*, Uberlândia – MG, 2012.

Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados ($p \geq 0,05$) pelo teste de teste de Wilcoxon. C= Controle; A = Assintomáticos; O = Oligossintomáticos; S = Sintomáticos. Roxo = intensidade discreta; Rosa = intensidade moderada; Amarelo = intensidade acentuada.

Os tipos de infiltrado inflamatório observados no presente estudo (Figura 4) são compatíveis com aqueles encontrados por Tafuri et al. (1996) e Rallis et al. (2005) que consideram as mesmas compatíveis com o quadro de hepatite crônica em cães com LVC, descrevendo infiltrado inflamatório no espaço porta, ocasionalmente penetrando no parênquima hepático, além de agregados linfoplasmocitários no parênquima do órgão.

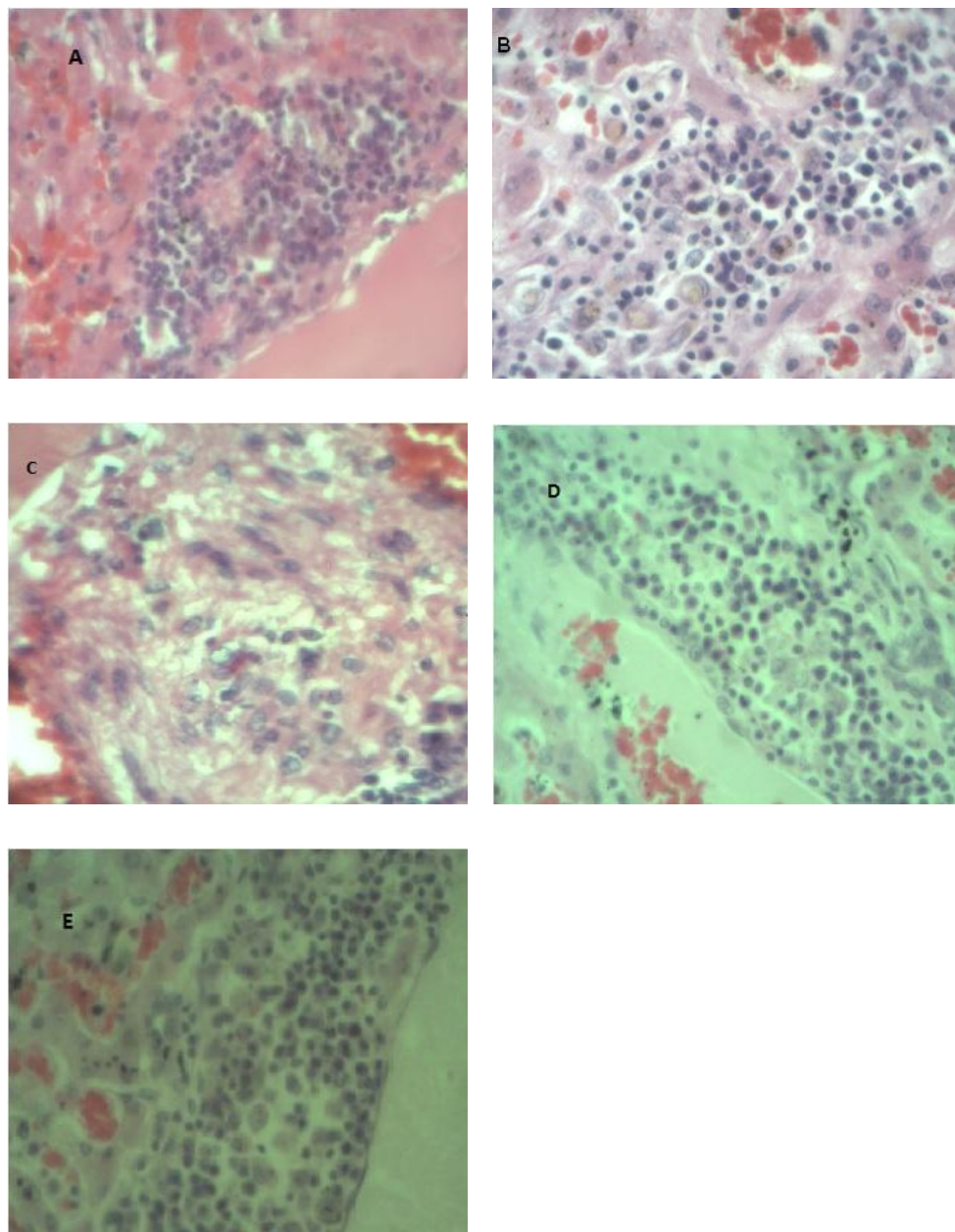


Figura 4. Infiltrado inflamatório linfocitário (A), linfoplasmocitário (B), histiocitário (C), plasmocitário (D) e histioplasmocitário (E) no fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*, Uberlândia – MG, 2012.

Rallis et al. (2005) sugerem uma progressão de mudanças hepáticas em cães com LV, sendo que no início da doença o fígado apresenta uma estrutura normal, com algum infiltrado inflamatório histiocítico e amastigotas na região dos sinusóides. Com o desenvolvimento da doença visualiza-se áreas de inflamação periportal moderada com populações de histiócitos, plasmócitos e linfócitos, com uma quantidade maior de granulomas e amastigotas. Já naqueles animais com o padrão severo da doença, observa-se hepatite linfoplasmocitária periportal, com poucos histiócitos e o infiltrado penetrando o parênquima hepático juntamente com degenerações mais evidentes.

