

Gustavo de Oliveira Fulgêncio

**PREVALÊNCIA DE OFTALMOPATIAS EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania)*
chagasi NO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE – ESTUDO
CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Clínica e Cirurgia

Orientador: Prof. Fernando Antônio Bretas Viana

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2006

F963p Fulgêncio, Gustavo de Oliveira, 1976-
Prevalência de oftalmopatias em cães naturalmente infectados com
Leishmania (Leishmania) chagasi no município de Belo Horizonte-MG, Brasil –
Estudo clínico e histopatológico (2005-2006) / Gustavo de Oliveira Fulgêncio. –
2006
48 p. : il.

Orientador: Fernando Antônio Bretas Viana
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. leishmaniose visceral – Teses. 3. Oftalmologia
veterinária – teses I. Viana, Fernando Antônio Bretas. II. Universidade Federal
de Minas Gerais. III. Título.

CDD – 636.089 77

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de viver e sonhar;

Agradeço especialmente ao meu pai, Leonardo Fulgêncio, pelo exemplo de caráter, organização, disciplina e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida;

À minha mãe, Célia Maria de Oliveira Fulgêncio, pela perseverança, dedicação, obstinação e superação. Foi ela quem me ensinou a olhar além das montanhas de Minas;

Aos meus irmãos Leonardo Fulgêncio Junior e Rodrigo de Oliveira Fulgêncio, pela paciência, apoio e companheirismo;

Ao professor e orientador Fernando Antônio Bretas Viana, pelos anos de convivência e aprendizado, pela paciência, bom humor, ricos ensinamentos em oftalmologia e na arte de viver;

À Professora Marilene Suzan Marques Michalick, pelos valiosos ensinamentos em parasitologia, por acolher-me nos momentos difíceis e me guiar com experiência e destreza sobre o caminho das pedras;

Ao Professor Renato Lima dos Santos, pelos materiais cedidos e ensinamentos em patologia e histopatologia;

À Professora Maristela Silveira Palhares, pelo apoio e incentivo no início do projeto;

Aos Professores Paulo Sérgio de Moraes Barros e Maria Norma Melo por aceitarem participar da banca de defesa e pelas ricas contribuições na revisão da dissertação;

Às meninas da patologia (Fabiana, Patrícia, Aline, Jankerle e Sílvia) sempre atenciosas e prestativas;

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, meu berço, e aos queridos Professores;

À Universidade Presidente Antônio Carlos, Campus Bom Despacho - MG, pela oportunidade de trabalho e aprendizado contínuo;

Aos meus amigos e amigas, por estarem sempre próximos nos momentos felizes e difíceis da minha vida;

Aos proprietários dos cães que permitiram a participação de seus animais neste experimento;

Por fim, aos cães, que com o seu sofrimento contraíram a leishmaniose visceral e contribuíram para um maior aprendizado acerca da sintomatologia clínica e oftalmológica desta doença.

ESFORÇO E TALENTO

“Não há superioridade sem estas duas qualidades. Havendo ambas, a superioridade supera a si mesma. A mediocridade com o esforço consegue mais do que os superiores que não o fazem. O trabalho dignifica e com ele se adquire reputação. Alguns são incapazes de se aplicar mesmo às tarefas mais simples. O esforço depende quase sempre do temperamento. É aceitável ser medíocre num trabalho sem importância, há desculpa de que fomos talhados para coisas mais nobres. Porém, contentar-se em ser medíocre numa tarefa inferior, podendo ser excelente na mais elevada, não tem desculpa. Tanto a arte quanto a natureza são necessários e a aplicação os consagra”.

