



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MÁRCIA GABRIELLE RABELO MELO

ANÁLISE COMPARATIVA DO GRAU DE PARASITISMO DA MEDULA ÓSSEA E
LINFONODOS EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

SÃO LUÍS – MA

2016

MÁRCIA GABRIELLE RABELO MELO

**ANÁLISE COMPARATIVA DO GRAU DE PARASITISMO DA MEDULA ÓSSEA E
LINFONODOS EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Monografia apresentada ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^ª DSc. Ana Lúcia Abreu Silva

SÃO LUÍS – MA

2016

Melo, Márcia Gabrielle Rabelo.

Análise comparativa do grau de parasitismo da medula óssea e linfonodos em cães com leishmaniose visceral canina / Márcia Gabrielle Rabelo Melo. – São Luís, 2016.

38 f.

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientador: Profa. DSc. Ana Lúcia Abreu Silva.

1. Exame parasitológico. 2. Punção aspirativa. 3. Carga parasitária.

I. Título.

CDU 636.7:576.89

MÁRCIA GABRIELLE RABELO MELO

**ANÁLISE COMPARATIVA DO GRAU DE PARASITISMO DA MEDULA ÓSSEA E
LINFONODOS EM CÃES COM SOROLOGIA POSITIVA PARA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Ana Lúcia Abreu Silva
Orientadora

Profª. MSc. Alessandra Lima Rocha
1º Membro

MSc. Renata Mondêgo de Oliveira
2º Membro

À Deus que está sempre ao meu lado e a minha
família pelo o amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me ajudado e me dado forças para eu não desisti de alcançar o meu sonho de me tornar Médica Veterinária.

À minha família, especialmente aos meus pais Maria do Carmo Rabelo Melo e Raimundo Aquino Melo pelo amor, compreensão e paciência não só durante a fase final do curso, mas durante todos os momentos da minha vida.

À minha irmã Mônica Rafaelle Rabelo Melo Machado, pelo seu carinho e conselhos de encorajamento.

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Ana Lúcia Abreu Silva, por ter me auxiliado no desenvolvimento deste estudo.

Às minhas amigas Maria de Fátima, Clara Dayana e Thaliane França que viveram comigo durante cinco anos da graduação, pelo carinho, pela atenção e ajuda nos momentos difíceis.

Aos meus amigos Ilana Dandara, Gabriele Penha e Josias Bogéa, por estarem ao meu lado sempre me dando uma palavra de ânimo e conforto.

A todos do Laboratório de Anatomopatologia, pela contribuição no desenvolvimento deste estudo.

A todos que ajudaram de alguma forma para que este estudo fosse concluído.

“Não seja sábio aos seus próprios olhos;
tema o Senhor e evite o mal”. Provérbios 3:7

RESUMO

A leishmaniose visceral canina é uma doença crônica amplamente distribuída no Brasil causada por *Leishmania infantum chagasi*. O presente estudo teve como objetivo comparar o grau de parasitismo em diferentes pontos de coleta de medula óssea e linfonodos em animais positivos para leishmaniose. Foram utilizados 10 animais provenientes do atendimento do Hospital Veterinário “Francisco Edilberto Uchôa Lopes” da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA em São Luís – MA, positivos para leishmaniose visceral canina no teste rápido Alere Leishmaniose Ac Teste Kit. Foram realizadas punções da medula óssea (esterno, costela, tibia, crista ilíaca, tibia) e dos linfonodos poplíteo e cervical superficial para o exame parasitológico em lâmina. Todos os animais avaliados eram sintomáticos. Dentre os sinais clínicos a linfadenopatia foi o mais observado. Verificou-se que 70% foram positivos no exame parasitológico. Quanto ao local de punção da medula óssea, a tibia foi o que teve maior frequência e grau de parasitismo. Entre os linfonodos, o poplíteo apresentou o maior grau de parasitismo.

Palavras-chaves: Exame parasitológico, Punção aspirativa, Carga parasitária

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis is a chronic disease widely distributed in Brazil caused by *Leishmania infantum chagasi*. The aimed of this study was to compare the degree of parasitism at different points of collection of bone marrow and lymph nodes of 10 animals from the Veterinary Hospital “Francisco Edilberto Uchôa Lopes” of Universidade Estadual do Maranhão – UEMA in São Luís – MA that were positive for canine visceral leishmaniasis in the rapid test Alere Leishmaniose Ac Teste Kit. For malypis bone marrow (sternum, rib, tibia, iliac crest) and of the popliteal and cervical lymph nodes for the parasitological we collecteo for parasitological. All animals were symptomatic. Among the clinical signs, lymphadenopathy was the most observed. It was verified that 70% were positive in parasitological examination. Regarding the bone marrow regron collected was observed that tibia was that presented more frequency and parasite load. Among, the lymph nodes poplite presented more parasites.

Keywords: Parasitological examination, Aspiration puncture, Parasitic load

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de campos positivos na medula óssea e nos linfonodos..... 30

Tabela 2 - Grau de parasitismo de acordo com o número de sinais clínicos..... 32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Coleta de amostra na medula óssea da crista ilíaca	27
Figura 2 -	Coleta de amostra na medula óssea da tíbia	27
Figura 3 -	Animal com ceratoconjuntivite e despigmentação de focinho	28
Figura 4 -	Animal com alopecia	28
Figura 5 -	Citologia de linfonodo poplíteo com macrófago contendo formas amastigotas de <i>Leishmania</i> . Panótico, 100x	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Percentual de positividade da medula óssea e dos linfonodos para LVC **29**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Etiologia.....	15
2.2 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral.....	15
2.3 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	17
2.4 Ciclo Biológico.....	18
2.5 Patogenia e Sinais Clínicos.....	19
2.6 Diagnóstico.....	20
2.7 Tratamento.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Análise de Dados.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários digenéticos pertencentes ao gênero *Leishmania*. (LAINSON, 1978). Estimativas para essas doenças apontam uma prevalência de 14 milhões de casos em 98 países, entre os quais 79 são países em desenvolvimento, e aproximadamente 350 a 400 milhões de pessoas tem o risco de se infectarem. Anualmente ocorrem de 1,5 a 2,0 milhões de casos, e destes 1,0 a 1,5 milhões de pessoas são acometidas pelas formas tegumentares da doença e cerca de 500.000 pela forma visceral (WHO, 2010).