Entretanto, no presente estudo os animais assintomáticos e oligossintomáticos apresentaram processo inflamatório predominantemente linfocítico periportal, de intensidade moderada, sem apresentarem padrão severo da doença clinicamente ou alterações bioquímicas séricas importantes, com exceção dos níveis de GGT acima dos valores de referência, como será discutido adiante. Na verdade a severidade das manifestações clínicas depende intrinsecamente do tipo de resposta imunológica expressada pelo indivíduo infectado.

Conforme a capacidade do indivíduo (homem ou cão) em montar uma defesa imunológica efetiva, a qual está relacionada a fatores ambientais, nutricionais, genéticos e ligados ao próprio parasita; induzindo preferencialmente resposta imune mediada por Th1 ou Th2, a LV poderá se apresentar sob amplo espectro, com formas: assintomáticas, oligossintomáticas e sintomáticas (MELO, 2004).

Estudos em cães têm mostrado que a geração de uma resposta imune protetora contra leishmaniose é mediada por células T (CABRAL, et al., 1992). Os macrófagos parasitados e outras células apresentadoras do antígeno apresentam antígenos de *Leishmania* aos linfócitos T do tipo CD4+. Estes linfócitos são estimulados a produzirem interleucinas, e dependendo do perfil estimulado ocorre o desenvolvimento de subpopulações de linfócito TH (T Helper) do tipo Th1, associado à produção de citocinas que são requeridas para a ativação de macrófagos e morte dos parasitas. Já no estímulo de linfócito tipo Th2 há produção de grande quantidade de IL-4 marcadores da presença de resposta humoral com produção de grande quantidade de anticorpos produzidos por linfócitos B (LIEW; O'DONNELL, 1992).

A LV é caracterizada pela grande produção de anticorpos, principalmente IgG. Entretanto como a ativação de LB é policlonal, a maioria das imunoglobulinas são inespecíficas. Os anticorpos específicos contra *Leishmania* são utilizados principalmente para o diagnóstico. No homem, bem como no cão, aspectos relacionados à imunidade não estão claramente definidos (MELO, 2004), assim como sua correlação com a manifestação clínica.