Autor desconhecido

SUMÁRIO

	RESUMO	13
	ABSTRACT	13
1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1.	Agente e hospedeiros	15
2.2.	Transmissão	16
2.3.	Aspectos imunológicos e clínicos	17
2.4.	Alterações oculares	18
2.5.	Diagnóstico laboratorial	22
2.5.1.	Métodos parasitológicos	22
2.5.2.	Métodos sorológicos	23
2.5.3.	Biologia molecular	23
2.6.	Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no Brasil	24
2.7.	Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no município de Belo Horizonte	24
3.	OBJETIVOS	24
4.	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1.	Animais	24
4.2.	Avaliação oftalmológica	25
4.3.	Colheita e preparação de materiais	25
4.4.	Definição da amostra e análise estatística	27
5.	RESULTADOS	27
5.1.	Avaliação clínica geral	27
5.2.	Avaliação oftalmológica	28
5.3.	Exames laboratoriais, histopatológicos e imuno-histoquímico	30
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÕES	41
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Oftalmopatias diagnosticadas em 48 cães (96 olhos) soropositivos para leishmaniose visceral em relação ao número de olhos (Belo Horizonte - MG).	29
Tabela 2 -	Oftalmopatias diagnosticadas em 48 cães soropositivos para leishmaniose visceral em relação ao número de animais (Belo Horizonte - MG).	29
Tabela 3 -	Oftalmopatias diagnosticadas em 48 cães soropositivos para leishmaniose visceral em relação à estrutura acometida (Belo Horizonte - MG).	30
Tabela 4 -	Oftalmopatias diagnosticadas em 13 cães soropositivos para leishmaniose visceral, cujo motivo da consulta foi alteração ocular (Belo Horizonte - MG).	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando blefarite difusa e intensa com envolvimento das glândulas de meibômio. 33
- Figura 2** - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando blefarite nodular com formações de diversos nódulos nas bordas pálpebras. 33
- Figura 3** - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando blefarite ulcerativa com erosões na região periocular medial. 33
- Figura 4** - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando uveíte anterior, injeção ciliar, edema de córnea e íris, hífema e miose. 33
- Figura 5** - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando uveíte, hiperemia conjuntival e acentuado edema de córnea. 34
- Figura 6** - Fotografia de olho esquerdo de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando conjuntivite, quemose acentuada e hiperemia conjuntival moderada. 34
- Figura 7** - Fotografia de olho esquerdo de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando conjuntivite, hiperemia conjuntival e acúmulo de secreção mucopurulenta. 34
- Figura 8** - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando ceratoconjuntivite seca intensa com acentuado acúmulo de secreção ocular mucosa na superfície ocular. 34
- Figura 9** - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando ceratoconjuntivite seca moderada com acúmulo de secreção mucosa. 35
- Figura 10** - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando alopecia periocular na porção medial e formações nodulares corneocojuntivais. 35
- Figura 11** - Fotografia de olho esquerdo de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando panuveíte, injeção ciliar, edema e vascularização corneanos. 35
- Figura 12** - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*, apresentando descolamento de retina total e hemorragia retiniana. 35

- Figura 13** - Fotomicrografia da pálpebra de cão positivo, mostrando blefarite linfoplasmocitária moderada e focal associada a hiperqueratose ortoqueratótica difusa (setas) e acantose moderada (estrela). HE. 25x. 36
- Figura 14** - Fotomicrografia da terceira pálpebra de cão positivo, mostrando dilatação focal dos ductos das glândulas lacrimais (setas). HE. 50x. 36
- Figura 15** - Fotomicrografia da córnea de cão positivo, mostrando ceratite linfohistiocitária multifocal moderada (setas) com proliferação de tecido conjuntivo, angiogênese e discreto edema (estrelas). HE. 100x. 36
- Figura 16** - Fotomicrografia da íris de cão positivo, mostrando irite linfoplasmocitária multifocal intensa (setas) associada a espessamento estromal da íris. HE. 50x. 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Apud	=	citado por, em
°C	=	grau centígrado
CCS	=	ceratoconjuntivite seca
d	=	erro amostral
ELISA	=	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
FIG	=	figura
RPM	=	rotações por minuto
HE	=	hematoxilina-eosina
IgG	=	imunoglobulina G
IHQ	=	imunohistoquímica
IR	=	índice de reatividade
Kg	=	kilograma
Km ²	=	quilômetros quadrados
LV	=	leishmaniose visceral
LVC	=	leishmaniose visceral canina
M	=	molar
mg	=	miligrama
MG	=	Minas Gerais
n	=	número de amostras para estimar a prevalência em uma população infinita
n°	=	número
µm	=	micrômetro
nm	=	nanômetro
p	=	prevalência esperada
PBS	=	tampão salina fosfato
PCR	=	reação em cadeia da polimerase
pH	=	potencial hidrogeniônico
RIFI	=	reação de imunofluorescência indireta
TAB	=	tabela
TLS	=	teste lacrimal de Schirmer
UFMG	=	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	=	“World Health Organization”
x	=	vezes
α ²	=	fator determinante do grau de confiança
%	=	por cento