A leishmaniose visceral (LV) é considerada uma doença crônica grave, que possui caráter potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não é realizado o tratamento adequado (GONTIJO & MELO, 2004). No Brasil, essa doença é considerada um grave problema de saúde pública, que é causado pela espécie *Leishmania (L.) chagasi*, transmitida por insetos vetores, que afetam homens, animais domésticos e silvestres na maior parte das regiões brasileiras. A doença era predominantemente rural no território brasileiro, mas ultimamente vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte (BRASIL, 2014).

No espaço urbano, o cão é considerado um dos reservatórios mais importantes, devido à alta prevalência da leishmaniose visceral e, principalmente por apresentarem, alto grau de parasitismo cutâneo. Por isso, estes animais estão entre um dos alvos estratégicos de controle da doença (ALVES, 2006).

A manifestação clínica da leishmaniose visceral canina é muito ampla, podendo acometer órgãos de vários sistemas causando caquexia, alopecia, foliculite, eczema, secreção ocular, onicogribose, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia, entre outros. Entretanto, existem cães infectados que podem apresentar forma assintomática da doença e, por isso, serem potencialmente infecciosos para o vetor (WILSON et al., 2012)

O diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os inquéritos epidemiológicos realizados pela saúde pública. Isso se deve a variedade de sinais clínicos semelhantes às observadas em outras doenças, alterações histopatológicas inespecíficas e a falta de um teste para realizar o diagnóstico 100% específico e sensível (BRASIL, 2014).

Assim como no diagnóstico da leishmaniose em humanos, o diagnóstico da doença canina pode ser realizado tendo como base os sinais clínicos, pela observação direta do

parasito em punções aspirativas de órgãos linfoides, por provas sorológicas e por meio de métodos moleculares (reação em cadeia da polimerase- PCR) (GONTIJO & MELO, 2004).

Apesar dos exames sorológicos serem bastante aplicados na rotina das clínicas veterinárias no diagnóstico da LVC, o exame parasitológico direto ainda tem sido utilizado pelos veterinários como exame complementar a sorologia com o objetivo de confirmar a infecção para definição da conduta clínica (OLIVEIRA et al., 2011). Dessa forma, o presente trabalho tem como foco avaliar a variação do grau de parasitismo em diferentes pontos da medula óssea (esterno, crista ilíaca, costela e tibia) e dos linfonodos cervical superficial e poplíteo através da pesquisa direta do parasito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários do reino Protista, filo *Protozoa*, subfilo *Sarcomastigophora*, classe *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastia*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (URQUHART et al., 1998). Este gênero apresenta uma grande quantidade de espécies, entre as quais 22 são responsáveis por causar as formas cutâneas ou viscerais em seres humanos (ALVAR et al., 2004; DESJEUX, 2004).

No gênero *Leishmania*, os protozoários apresentam duas formas morfológicas distintas, amastigota e a promastigota. A forma amastigota é oval, com comprimento de 2,5 a 5µm, largura entre 1,5 a 2 µm, encontrada no interior do macrófago. Possui um cinetoplasto com forma de bastão que está associado a um flagelo rudimentar. A forma promastigota encontra-se no intestino do inseto e é caracterizada pela forma alongada, com núcleo único, um flagelo anterior e um cinetoplasto (URQUHART et al., 1998). Ambas as formas por divisão binária, em hospedeiros vertebrados e invertebrados, apesar de haver algumas evidências da possibilidade de troca de material genético sexual (LAWYER, 2008).

A LV é causada por três espécies que diferem de acordo com o continente: *Leishmania donovani*, na Ásia; *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África e *Leishmania chagasi*, nas Américas (MARZOCHI & MARZOCHI, 1997).

Existem alguns autores que consideram *L. infantum* e *L. chagasi* como espécies similares (MAURÍCIO et al., 2000). Entretanto, alguns estudos demonstram diferenças entre as espécies quanto à antigenicidade e estrutura molecular (LAINSON E RANGEL, 2005; SHAW, 2006).

2.2 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral ainda é considerada uma das doenças mais negligenciadas do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, sendo os pobres os mais afetados (WHO, 2010). Esta doença ainda é considerada um importante problema de saúde pública, devido a fatores de risco ambientais, como migrações maciças, urbanização, desmatamento, novos esquemas de irrigação), bem como fatores de risco individuais, como a co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), desnutrição, condições precárias de moradia, falta de saneamento básico, suscetibilidade genética, entre outros (DESJEUX, 2004).

A leishmaniose visceral está amplamente distribuída na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde recebe a denominação de leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neo-tropical. A doença já foi descrita em 12 países da América Latina, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil (BRASIL, 2014).

No Brasil a distribuição geográfica da LV passou por uma mudança significativa na década de 80, quando a doença deixou de ser restrita somente a áreas rurais da região Nordeste e avançou para outras regiões que não apresentavam casos da doença, chegando até a periferia de grandes centros urbanos (GONTIJO e MELO, 2004)

O processo de urbanização da LVA no Brasil ocorrido nas últimas décadas tem criado um ambiente favorável para a manutenção da doença devido a densa população de reservatórios, vetores e humanos, distribuídos na mesma área tropical o que facilita a transmissão (DINIZ et al., 2008). Além destes, outros fatores contribuem para este processo, como as mudanças ambientais e climáticas, redução de investimentos em saúde e educação, descontinuidade das ações de controle, adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem, fatores pouco estudados ligados aos vetores (variantes genéticas), e novos fatores imunossupressivos, tais como a infecção pelo HIV e dificuldades de controle da doença em grandes aglomerados urbanos, onde problemas de desnutrição, moradia e saneamento básico estão presentes (GONTIJO e MELO, 2004).

Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste (BRASIL, 2014). Entretanto, este quadro começou a mudar quando a LV se dispersou gradualmente para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste com um acréscimo de 15% dos casos em 1998 para 44% em 2005 (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Entre os anos de 1984 a 2004, a média anual de casos de LV no Brasil foi de 3.352 registros com uma incidência de 2 casos para cada 100.000 habitantes, apresentando uma tendência ao crescimento. A letalidade média neste mesmo período foi de 6,3%, entretanto observou-se aumento de 100%, passando de 3,6% em 1994 para 7,4 em 2004. (ELKHOURY, 2005)

Apesar da LV ocorrer em indivíduos de todas as faixas etárias, a maior frequência é observada em crianças de até 10 anos (59%), sendo 46% dos casos registrados em menores de 5 anos. E o gênero masculino é proporcionalmente o mais atingido (60,4%). (ELKHOURY, 2005)

De acordo com o Ministério da Saúde no ano de 2015 foram confirmados no Brasil 3.289 de LV. Dentre os estados do Nordeste, o Maranhão foi o que registrou maior número de casos, tendo 539 indivíduos com a doença. Nesse estado, observa-se que a

expansão da doença é predominantemente nas áreas periurbanas dos municípios localizados na Ilha de São Luís, que compreende São Luis, Paço do Lumiar, São José de Ribamar e Raposa (MENDES et al., 2002). Em São Luis, o Centro de Controle de Zoonoses notificou 597 casos humanos no período de 1998 a 2007 (BARBOSA, 2011).

2.3 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Nos últimos anos, vários estudos epidemiológicos têm sido realizados sobre a importância do cão como reservatório da LV no Brasil, com o objetivo de determinar a prevalência dessa doença em áreas endêmicas e não endêmicas (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; BORGES et al., 2014).

Nestes estudos epidemiológicos verificou-se que a maioria dos animais são assintomáticos. Dantas-Torres & Brandão-Filho (2006) observaram no estado de Pernambuco, que dos 130 cães soropositivos, 111 (85,4%) eram assintomáticos. Da mesma forma, Barbosa et al., (2010) verificaram no estado do Maranhão que na população de 67 cães positivos houve maior número de assintomáticos (58,2%). Esses animais assintomáticos também acabam sendo fonte de infecção para flebótomos. Apesar dos animais sintomáticos terem maior potencial para serem fontes de infecção para os vetores, pelo fato de em muitos casos, além de parasitismo disseminado em vários órgãos, também possuem uma alta carga parasitária na pele (SILVA et al., 2005).

Dantas-Torres & Brandão-Filho (2006) relatam que os cães preenchem os requisitos para serem reservatórios de *L. chagasi*, por serem altamente susceptíveis a infecção e principalmente pelo convívio com o homem. Além disso, a LVC precede o aparecimento de casos humanos e a sua prevalência é maior.

Borges et al., (2009) observaram que proprietários de cães possuem um risco 2,17 vezes maior de contrair LV, quando comparados a indivíduos que não possuem animal. Ao analisar o número de cães por residência, esta estimativa torna-se mais preocupante, pois verifica-se que moradores com um cão em suas residências possuem risco 1,87 vezes maior de contrair LV, enquanto proprietários de dois cães apresentam risco 3,36 vezes maior de contrair a doença, em comparação a pessoas que não têm animais.

Vários fatores de risco para a ocorrência de LVC têm sido descritos pela literatura. Segundo Villegas (2015) os fatores associados à LVC foram a renda da família (inferior a três salários mínimos), localização do município (próximo a vegetação), estrutura do domicílio, características do ambiente (quintal com árvores e vasos com plantas), além de

algumas características próprias dos cães (cães não castrados), estilo de vida (cães que dormem fora de casa) e aspectos da população canina (reposição de cães na residência após a eutanásia dos cães infectados).

Além disso, nas áreas que apresentam problemas de saneamento básico, proximidade com a mata e presença de animais silvestres pode haver altas taxas de casos de leishmaniose canina, devido ao ambiente propício para manutenção e disseminação da doença (BARBOSA et al., 2010).

Em relação à prevalência da LVC no Brasil, verifica-se através dos estudos que ela está disseminada nas regiões Nordeste (RN-32,5%), Centro-Oeste (MT- 22,1%) e Sudeste (MG-10,6%) (LIMA et al, 2012; ALMEIDA et al., 2012; BORGES et al., 2014), assim como ocorre na infecção humana.

No Maranhão, observa-se que os maiores casos de LV canina estão concentrados na Ilha de São Luis, sendo relatados casos em vários bairros tanto da zona rural como da zona urbana. Barbosa et al. (2010) encontraram a prevalência de 67% de animais positivos para *Leishmania spp* nos bairros Cajupiri, Cruzeiro de Santa Bárbara, Residencial José Reinaldo Tavares, Recanto Canaã e Cidade Operária, sendo que a maior parte dos casos foram encontrados na região rural.

2.4 Ciclo Biológico

O ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania* é realizado em um hospedeiro invertebrado, que é o responsável pela transmissão aos hospedeiros vertebrados, nos quais a forma parasitária é intracelular obrigatória (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

Os insetos flebotomíneos são considerados os vetores da leishmaniose visceral. No Brasil as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, estão relacionadas com a doença, sendo a primeira espécie considerada a principal na transmissão da *L. (L.) chagasi* no país (BRASIL, 2014).

As fêmeas da espécie *L. longipalpis* são consideradas hematófagas obrigatórias por necessitarem de sangue humano ou animal para a maturação de seus ovários. Quando estas sugam o sangue de mamíferos infectados acabam ingerindo macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. Em seguida ocorre o rompimento dos macrófagos no trato digestivo anterior, liberando essas formas que se reproduzem por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. Estas formas transformam-se em

paramastigotas, colonizam o esôfago e a faringe do vetor, permanecendo aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam nas formas infectantes, promastigotas metacíclicas (BRASIL, 2014).

Ao realizar novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, as fêmeas infectantes liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. Estas formas são fagocitadas na epiderme do hospedeiro por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo a liberação dessas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, causando a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL,2014).