Dados demonstram que animais assintomáticos apresentam baixo parasitismo em diversos órgãos como pele, baço, fígado e linfonodos quando comparados ao grupo de animais sintomáticos (REIS et al., 2006b). No presente estudo observou-se maior número de células parasitadas nos animais sintomáticos, porém estatisticamente não houve diferença entre os grupos.

Giunchetti et al. (2008) encontraram uma frequência maior de parasitismo em cães sintomáticos, estabelecendo com isso uma possível relação entre a intensidade do parasitismo hepático e a evolução das manifestações clínicas da LVC. Sanchez et al. (2004) também relataram parasitismo hepático mais intenso em cães sintomáticos do que em assintomáticos, sugerindo que essa diferença poderia ser explicada por uma infecção diminuída ou um controle mais eficaz da replicação do parasita no grupo dos assintomáticos. Pinelli et al. (1995) propuseram que cães sintomáticos podem ser mais suscetíveis ou os assintomáticos mais resistentes à infecção por *L. infantum*.

Giunchetti et al. (2008) estabeleceram uma associação significativa entre parasitismo e reação inflamatória periportal, demonstrando que a presença do parasita parece ser suficiente para induzir uma reação inflamatória, embora tal reação não seja dependente da intensidade ou frequência de parasitismo.

No presente estudo esta relação não foi observada, pois animais que não apresentaram parasitismo exibiam processo inflamatório periportal. A simples presença do parasita no parênquima hepático é suficiente para iniciar eventos relacionados à inflamação granulomatosa e as alterações no tecido hepático simplesmente refletem a ativação do sistema imune. Porém El Hag et al. (1994) observaram que a reação inflamatória persiste mesmo depois do tratamento e erradicação do parasitismo. Sugere-se que junto com o parasitismo outros fatores estão envolvidos no processo inflamatório.

Com relação à avaliação das alterações bioquímicas séricas, não houve diferença nos níveis de proteínas e enzimas entre os três grupos avaliados (Tabela 2). Porém é possível perceber que os níveis médios de GGT, proteínas totais e globulinas estão aumentados em todos os grupos analisados e, os de albumina e a relação albumina globulina (A:G) estão diminuídos quando confrontados com valores de referência.

Tabela 2. Média e desvio padrão das enzimas e proteínas séricas avaliadoras da função hepática de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Uberlândia – MG, 2012.

Constituinte	Assintomático (n= 7)	Oligossintomático (n= 13)	Sintomático (n= 13)	Valor de Referência (KANEKO, 2008)
ALT (U/L)	50,14±18,13 ^a	39,76±18,51 ^a	54,15±40,73 ^a	0-102 U/L
GGT (U/L)	10,54±6,00 ^a	10,04±6,41 ^a	12,07±10,33 ^a	1,2-6,4 U/L
FA (U/L)	69,87±30,40 ^a	49,34±20,45 ^a	53,37±37,05 ^a	0-156 U/L
Proteínas totais (g/dL)	8,21±1,50 ^a	10,03±2,14 ^a	10,52±3,68 ^a	5,4-7,1 g/dL
Albumina (g/dL)	2,17 ±0,62 ^a	1,91±0,63 ^a	1,90±0,51 ^a	2,6-3,3 g/dL
Globulinas (g/dL)	6,04±1,64 ^a	8,11±2,58 ^a	8,61±3,85 ^a	2,7-4,4 g/dL
Relação A:G	0,38±0,16 ^a	0,27±0,18 ^a	0,28±0,17 ^a	0,59-1,11

*Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados ($p \geq 0,05$) pelo teste de teste de U de Mann-Whitney.

Giunchetti et al. (2008), ao comparar a relação A:G entre os grupos, observaram níveis mais baixos nos animais sintomáticos do que nos assintomáticos. Além disso, verificaram também que há uma correlação negativa entre tais níveis e a presença de granulomas intralobulares, fato não observado no presente estudo.