RESUMO

Dentre as doenças parasitárias sistêmicas com manifestação oftalmológica destaca-se a leishmaniose visceral canina, que pode determinar desde discretas alterações nos anexos oculares a envolvimento completo do bulbo, provocando perda da função visual. As oftalmopatias ocorrem concomitantemente com outros sinais sistêmicos da doença, mas podem constituir a primeira ou a única alteração aparente da mesma, representando a principal queixa dos proprietários. O presente estudo avaliou a prevalência de lesões no olho e em seus anexos de cães com leishmaniose visceral na cidade de Belo Horizonte, MG. Utilizou-se 100 animais de raças variadas, com diagnóstico parasitológico e/ou sorológico positivos para a leishmaniose visceral. Alterações foram observadas em 48 animais (96 olhos), sendo as mais prevalentes blefarite (23,9%), uveíte anterior (20,8%), conjuntivite (19,8%), ceratoconjuntivite seca (18,7%), alopecia periocular (12,5%), panuveíte (7,3%), descolamento de retina (7,3%) e ceratite (6,2%). Devido à ampla variedade e singularidade das enfermidades oculares associadas à leishmaniose canina, esta zoonose deve ser considerada no diagnóstico diferencial de alterações oculares e perioculares nos cães residentes em áreas endêmicas ou em animais oriundos destas regiões.

Palavras-chave: Cão, leishmaniose visceral, alterações oftalmológicas

ABSTRACT

Visceral canine leishmaniasis is among the parasitic disease with important ocular manifestations. They can vary from small alterations in the ophthalmic enclosures until complete visual loss. The dogs with ocular leishmaniasis must commonly present for a variety of systemic signs. However, in some dogs, abnormalities involving the eyes were the presenting complaint by the owners. The prevalence of ocular lesions in dogs with systemic leishmaniasis has been reported to vary between 24,1% and 80,5%. The purpose of this study was to determine the prevalence of ocular lesions associated with leishmaniasis in dogs in Belo Horizonte city, Brazil. One hundred of canine leishmaniasis with many breeds confirmed cytological, serologically or both were used. The ophthalmic lesions were present in 48 dogs (96 eyes) and the most common manifestation were blepharitis (23,9%), anterior uveitis (20,8%), conjunctivitis (19,8%), keratoconjunctivitis sicca (18,7%), periocular alopecia (12,5%), panuveitis (7,3%) retinal detachment (7,3%) and keratitis (6,2%). Cataract, nuclear sclerosis and nodule iris and eyelid were diagnosed, although no probable relationship can be established. Ophthalmic manifestations are among the most peculiar clinical lesions of canine leishmaniasis and this zoonotic disease should be include in the differential diagnosis in animals coming from endemic areas.

Key-words: Dog, visceral leishmaniasis, ophthalmic lesions

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma importante zoonose que acomete humanos, canídeos e alguns animais silvestres. Apresenta distribuição mundial sendo considerada emergente em algumas áreas. No Brasil, ocorre de forma endêmica e o cão é o principal reservatório doméstico. A transmissão se dá predominantemente pela picada da fêmea de flebotomíneos infectados (WHO, 2006).