2.5 Patogenia e Sinais Clínicos

Nos animais considerados suscetíveis, a disseminação do parasito ocorre nas primeiras horas pós-inoculação via hematogena ou linfática. Inicialmente os órgãos atingidos são a pele, linfonodos, baço e medula óssea, seguido do fígado e dos rins e, órgãos reprodutivos. Com a evolução da doença, os parasitos atingem a bexiga, sistemas respiratório e digestivo e novamente a pele. A presença do parasito nos órgãos e tecidos, associado à resposta imune do cão determinam reações que produzem lesões e sinais clínicos característicos da leishmaniose visceral canina (ALVAR et al., 2004).

Nos animais suscetíveis, as lesões são mais exuberantes, ao passo que naqueles denominados resistentes, as alterações patológicas podem ser discretas à macroscopia ou até mesmo imperceptíveis. A resistência a doença está ligada à ativação da resposta Th1 mediada por células (CD4+) e produção de interferon gama ($INF\gamma$), fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$), IL-2 e IL-12, que ativam os macrófagos. Os macrófagos ativados, por sua vez estimulam a imunidade celular pela ativação de outras células ou por sua proliferação e, dessa forma podem eliminar o parasito. Enquanto que a suscetibilidade está relacionada à doença progressiva e envolve a ativação da resposta Th2 com a expansão e proliferação de células B e produção de IL-4, IL-6 e IL-10 (LOPEZ et al., 1996; LUVIZOTTO, 2006).

Quando a infecção está associada à indução de linfócitos Th2, ocorre uma resposta muito elevada de imunoglobulinas, entretanto ela é deletéria e não protetora e, por isso desenvolve-se a infecção. Devido a essa resposta exacerbada do sistema imune, há formação de uma grande quantidade de imunocomplexos circulantes, que se depositam nas

paredes dos vasos sanguíneos e podem causar vasculite, uveíte, dermatite, poliartrite e glomerulonefrite (LOPEZ et al., 1996).

Na infecção natural estão ativados ambos os subtipos de células (Th1 e Th2) e a variedade de sinais clínicos e gravidade da doença dependem do equilíbrio entre estes dois sistemas (LUVIZOTTO, 2006).

A LVC geralmente se manifesta como uma doença crônica. Entretanto, existe uma forma de evolução aguda e grave, que leva o animal a óbito em poucas semanas. Existe ainda uma forma de evolução latente, com duração de cerca de dois anos, acompanhada ou não de sintomas, podendo evoluir para a cura espontânea (GENARO, 1993).

Segundo Alvar et. al. (2004), o período de incubação da doença é de difícil determinação, e devem ser levados em conta fatores individuais relacionados à reposta imune do cão, sendo que este período pode variar de três meses até vários anos. Em torno de 50% a 60% de todos os cães portadores de formas amastigotas não exibem qualquer sinal clínico da doença, e 20% destes animais possuem parasitos na pele. E cerca de 15% dos animais infectados tem a capacidade de se recuperar dos sinais clínicos e eliminar os parasitos espontaneamente.

Em geral a manifestação clínica da LVC é caracterizada por mucosas hipocoradas, emagrecimento, febre intermitente, linfadenopatia e lesões cutâneas, caracterizadas por alopecia, descamação, eczema e úlceras, que estão geralmente localizadas nas orelhas, focinho, cauda e articulações (WILSON et al., 2012).

Na fase mais avançada da doença observa-se esplenomegalia, alopecia generalizada, ulcerações mais acentuadas na pele, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia neuralgia, poliartrite, polimiosite, glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite túbulo-intersticial associadas à severa proteinúria, podendo levar à síndrome nefrótica e falência renal. E na fase final da infecção ocorrem paraparesia, caquexia, inanição e óbito do animal (WILSON et al., 2012; RIGO et al., 2013).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da LVC tem sido um problema para os serviços da saúde pública, principalmente pela falta de testes com alta sensibilidade e especificidade, de baixo custo e de fácil implantação e operacionalização na rotina dos serviços (BRASIL, 2014).

O diagnóstico clínico da LVC é bastante difícil, principalmente à grande quantidade de casos de animais assintomáticos, pois estes podem passar despercebidos,

mesmo quando são examinados por um especialista. Além disso, devido a diversidade de sinais clínicos, a doença pode ser confundida com outras patologias caninas, como hemoparasitoses, dermatopatias, desnutrição, entre outras (GENARO, 1993). Por isso, o diagnóstico laboratorial é necessário baseado no exame parasitológico ou sorológico. E na escolha do exame laboratorial a ser utilizado, é interessante que se conheça a área provável de transmissão, o método usado, suas limitações e sua interpretação clínica (BRASIL, 2014).

O exame parasitológico é baseado na presença do parasito através de material biológico oriundo de punções hepática, esplênica, de linfonodos, medula óssea e biópsia ou escarificação da pele (BRASIL, 2014). O material coletado é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas coradas por Giemsa, Leishman ou Panótico (LAURENTI, 2009).

A especificidade do diagnóstico parasitológico é de 100%, mas a sensibilidade depende do grau do parasitismo, do tipo de material biológico coletado, do seu processamento e coloração, além do observador (LAURENTI, 2009). A sensibilidade pode ser 60% a 75% nos aspirados de medula óssea e de 40% a 50% em linfonodos. Contudo, esta sensibilidade pode ter um aumento quando se faz o isolamento destes materiais em meio de cultura apropriado para o crescimento da *Leishmania spp* (ALVAR et al., 2004).

A detecção do parasito por meio do isolamento de promastigotas é realizado em meios de cultura como o NNN (Novy-McNeal-Nicole) e o Schneider (Schneider's Drosophila Medium), a partir dos aspirados ou fragmentos dos órgãos (GENARO, 1993). Este método possui limitações por ser laborioso, de alto custo, lento, além de necessitar de mão de obra altamente treinada e acompanhamento sistemático (LAURENTI, 2009).