A inversão da relação A:G revela uma diminuição da concentração de albumina e aumento das frações de globulinas (KEENAN et al., 1984). Isso se dá devido ao aumento nos níveis de anticorpos anti-Leishmania, que está relacionado com a

sintomatologia da doença, havendo uma relação entre o agravamento dos sintomas e o aumento dos níveis de globulinas (REIS et al., 2006a; Freitas et al., 2012).

Tabela 3. Comportamento das enzimas e proteínas séricas avaliadoras da função hepática de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp no município de Uberlândia – MG, 2012.

Constituinte		Assintomáticos (n=7)	Oligossintomáticos (n=13)	Sintomáticos (n=13)
ALT	Aumentado	0	0	2(15,3%) ^a
	Diminuído	0	0	0
	Normal	7(100%) ^a	13 (100%) ^a	11 (84,7%) ^a
GGT	Aumentado	5(71,5%) ^{a*}	9(69,2%) ^a	8(61,5%) ^a
	Diminuído	0	0	0
	Normal	2(28,5%) ^a	4(30,8%) ^a	5(38,5%) ^a
FA	Aumentado	0	0	0
	Diminuído	0	0	0
	Normal	7(100%) ^a	13 (100%) ^a	13 (100%) ^a
PT	Aumentado	5(71,5%) ^a	12 (92,3%) ^a	11 (84,7%) ^a
	Diminuído	0	0	1(7,7%) ^a
	Normal	2(28,5%) ^a	1(7,7%) ^a	1(7,7%) ^a
Albumina	Aumentado	0	0	0
	Diminuído	5(71,5%) ^a	10 (76,9%) ^a	12 (92,3%) ^a
	Normal	2(28,5%) ^a	3(23,1%) ^a	1(7,7%) ^a
Globulinas	Aumentado	7(100%) ^a	12 (92,3%) ^a	11 (84,7%) ^a
	Diminuído	0	0	1(7,7%) ^a
	Normal	0	1(7,7%) ^a	1(7,7%) ^a
Relação A:G	Aumentado	0	0	0
	Diminuído	6(86%) ^a	12 (92,3%) ^a	12 (92,3%) ^a
	Normal	1(14%) ^a	1 (7,7%) ^a	1 (7,7%) ^a

Letras iguais na mesma linha e coluna indicam que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados ($p \geq 0,05$) pelo teste de teste de Wilcoxon.

Ao avaliar as diferenças de proporções de cada constituinte bioquímico sérico dentro e entre cada um dos grupos, não foi observada diferença significativa entre os achados bioquímicos séricos e a sintomatologia dos animais.

O aumento das globulinas foi observado em 100% de sintomáticos, 92,3 % oligossintomáticos e 84,7% de sintomáticos. Segundo Almeida et al. (2005), hipergamaglobulinemia é um achado característico em cães com LV.

Hipoalbuminemia foi observada em 71,5% de animais assintomáticos, 76,9% de animais oligossintomáticos e 92,3% de animais sintomáticos. Tal fato pode indicar uma redução da síntese de albumina pelo fígado infectado (BIZZETI et al., 1989), resultado de uma inflamação crônica (LISTE BURILLO et al., 1994), juntamente com uma absorção intestinal de proteínas prejudicada, além de uma excessiva proteinúria (BIZZETI et al., 1989).

Como a LVC é uma doença crônica esse aumento dos níveis de proteínas totais, ocasionado principalmente pela elevação das frações β e γ -globulinas, juntamente com a diminuição dos níveis de albumina pode ser observado (REIS, 2006a).

No presente estudo não houve aumento nos níveis de ALT e FA quando os três grupos foram comparados, corroborando com os estudos de Kiral et al. (2004) que ao analisarem a concentração desta enzima no soro sanguíneo detectaram valores moderadamente elevados, porém sem diferença significativa. Entretanto, Dias et al. (2008) encontraram valores aumentados de ALT em cães sintomáticos e esses valores foram diferentes dos outros grupos avaliados.