Os cães parasitados apresentam uma ampla e variada sintomatologia clínica envolvendo vários órgãos, inclusive os olhos e seus anexos (McCornell et al., 1970; Giles et al., 1975; Molleda et al., 1993; Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999). As oftalmopatias ocorrem concomitantemente com outros sinais sistêmicos, mas podem constituir a primeira ou a única alteração aparente da doença (Roze, 1986a; Peña et al., 2000; Fulgêncio et al., 2004; Roze 2004; Fulgêncio et al., 2006). Neste contexto, as principais alterações nos olhos e seus anexos são blefarite, conjuntivite e uveíte anterior. A prevalência das lesões oculares em cães com leishmaniose no Velho Mundo varia entre 24,1% a 80,5% (Slappendel, 1988; Molleda et al., 1993; Koutinas et al., 1999; Peña et al., 2000).

As lesões oculares podem constituir a principal queixa dos proprietários de animais com LVC quando do atendimento médico-veterinário. Os aspectos clínicos destas lesões, em alguns casos, sugerem o envolvimento de uma doença sistêmica (Roze, 1986a; Peña et al., 2000; Fulgêncio et al., 2004). O diagnóstico da leishmaniose visceral (LV) é complexo e sua confirmação precoce e definitiva é fundamental para o controle da mesma (Ciaramella et al., 1997; Fisa et al., 2001), permitindo preservar a

integridade do bulbo ocular e seus anexos e, conseqüentemente, a manutenção da visão (Koutinas et al., 1999; Peña et al., 2000; Fulgêncio et al., 2004).

Devido à escassez de estudos na literatura envolvendo as oftalmopatias associadas à LVC, principalmente no Novo Mundo, propôs-se com este trabalho identificar e caracterizar as manifestações oculares e perioculares determinadas por esta enfermidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses são um grupo de doenças com potencial zoonótico e endêmico que ocorrem em 88 países de quatro continentes, sendo 66 nações no Velho Mundo e 22 do Novo Mundo (WHO, 2006). No Brasil a LVC está disseminada pelas zonas rural, peri-urbana e urbana, apresentando evidente processo de transição epidemiológica e de urbanização em cidades localizadas nas regiões nordeste e sudeste (Manual..., 2003 e Alves e Bevilacqua, 2004).

2.1. Agente e hospedeiros

A LVC é causada por protozoários intracelulares obrigatórios do sistema mononuclear-fagocitário. Pertencem à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (Ross, 1903). Nas Américas, a LVC ou calazar tem como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937), espécie semelhante a *L. infantum* (Nicollle, 1908) encontrada em países do Mediterrâneo e na Ásia, sendo ambas agrupadas no complexo *L. (L.) donovani* (Lainson e Shaw, 1987). Estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e *L. infantum* como uma única espécie (Maurício et al., 2000).

O vetor do parasito é um inseto da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* e gêneros *Phlebotomus*, com várias espécies no Velho Mundo, e *Lutzomyia* nas Américas, com a principal espécie *Lutzomyia longipalpis* (Santos et al., 1998 e Killick-Kendrick, 1999). Estes insetos possuem distribuição cosmopolita com atividade predominantemente crepuscular, habitando lugares quentes e úmidos, como ambientes intradomiciliares, estábulos, galinheiros e pomares, dentre outros (Dias et al., 2003). Ambos os sexos se alimentam de açúcares oriundos de plantas, mas as fêmeas necessitam de sangue para a maturação e ovopostura (Killick-Kendrick, 1999).

No Brasil, a principal espécie causadora da LV é a *L. chagasi*, havendo relato de um único caso de *L. amazonensis* como agente da doença (Barral et al., 1986). Morfologicamente, o parasito pode se apresentar sob as formas, amastigota, promastigota e paramastigota. A forma amastigota é parasita intracelular de macrófagos de mamíferos e, portanto, determina a doença. As formas promastigota e paramastigota são flageladas e encontradas no trato digestivo dos flebotomíneos (Marsella e Gopegui, 1998).

Por se tratar de um parasito heteroxeno, a *Leishmania* necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida. Os principais reservatórios da doença são os cães domésticos e outros canídeos silvestres, embora possa contaminar outros mamíferos, como o gambá e roedores (Cabrerá et al., 2003). Considerando-se a epidemia urbana da doença e seu poder zoonótico, o cão doméstico é tido como o reservatório mais importante (Moreno e Alvar, 2002). Embora haja relatos do isolamento de *Leishmania sp* em carrapatos e pulgas, o

real papel destes hospedeiros na epidemiologia da doença continua obscuro (Coutinho et al., 2005 e Dantas-Torres, 2006).