O exame histopatológico de tecidos e órgãos também pode ser utilizado, mas deve-se destacar que as alterações histológicas não são específicas e que apenas a visualização das formas amastigotas promove o diagnóstico conclusivo (KONDO et al., 2009). Em comparação com este exame, a técnica de imunohistoquímica auxilia na identificação do parasito em cortes histológicos com maior sensibilidade e especificidade, devido à utilização de anticorpos específicos marcados que se ligam aos antígenos presentes nos cortes histológicos (XAVIER et al., 2006).

Outros métodos parasitológicos são a inoculação experimental em mamíferos susceptíveis, como o hamster (*Mesocricetus auratus*) e xenodiagnóstico, ambos extremamente trabalhosos e demorados, ficando restritos a centros de referência (ALVAR et al., 2004).

Em relação aos testes sorológicos, estes foram desenvolvidos com a intenção de evitar o uso de métodos invasivos e poderem ser realizados baseados na resposta humoral da LVC, que é geralmente muito intensa apresentando altos níveis de imunoglobulinas. Assim, vários métodos sorológicos foram desenvolvidos e são bastante usados para o diagnóstico canino (FARIA & ANDRADE, 2012)

No Brasil, para a realização dos inquéritos epidemiológicos da LVC os exames disponíveis para o diagnóstico sorológico são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), que expressam os níveis de anticorpos circulantes. Essas técnicas são recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliarem a soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários (BRASIL, 2014).

A RIFI utiliza o parasito íntegro como antígeno. Os seus resultados são normalmente expressos em diluições, sendo considerados como reagentes os animais que apresentarem títulos iguais ou superiores a 1:40 (LAURENTI, 2009). A sensibilidade desse teste varia de 83% a 100% e a especificidade é de aproximadamente 80% para amostras de soro. Apesar de ser amplamente utilizado em estudos epidemiológicos, sua aplicação requer alto nível de habilidade, experiência e também equipamento especializado e de alto custo (FARIA & ANDRADE, 2012).

O teste de ELISA é largamente empregado para triagem de amostras para o diagnóstico de LVC, podendo ser aplicado para grande quantidade de amostras em curto espaço de tempo e adaptado para o uso com diversos antígenos, como antígenos brutos, sintéticos ou recombinantes. Outro teste amplamente aplicado é a imunocromatografia, que se destaca por ser de fácil execução e pela rapidez de seus resultados, além de ter uma elevada especificidade. Por isso, este método torna-se uma opção viável de diagnóstico em regiões onde o acesso a laboratórios é restrito (FARIA & ANDRADE, 2012).

Apesar da disponibilidade de várias formas de diagnóstico, estas apresentam algumas limitações, como a baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos, a impossibilidade de distinção entre infecções anteriores ou recentes, no caso nos métodos imunológicos, além de serem inapropriados para avaliar a infecção em pacientes imunocomprometidos. Diversos autores começaram utilizar as técnicas de PCR, que tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade (CUPOLILLO, 2005).

No estudo realizado por Nunes et al., (2015) com 62 animais, a taxa de positividade por PCR foi maior em comparação a dos métodos sorológicos e parasitológicos. Além disso, identificou como positivos um maior número de animais assintomáticos em comparação aos testes ELISA e imunocromatográfico.

2.7 Tratamento

O tratamento da LVC ainda é controverso, uma vez que não evidências de cura parasitológica. Mas, ao se optar pelo tratamento deve-se inicialmente considerar parâmetros ligados à condição clínica do paciente e a participação consciente do proprietário (RIBEIRO, 2005). Uma vez que, o cão precisará tomar medicamentos por toda vida e ter o acompanhamento periódico de um médico veterinário para a realização de alguns exames laboratoriais para verificar a saúde do animal e a eficácia do tratamento (ARTACHO, 2009).

Os cães em tratamento devem passar por exames físicos e laboratoriais a cada três meses, como sorologia para determinação do título de anticorpos, bioquímica sérica, hemograma completo, proteinograma e pesquisa do parasito na pele, sendo este último exame importante para demonstrar a capacidade do animal na transmissão da doença (RIBEIRO, 2005).

Vários medicamentos são usados para a LVC, sendo capazes de melhoras temporariamente os sinais clínicos ou cães clinicamente, no entanto nenhum destes tratamentos elimina a infecção. Os tratamentos mais usados para leishmaniose canina são uma combinação de antimoniato de meglumina além de alopurinol, ou miltefosina mais alopurinol (MANNA et al., 2015).

Manna et al, (2015) utilizando dois protocolos de tratamentos, um com antimoniato de meglubina mais alopurinol e outro miltefosina mais alopurinol, obtiveram em ambas terapias melhoras clínicas significativas nos cães, com uma redução considerada da carga parasitária nos linfonodos dos cães de ambos os grupos após 3 meses de tratamento.

Nascimento (2015) observou que em 18 animais tratados com alopurinol e domperidona associados a vacina apresentaram melhora clínica e ausência de formas amastigotas na pele. De acordo com Artacho (2009), embora a eliminação dos parasitos da pele seja um fator importante no controle da transmissão para o vetor, deve-se levar em consideração que isso pode ter um caráter transitório, tendo em vista que o parasito é capaz de se alojar em determinados órgãos e, em situações de estresse, imunossupressão, entre outras, este pode multiplicar e se disseminar novamente. Portanto, a ausência de parasitismo não é garantida.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Comparar o grau de parasitismo em diferentes pontos de coleta de medula óssea e linfonodos poplíteo e cervical superficial.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar se há dispersão do parasito ao longo da medula óssea;
- ✓ Comparar o grau de parasitismo do linfonodo poplíteo com o linfonodo cervical superficial;
- ✓ Comparar o grau de parasitismo entre medula óssea e linfonodos;
- ✓ Verificar se a carga parasitária está associada aos sinais clínicos do animal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dez cães sem padrão racial definido, de ambos os sexos e sem faixa etária definida provenientes dos atendimentos do Hospital Veterinário “Francisco Edilberto Uchôa Lopes” da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, com resultado sorológico positivo para leishmaniose visceral canina pelo teste rápido Alere Leishmaniose Ac Teste Kit.