Dentre as enzimas hepáticas, a que apresentou aumento nos três grupos foi a GGT, que segundo Keller (1981) está presente no fígado, rim e pâncreas, sendo que sua elevação pode ser relacionada à falha hepatobiliar observada em animais com LCV (VALLADARES et al., 1997). A GGT e FA são consideradas enzimas de indução e, quando suas concentrações séricas apresentam-se elevadas simultaneamente, indicam colestase em cães (TRHALL et al., 2007; TENNANT; CENTER, 2008).

VI. CONCLUSÃO

Animais infectados naturalmente por *Leishmania* apresentam alterações inflamatórias e degenerativas no fígado sem, contudo, apresentarem sintomatologia clínica.

Animais assintomáticos e oligossintomáticos apresentam com maior frequência processo inflamatório linfocitário de moderada intensidade, enquanto animais sintomáticos apresentam processo inflamatório linfocitário e histiocitário. Vários fatores podem interferir na resposta inflamatória na leishmaniose além do parasitismo, necessitando de mais estudos, uma vez que neste trabalho não foi estabelecida relação entre parasitismo e frequência de processo inflamatório.

Em relação à análise bioquímica sérica, hipoalbuminemia associada à hiperglobulinemia, além de um aumento nas concentrações de GGT ocorrem tanto em animais sintomáticos como assintomáticos e oligossintomáticos. Porém não foi possível estabelecer relação entre as degenerações e o processo inflamatório de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi* e as alterações bioquímicas encontradas.

REFERÊNCIAS

AFONSO, M.O.; ALVES-PIRES, C. Bioecologia dos vectores. In: SANTOS GOMES, G.M.; PEREIRA DA FONSECA, I.M. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008, p. 27-40.

ALEXANDRE-PIRES, G.M.; CORREIA, J.J. Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In: SANTOS-GOMES, G.M.; PEREIRA DA FONSECA, I.M. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008, p. 53-68.

ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUSA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3/4, p.227-232, 2005.

ALVES, G.B.B.; PINHO, F.A.; SILVA, S.M.M.S.; CRUZ, M.S.P.; COSTA, F.A.L. Cardiac and pulmonary changes in symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, n.3, p.310-315, 2010.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006, p.685-695.

BARBOSA, S.D.N. **A leishmaniose canina e os condicionalismos determinados pelas respectivas alterações renais**. 2011. 139f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

BARROS, R.M. **Caracterização histopatológica da leishmaniose visceral canina no Distrito Federal**. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

BIZZETI, M.; DEGL'INNOCENTI, R.; LUBAS, G.; MANCIANTI, F.; PIZZINARI, S.; SAPONETTO, N. Diagnosi di laboratorio. In: PIZZIRANI, S. (Ed) **La Leishmaniosi Canina**, Pugnochiuso: SCIVAC, 1989. p.43-59.

BOGLIOLO, L. Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência à fibrose hepática leishmaniótica. **O Hospital**, v. 3, p.101–164, 1956.

BOURDEAU, P.J. Update on canine leishmaniosis: From infection to optimized Management, In: 23rd EUROPEAN CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, BLED, SLOVENIA, 2009, **Anais...**, Slovenia, 2009, p. 10-26.

BRASIL. Decreto nº 51.838, de 14 de março de 1963 - Baixa Normas Técnicas Especiais para o Combate às Leishmanioses. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 1963.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 5.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 320p.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 14 jul. 2008. Seção 1, p. 37.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs dogs. **Parasite Immunology**, v. 14, n. 5, p.531-539, 1992.

CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z. ; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, n. 71, p. 86-92, 2007.

CAMPILLO, M.C.; VAZQUEZ, F.A.R.; FERNANDEZ, A.R.M.; ACEDO, M.C.S.; RODRIGUEZ, S.H.; LOPEZ-COZAR, I.N.; BAÑOS, P.D.; ROMEROM, H.Q.; VARELA, M.C. **Parasitología veterinária**. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1999. 665p.