2.2. Transmissão

A transmissão entre os hospedeiros vertebrados é realizada predominantemente pela picada das fêmeas dos dípteros hematófagos infectados. Ao fazerem seu repasto sanguíneo, as fêmeas de flebotomíneos ingerem as formas amastigotas que, em seu tubo digestivo, se transformam em promastigotas. Após modificações morfológicas e fisiológicas, algumas destas formas se diferenciam em promastigotas infectantes ou metacíclicas, depois de aproximadamente 48 horas da ingestão das formas amastigotas. As promastigotas infectantes se replicam no intestino do inseto e migram para o esôfago e faringe. Desta forma, elas são regurgitadas e internalizadas por células presentes na derme do novo hospedeiro vertebrado, completando assim o ciclo biológico do parasito (Marsella e Gopegui, 1998).

A saliva dos vetores que vivem nas Américas apresenta importância fundamental no processo de infecção, pois contém um peptídeo, o maxadilán, com atividade vasodilatadora e antiplaquetária. Este peptídeo mantém o fluxo sanguíneo constante, dificultando a coagulação e, portanto, facilitando a inoculação dos parasitos nos hospedeiros vertebrados (Killick-Kendrick, 1999).

As formas promastigotas metacíclicas, após serem inoculadas nos hospedeiros vertebrados, permanecem no espaço extracelular, promovendo ativação de complemento e conseqüente leucotaxia. Durante este processo, algumas formas promastigotas são destruídas pelos

polimorfonucleares, enquanto outras são internalizadas pelos macrófagos e envolvidas pela membrana fagossômica, resultando no vacúolo parasitóforo onde se multiplicam (Handman e Bullen, 2002).

Ainda existem dúvidas acerca da transmissão da *Leishmania sp* entre cães através da picada de insetos não flebotômicos (Linardi e Nagem, 1973; Coutinho et al., 2005; Dantas-Torres, 2006). A transmissão na ausência do vetor foi relatada por Owens e colaboradores (2001), que verificaram a contaminação pela transfusão sanguínea entre cães, o que foi posteriormente comprovado experimentalmente por Freitas e colaboradores (2006). A via transplacentária foi recentemente considerada por Rosypal e colaboradores (2005) e não existem relatos da transmissão venérea.

O período de incubação da leishmaniose visceral é bastante variado, podendo ir de alguns meses a vários anos, com uma média de três a sete meses (Manual..., 2003). Cunha e Chagas (1937), inoculando formas promastigotas em cães, encontraram um período de incubação variando entre três a sete meses. Por outro lado, Longstaff e colaboradores (1983) relataram um período de incubação de 33 meses. Em estudo envolvendo animais experimentalmente infectados, Genaro (1993) concluiu que este período é de 1,8 a 12,5 meses em 95% dos cães estudados.

2.3. Aspectos imunológicos e clínicos

A resposta imunológica desencadeada por um agente infeccioso é dependente de vários fatores, como sua antigenicidade, carga parasitária e sistema imunológico do hospedeiro, sendo, portanto, a apresentação clínica da doença uma

conseqüência destas interações (Santos-Gomes et al., 2002).

Nas doenças parasitárias, fatores específicos relacionados com o hospedeiro vertebrado e o parasito determinam o desenvolvimento dos mecanismos patogênicos, das lesões e, conseqüentemente, dos sinais clínicos encontrados no animal doente (Ezquerria, 2001).

A susceptibilidade à doença está diretamente relacionada à resposta imunológica envolvendo a atividade dos linfócitos T e macrófagos e ao perfil de produção de quimiocinas por linfócitos T *helper* (Th) CD4+. Tal perfil caracteriza a resposta do tipo Th1 ou Th2. As células Th1 produzem interleucina-2, interferon- γ e fator de necrose tumoral, resultando na ativação de macrófagos e conferindo resistência à infecção. Em contraste, as células do tipo Th2, que produzem interleucinas 4, 5 e 10, estimulam uma resposta de linfócitos B que inibe a resposta celular protetora, tornando o hospedeiro susceptível à progressão da doença (Barbiéri, 2006).