Os animais foram submetidos a uma avaliação clínica para análise dos sinais clínicos. Posteriormente foi realizado a sedação com cloridrato de xilazina 2% na dose de 1mg/kg e cetamina 10% na dose de 10mg/kg, por via intramuscular.

A coleta do material biológico foi realizada por meio de punção aspirativa na medula óssea do esterno, crista ilíaca (Figura 1), costela e tibia (Figura 2) e nos linfonodos cervical superficial e poplíteo. Foi utilizada agulha 40x12mm e seringa de 10 ml para punção da medula óssea e agulha 25x7mm e seringa de 3ml para punção dos linfonodos. Em seguida foi realizada eutanásia com uma dose extra de xilazina com cetamina, e logo após, realizou-se a administração da solução de cloreto de potássio por via intravenosa.

As amostras da medula óssea e dos linfonodos foram distendidas em lâminas, sendo que para cada local de punção foram confeccionadas duas lâminas, coradas pelo corante Panótico e visualizadas em microscópio ótico. Para pesquisa de formas amastigotas, foi feita a contagem de macrófagos em 10 campos diferentes, na objetiva de 100x. O grau de parasitismo foi classificado de acordo com a quantidade de campos positivos em leve (1 a 4), moderado (5 a 7) e alto (8 a 10).

Os proprietários de todos os animais utilizados nesse estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e foram previamente informados de todos os procedimentos realizados. Este trabalho Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Estadual do Maranhão (CEEAA/UEMA, protocolo 34/2016).

Figura 1. Coleta de amostra na medula óssea da crista ilíaca

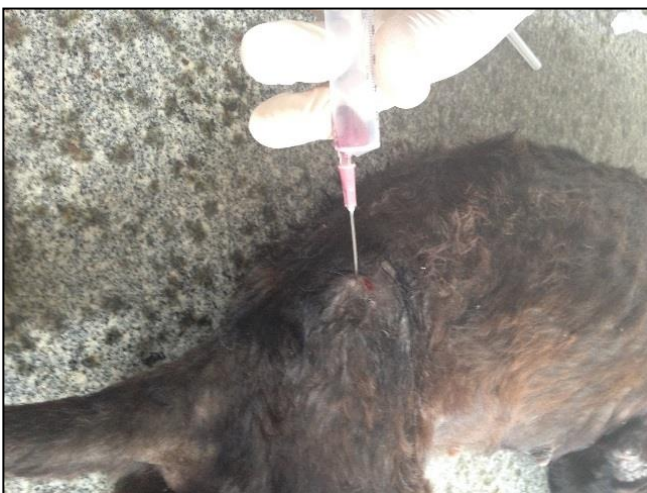


Figura 2. Coleta de amostra da medula óssea da tibia.



Fonte: Arquivo pessoal.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.1 Análise de Dados

Os dados obtidos foram tabulados no programa Microsoft Office Excel 2010, para posterior realização de análise estatística descritiva simples.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No exame clínico observou-se que todos os animais eram sintomáticos. Dentre os sinais clínicos mais observados, a linfadenopatia foi o mais frequente, acometendo 9 cães (90%). Resultados semelhante aos de Barbosa et al., (2010) que observaram que a

linfadenopatia estava presente em 96,4% dos cães. Outros sinais encontrados foram alopecia (80%), dermatite esfoliativa (70%), ceratoconjuntivite (60%), onicogribose (50%), caquexia (40%), despigmentação de lábio e focinho (20%), úlceras cutâneas e hiperqueratose (10%).

Figura 3. Animal com ceratoconjuntivite, despigmentação de focinho.



Fonte: Arquivo pessoal.

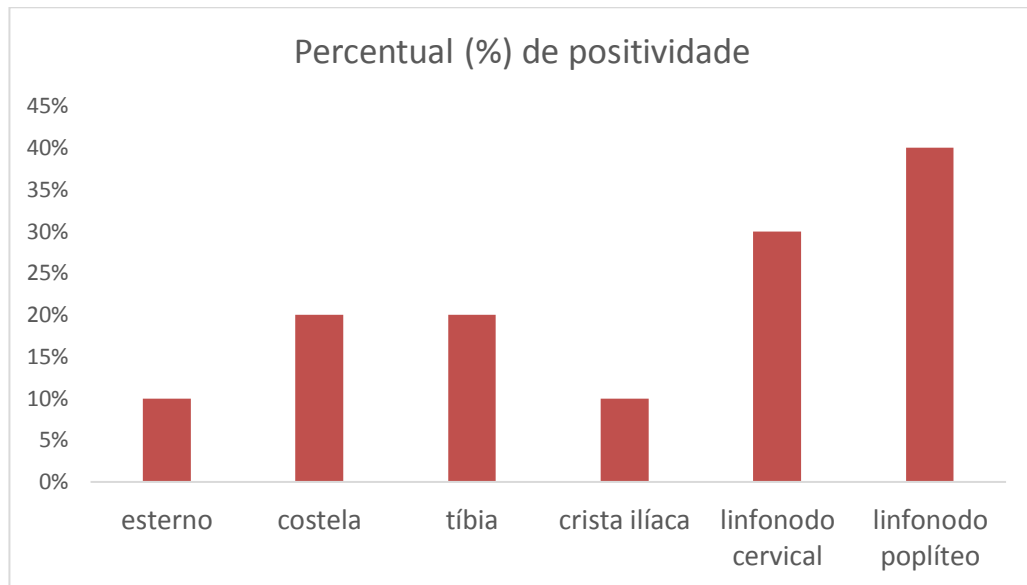
Figura 4. Animal com alopecia.



Fonte: Arquivo pessoal.

Verificou-se que dos 10 animais positivos no teste rápido imunocromatográfico para LVC, 7 (70%) foram positivos no exame parasitológico em lâmina por meio da punção aspirativa da medula óssea do esterno, costela, tibia e crista e dos linfonodos poplíteos e cervical, sendo que 3 (30%) foram positivos tanto na medula óssea como nos linfonodos. Além disso, observou-se que o linfonodo poplíteo apresentou a maior frequência de positividade (40%) em comparação com os outros locais de punção (gráfico 1). De maneira oposta do que foi encontrado no estudo realizado por Furtado et al., (2011), onde verificaram que a proporção de animais positivos na punção de medula óssea foi de 50% para crista ilíaca, 46,8% para tibia e 37,5% para o linfonodo poplíteo e cervical superficial.