CARRANZA-TAMAYO, C.O.; CARVALHO, M.S.L.; BREDT, A.; BOFIL, M.I.R.; RODRIGUES, R.M.R.; SILVA, A.D.; CORTEX, M.F.C.; ROMERO, G.A.S. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.4, p.396-399, 2010.

CARVALHO, J.K.M.R. **Leishmaniose Visceral Canina: Aspectos clínicos e de diagnóstico**. 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

CIAMARELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v.141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CORBEIL, L.B.; WRIGHT-GEORGE, J.; SHIVELY, J.N.; DUNCAN, J.R.; LAMOTTE, G.B.; SCHULTZ, R.D. Canine visceral leishmaniasis with amiloidosis: an immunopathological case study. **Clinical immunology and Immunopathology**, v.6, n. 2, p.165-173, 1976.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus*

sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n.1-2, p. 149-155, 2005.

DIAS, E. L.; BATISTA, Z.S.; GUERRA, R.M.S.N. C.; CALABRESE, K.S.; LIMA, T.B.; ABREU-SILVA, A.L. Canine Visceral Leishmaniasis (Cvl): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil, **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 740-745, 2008.

DINIZ, S.A.; MELO, M.S.; BORGES, A.M.; BUENO, R.; REIS, B.P.; TAFURI, W.L.; NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania sp.* in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v.42, n. 5, p.650-658, 2005.

EL HAG, I.A., HASHIM, F.A., EL TOUM, I.A., HOMEIDA, M., EL CALIFA, M., EL HASSAN, A.M. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (kala-azar), **Journal of Clinical Pathology**, v.47, n. 6, p. 547–551, 1994.

ELLIOTT, D.; LEFEBVRE, H. Chronic renal disease: the importance of nutrition. In: PIBOT, P.; BOURGE, V.; ELLIOTT, D.A. **Encyclopedia of canine clinical nutrition**. New York: International Veterinary Information Service, 2008. p.267-282.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P.M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n.11, p. 524-530, 2004.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, 1999, **Anais...**, Spain, 1999, p. 6-10.

FERRER, L. **The pathology of canine leishmaniasis**. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain, 2002, **Anais...**, Spain, 2002, p.21-24.

FREITAS, J.C.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; LOPES NETO, B.E.; SANTOS, G.J.L.; ABREU, C.R.A.; BRAGA, R.R.; CAMPOS, R.M.; OLIVEIRA, L.F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.1, p.24-29, 2012.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis, **Research in Veterinary Science**, v.84, p.269-277, 2008.

GONZALEZ, J.L.; ROLLAN, E.; NOVOA, C.; CASTANO, M. Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. **Histology and Histopathology**, v.3, n. 4, p.323-329, 1988.

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

IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, n. 71, p.32-34, 2007.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. San Diego: Academic Press, 2008. 916p.

KAYE, P.M.; SVENSSON, M.; ATO, M. MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C.R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis, **Immunological Reviews**, v.201, p.43-53, 2004.

KELLER, P. Enzyme activities in the dog: tissue analyses, plasma values and intracellular distribution, **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 4, p. 575-582, 1981.

KEENAN, C.M., HENDRICKS, L.D., LIGHTNER, L., WEBSTER, H.K., JOHNSON, A.J., Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog-I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 1, p. 74–79, 1984.

KIRAL, F.K.; SEYREK, K.; PASA, S.; ERTABAKLAR, H.; ÜNSAL, C. Some haematological, biochemical and electrophoretic findings in dogs with visceral leishmaniasis. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.155, n.4, p.226-229, 2004.

KOHN, B. Canine immune-mediated polyarthritis. **European Journal of Companion Animal Practice**, v.17, n. 2, p.119-124. 2007.

KOMNENOU, A.; KOUTINAS, A.F. Ocular manifestations of some canine infectious and parasitic diseases commonly encountered in Mediterranean. **European Journal of Companion Animal Practice**, v.17, n. 3, p.1-9. 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO. Adaptação, dano e morte celular. In: Robbins & Cotran. **Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7ed. Saunders Elsevier, 2005, p.41.