Gráfico 1: Percentual de positividade da medula óssea e dos linfonodos para LVC.



Quanto ao grau de parasitismo da medula óssea, foi observado que houve dispersão do parasito em todos os locais de punção, sendo que a região da tíbia apresentou a maior contagem de campos positivos, seguida pelas regiões da costela, crista ilíaca e esterno. E apesar da região da crista ilíaca ter apresentado a maior média em relação ao grau de parasitismo, ocorreu apenas em um animal. Com isso pode-se observar que devido a disseminação do parasito pela medula óssea existe a possibilidade de o médico veterinário realizar a punção em outros locais que facilitem a coleta de uma grande quantidade de material, além de apresentar um valor elevado de parasitismo, como observou-se na medula óssea da tíbia.

De acordo com Reis et al., (2006) embora a progressão da doença assintomática até a sua manifestação clínica seja acompanhada por intenso parasitismo na medula óssea, observa-se que durante a infecção por *Leishmania* parasitismo pode ser diferente em vários locais do organismo

Em relação aos linfonodos, verificou-se que o linfonodo poplíteo apresentou alto grau de parasitismo tanto com relação ao número de campos positivos totais como à média comparado com o linfonodo cervical superficial. Este resultado justifica, porque este linfonodo tem sido utilizado com grande frequência no exame parasitológico da LVC. Mas, ao contrário desse estudo, Wilson et al, (2012) observaram baixo parasitismo no linfonodo poplíteo através do exame parasitológico em lâminas histológicas.

Através dos resultados obtidos observou-se que tanto na medula óssea como nos linfonodos foi possível verificar uma variação do grau de parasitismo com dispersão do parasito em todos os locais de punção. No animal 5 observou-se que em todos os 10 campos analisados do linfonodo poplíteo foram positivos sendo considerado um alto grau de parasitismo (figura 5). Também foi observado que no animal 8, a medula óssea da tíbia havia alto grau de parasitismo com 9 campos positivos. Nos outros animais verificou-se apenas grau de parasitismo de moderado (5 a 7 campos positivos) a leve (1 a 4 campos positivos) em todos os locais de punção. Além disso, apenas no animal 8 houve a presença do parasito na medula óssea da tíbia e da costela e nos linfonodos poplíteo e cervical superficial.

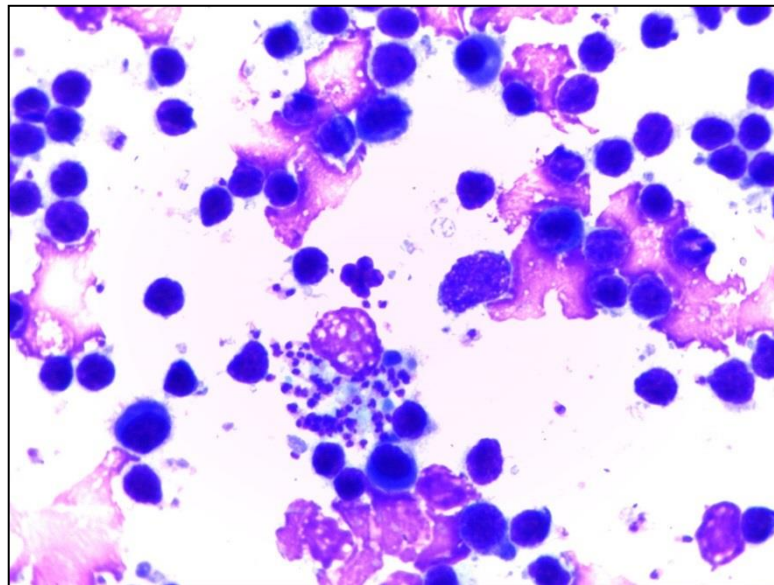
Tabela 1. Quantidade de campos positivos de acordo com o local de punção.

	Esterno	Costela	Tíbia	Crista ilíaca	Linfonodo poplíteo	Linfonodo cervical
Animal 1	1	–	–	–	1	–
Animal 2	–	–	–	–	–	–
Animal 3	–	–	–	–	–	–
Animal 4	–	–	–	7	–	–
Animal 5	–	–	–	–	10	–
Animal 6	–	–	1	–	–	3
Animal 7	–	–	–	–	–	–
Animal 8	–	6	9	–	3	1
Animal 9	–	–	–	–	3	1
Animal 10	–	1	–	–	–	–
Total	1	7	10	7	17	5
Média	1	3,5	5	7	4,25	1,6

Quando o grau de parasitismo é intenso como foi observado no linfonodo poplíteo e na tíbia, não há problemas para um diagnóstico rápido e seguro. No entanto, o estado imunológico do animal e a fase da doença podem interferir na carga parasitária, dificultando localizar as formas amastigotas (FURTADO et al., 2011).

Existe uma correlação entre o estado clínico da LVC com o grau de parasitismo tecidual. Os animais assintomáticos apresentam baixo parasitismo enquanto que os animais sintomáticos estão associados com alta carga parasitária em vários tecidos, como pele, medula óssea e baço (REIS et al., 2006). Essa variação se explica pelo fato dos animais assintomáticos apresentarem uma resposta imune mais efetiva permitindo o controle da replicação do parasitismo (CARDOSO, 2013).

Figura 5. Citologia de linfonodo poplíteo com macrófago contendo formas amastigotas de *Leishmania*. Panótico, 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Embora a pesquisa do parasito nos tecidos seja considerada como método de diagnóstico, sua sensibilidade e valor relativo têm sido questionáveis, considerando a falta de uniformidade na distribuição parasitária durante a infecção natural como foi observado nesse estudo, por isso se faz necessário a identificação dos principais locais com níveis mais elevados de parasitismo, para melhorar a sensibilidade do diagnóstico da LVC (REIS et al., 2006).