LAURENTI, M.D., **Patologia e patogenia das leishmanioses**, 2010, 140f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Departamento de patologia da Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LEMOS de SOUZA, V.; SOUZA, J.A.; SILVA, T.M.C.; VERAS, P.S.T.; FREITAS, L.A.R. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological response in CBA. Mice. **Microbes and infection**, v. 2, n. 15, p. 1807-1815, 2000.

LIEW, F.Y.; O'DONNELL C. A., Immunology of *Leishmania*. **Advances in Parasitology**, v.32, n. 1, p.161-259, 1993.

LISTE BURILLO, F.L.; GASCON PEREZ, F.M.; PALACIO LIESA, J.; ACNA FABIAN, M.C.; Iron status and anemia in canine leishmaniasis. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.145, n.3, p.171-176, 1994.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J.M.; LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MARQUEZ, G.; MARTINEZ, A.C. Chemokines: the times are a changing, **Journal of Clinical Investigation**, v.107, n. 7, p.791-792, 2001.

McELRATH, M.J.; MURRAY, H.W.; COHN, Z.A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis, **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 6, p.1927-1937, 1988.

MELO, F; AMARAL, M.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.; ANDRADE, M.; MICHALICK, M.; RASO, F.; TAFURI, W.; TAFURI, W. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.79, n.2, p.198-204, 2008.

MELO, N.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, s/1, 2004.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Ed) **Parasitologia humana**. 11 ed., São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. p. 56-72.

MOLANO, I.; GARCIA ALONSO, M.; MIRON, C.; REDONDO, E.; REQUENA, J.M.; SOTO, M.; GOMEZ NIETO, C.; ALONSO, C. A *Leishmania infantum* multicomponent antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, n. 112, p.1-13, 2003.

MOREIRA, N.D.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B.M.; MALAQUIAS, L.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. AND REIS, A.B. Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunisation with two different vaccines against visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.128, n.4, p.418-424, 2008.

MORENO, J., ALVAR, J., Canine leishmaniasis: epidemiological risk and experimental model, **Trends in Parasitology**, v.18, n. 9, p.399–405, 2002.

MURRAY, H.W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis, **International Journal of Experimental Pathology**, v.82,n. 5, p.249-267, 2001.

NELSON, R.; COUTO, C. **Glomerulonephropathies. Small Animal Internal Medicine**. 3ed.Missouri: Mosby. 2003. p 600-607.

NETO, R.G.T. **Estudo das relações entre imunidade humoral e carga parasitária em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi***, 2008, 120f.(Dissertação em Ciências Biológicas), Universidade de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

NOGUEIRA, J.L.; SILVA, M.V.M.; PASSOS, C.C.; AMBRÓSIO, C.E.A. Importância da leishmaniose visceral canina para a Saúde Pública: uma zoonose reemergente. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.7, n 13, p.1-12, 2009.

NOLI, C. Leishmaniosis canine. **Waltham Focus**, v.9, n.2, p.16-24, 1999.

PEREIRA da FONSECA, I.M.; SANTOS-GOMES, G.M. Perspectivas futuras. In: SANTOS GOMES, G.M.; PEREIRA DA FONSECA, I.M. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008. p. 105-111.

PEREIRA, M.A.M. Epidemiologia da leishmaniose canina. In: SANTOS GOMES, G.M.; PEREIRA DA FONSECA, I.M. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008. p. 41-51.

PIMENTEL, D.S.; ALBUQUERQUE, E.R.C.; FAUSTINO, M.A.G.; MAIA, F.C.L.; RAMOS, R.A.N.; ALVES, L.C. Alterações estruturais hepáticas e esplênicas em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937), **Medicina Veterinária**, v.2, n.2, p.23-27, 2008.

PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.P.; RUTTEN, V.P.M.G.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. Leishmania Infantum – Specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, v.25, n.6, p.1594-1600, 1995.

RALLIS, T.; DAY, M.J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; PAPAZOGLU, L.; FYTIANOU, A.; KOUTINAS, A. F. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **Journal of Comparative Pathology**, v.132, n. 2/3, p.145-152, 2005.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J.C.; Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.81, n. 1, p.68-75, 2006a.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*, **Veterinary immunology and Immunopathology**, v.112, n. 3/4, p.303-311, 2006b.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. In: **O complexo *Leishmania donovani* e a leishmaniose visceral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3. ed. 2001. p. 253-266.

ROSYPAL, A.C.; ZAJAC, A.M.; LINDSAY, D.S. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.33, n. 4, p.921-937, 2003.

ROZE, M. Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. **European Journal of Companion Animal Practice**, v.15, n. 1, p.39-52. 2005.

SANCHEZ, M.A.; DIAS, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, J.F. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, n.6, p.618-624, 2004.

SANTOS-GOMES, G.M.; RODRIGUES, O.R.; MARQUES, C. Resposta imunológica. In: SANTOS GOMES, G.M.; PEREIRA DA FONSECA, I.M. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008. p. 69-82.

SILVA, E.S.; VAN DER MEIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; CONTIJO, C.M.F.; SCHALLIG, H.D.; BRAZIL, R.P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Veterinary Research Communications**, n.30, n. 6, p.637-643, 2006.

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

SILVA, M. V. M. Leishmaniose visceral canina. In: X Semana da Biologia e V Encontro Norte-mineiro de Biólogos, Unimontes, 2008, Montes Claros. **Anais...** Unimontes, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Canine leishmaniosis – a challenging zoonosis. **European Journal of Companion Animal Practice**, v.18, n. 3, p.232-241. 2008.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. **Veterinary Quarterly**, v. 10, n. 1, p.1-16, 1988

TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, A.J.F.; MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p.81-89, 1996.

TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.96, n.3, p. 203-212, 2001.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v.292, n. 1/2, p.17-23, 2004.

TARTAROTTI, A.L.; DONINI, M.A.; ANJOS, C.; RAMOS, R.R. **Vigilância de reservatórios caninos**, v.13, n.1, p.3-6, 2011.

TASCA, K.J.; BUZETTI, W.A.S.; TENORIO, M.S.; PAULAN, S.C.; LIMA, F.L.; QUEIROZ, N.M.G.P.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; NEVES, M.F.; NORONHA, A.C.F.; ASSIS, J. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2009.

TENNANT, B.C.; CENTER, S.A. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. San Diego: Academic Press, Cap. 13, 2008. p. 379-412.

TOLOSA, E. M. C., RODRIGUES, C. J., BEHMER, O. A., FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2 ed. Barueri: Editora Manole, 2003, 331p.

TOMÁS, A.; ROMÃO, S.F. Biologia do parasita. In: SANTOS GOMES, G.M.; PEREIRA DA FONSECA, I.M. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008. p. 7-26.

TRHALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G.; **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, São Paulo: Rocca, 2007. 582p.

TRONCARELLI, M.Z.; MACHADO, J.G.; CAMARGO, L.B.; HOFFMANN, J.L.; AMOSSI, L.; GRECA, H.; FACCIOLI, P.Y.; LANGONI, H. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e de tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n. 1, p. 39-46. 2008.

VALLADARES, J.E.; RIERA, C.; PASTOR, J. GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M.; ARBOIX, M. Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v.141, n. 21, p.574-575, 1997.

VAZ, J.S.; DEBONI, F.; AZEVEDO, M.J.; GROSS, J.L.; ZELMANOVITZ, T.; Fatty acids as biological markers of fat intake. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p.489-500, 2006.

WHO. **Strategic direction for leishmaniasis research**. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction/en/index.html> Acesso em 10 maio 2012.