Neste estudo, apesar dos animais positivos no exame parasitológico apresentarem uma variedade de sinais clínicos, observou-se que houve uma grande variação da carga parasitária entre os animais como foi observado no animal 8, que apesar de ter apresentado maior dispersão do parasito com grau de parasitismo de leve a moderado, teve menos sinais clínicos do que o animal 6 que demonstrava mais sinais, mas apresentou apenas leve grau de parasitismo na costela e no linfonodo cervical (Tabela 2). Diante disso, podemos supor que isso foi devido a uma variação individual ligada a resposta imune, falta de uniformidade da

carga parasitária no organismo do animal e baixa sensibilidade do exame parasitológico utilizado.

Tabela 2. Grau de parasitismo de acordo com o número de sinais clínicos.

Animais	Medula óssea			Linfonodos			Nº de sinais clínicos
	Esterno	Costela	Crista ilíaca	Tíbia	Poplíteo	Cervical superficial	
1	+	-	-	-	+	-	4
2	-	-	-	-	-	-	4
3	-	-	-	-	-	-	8
4	-	-	++	-	-	-	7
5	-	-	-	-	+++	-	5
6	-	-	-	+	-	+	9
7	-	-	-	-	-	-	2
8	-	++	-	+++	+	+	4
9	-	-	-	-	+	+	4
10	-	+	-	-	-	-	4

Grau de parasitismo: Leve (+), Moderado (++), Alto (+++) e Ausente (-)

6. CONCLUSÃO

A medula óssea apresentou dispersão de parasitos, sendo que na tíbia foi o local que se observou maior grau de parasitismo.

O linfonodo poplíteo apresentou maior grau de parasitismo em comparação com o linfonodo cervical superficial.

Existe diferença no grau de parasitismo dependendo do ponto de coleta, tanto para linfonodo como para medula óssea;

Não foi possível correlacionar a carga parasitária com os sinais clínicos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. et al. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.4, p.359-365, 2012

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C; MOLINA R; MORENO NIETO J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitology**. 2004;57:1-88

ALVES, W. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p.94-98.

ARTACHO, N. S., **A leishmaniose no Brasil e o conflito ideológico: eutanásia ou tratamento?** 2009. 57f. Monografia. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2009

BARBOSA, D. S. et al. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas a leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.3, p.653-659, 2010

BARBOSA, D. S., **Distribuição espacial e definição de áreas prioritárias para vigilância da leishmaniose visceral no município de São Luís, Maranhão, Brasil**. 2011. 103f. Dissertação. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011

BORGES, B. K. A. et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v61, n.5, p.1035-1043, 2009

BORGES, L. F. N. M. et al. Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.44, n.2, p. 352-357,2014

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, 2014

CUPOLILLO, E. Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p. 58-62

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, n. 48, v. 3, p. 151-156, 2006

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp.Immunol. Microbiol. Infect.** v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004

DINIZ, S. A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban áreas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2,n. 1, p. 24-33, 2008

ELKHOURY, A. N. S. M. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p. 24-26

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** 2012; 3(2):47-57

FURTADO, M.V.L., VIOL, M. A. e BABO-TERRA, V.J. Pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp. em linfonodos, medula óssea, baço, pele e sangue de cães naturalmente infectados. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 30, Ed. 177, Art. 1198, 2011

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. Belo Horizonte. 1993. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais.

GONTIJO, C. M. F & MELO M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo 2004, 7(3):338-349

KONDO, K. R. J et al. Análise histomorfométrica da matriz extracelular do linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 29(8):610-616, agosto 2009

LAINSON R, SHAW J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**. 1978 Jun;273(5664):595-600

LAINSON R, RANGEL E, F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2005;100(8):811-27

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, 67, 3-23, 2009

LIMA, I. D. et al. *Leishmania infantum chagasi* in northeast Brazil: 77 asymptomatic infection at the urban perimeter. **Tropical Medicine**, v.86, n.1, p. 99-107, 2012

LOPEZ, R. et al. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Medicine**, 43: 469-474, 1996.

LUVIZOTTO, M.C.R. Alterações patológicas em cães naturalmente infectados. In: 10 FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral canina 2006. p. 15-22.

MAIA-ELKHOURY A. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública** 2008, 24(12): 2941-2947

MANNA, L. et al. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites & Vectors** (2015) 8:289

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmanioses em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 1997; 30:162-4

MAURÍCIO IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**. 2000;16:188-9

MENDES, W. S. et al. Expansão espacial da Leishmaniose visceral Americana em São Luís do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2002; 35:227-231

MINISTÉRIO DA SAÚDE.
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Casos.pdf>
Acesso em 10/10/2016

NASCIMENTO, G. G. **Avaliação da carga parasitária em cães com infecção natural *leishmania (leishmania) infantum chagasi*, submetidos a tratamento experimental.** Dissertação. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2015

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

REIS A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research Veterinary Science** 2006; 81(1):68-75.

RIBEIRO, V. M. Tratamento da LV canina e seu impacto na incidência de LV humana e na prevalência da LV em cães. Uma experiência em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p. 104-107

RIGO R. S. et al. Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 2013; 55(2):113-116

SILVA, A. V. M. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 21(1):324-328, jan-fev, 2005

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 46-51, jul.-set. 2009

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p.190-192

VILLEGAS, T. J. **Fatores de risco de leishmaniose visceral em cães no município de Panorama, Estado de São Paulo, SP, Brasil**. Dissertação, Universidade de São Paulo, 2015

XAVIER, S. C. et al. Comparison of paraffin – embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 17, p. 1-7, 2006

WILSON, T. M. et al. Alterações macroscópicas em cães sororreagentes para *Leishmania chagasi* e sua correlação com teste parasitológico. **Veterinária Notícias**, Urbelândia, v.18. n.2, p. 20-25, 2012

WHO. **Control of the Leishmaniases**. WHO Technical Report Series; no949, 2010. Disponível em:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em:
10/10/2016