Cães infectados podem: (a) apresentar uma forma progressiva da doença, associada com elevados títulos de anticorpos e imunossupressão; (b) apresentar remissão da sintomatologia e até a cura, com títulos de anticorpos baixos ou ausentes ou (c) nunca desenvolver a enfermidade (Abranches et al., 1991; Cabral et al., 1992; Pinelli et al., 1994). O aumento na produção das imunoglobulinas pode ser um fator prejudicial, na medida em que facilita a internalização das formas amastigotas pelos macrófagos, permitindo que o agente continue a se replicar dentro destas células sem ativar o sistema imunológico (Slappendel e Greene et al., 1990; Ferrer et al., 1995). Não obstante, o principal

efeito danoso da hiperglobulinemia é a formação dos imunocomplexos circulantes que se depositam em vários órgãos e tecidos. Assim, as alterações da LVC são atribuídas tanto à presença direta do parasito quanto à deposição destes imunocomplexos (Noli, 1999).

Vários sinais clássicos podem ser vistos em cães parasitados, observando-se desde animais de aparência hígida a pacientes com várias manifestações clínicas (Ciaramella et al., 1997). As alterações mais frequentes são alopecia, descamação, hiperpigmentação, eritema, úlceras, pústulas, onicogribose, piodermite, dermatite seborréica, linfadenopatia localizada ou generalizada, anorexia, emagrecimento, tosse, hipertermia, epistaxe, gastroenteropatias, nefropatias, poliúria, polidipsia, hematuria, hepatopatias, ascite, icterícia, claudicação, atrofia muscular, artropatias, meningites e oftalmopatias (Slappendel, 1988; Ciaramella et al., 1997; Roze, 1986b; Koutinas et al., 1999; Peña et al., 2000; Ferrer, 2002; Amusatogui et al., 2003; Costa Val, 2004; Solano-Gallego, 2004).

Mancianti e colaboradores (1988), examinando cães infectados com *L. infantum* na Ilha de Elba (Itália), os classificaram clinicamente em (a) assintomáticos, pela ausência de sinais e sintomas sugestivos de infecção por *Leishmania*; (b) oligossintomáticos, apresentando adenopatia linfóide, pequena perda de peso e/ou pêlo opaco e (c) sintomáticos, com alguns ou todos os sinais patognomônicos da doença, como alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras e hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento e paresia dos membros posteriores.

2.4. Alterações oculares

As manifestações oculares e perioculares, embora ocorram concomitantemente com outros sinais sistêmicos, podem constituir a primeira alteração aparente da LVC (Roze, 1986a; Peña et al., 2000; Fulgêncio et al., 2004; Fulgêncio et al., 2006). Neste contexto, estas alterações iniciais da doença foram responsáveis pela ida do animal ao médico veterinário de 3,5% a 14,0% dos cães diagnosticados com leishmaniose (Koutinas et al., 1999 e Peña et al., 2000). A prevalência das oftalmopatias associadas à doença em outros países foi reportada variando entre 24,1% e 80,5% dos animais infectados (Slappendel, 1988; Molleda et al., 1993; Koutinas et al., 1999; Peña et al., 2000).

Laveran (1913), citado por Nicolau e Perard (1936), descreveu ceratite em dois cães experimentalmente infectados com *Leishmania sp.* Lemaire e colaboradores (1913) foram os primeiros autores a estudar as características histológicas desta alteração corneana supostamente determinada pela doença, encontrando uma ceratite intersticial associada a formas amastigotas intracitoplasmáticas no estroma. Lemaire e colaboradores (1913) e Nicolau e Perard (1936) observaram que as alterações corneanas devido à leishmaniose são mais frequentes nos cães que em humanos. Em outro trabalho, descreveu-se uma conjuntivite associada a ceratite (Jeaume, 1932). Posteriormente, outros autores diagnosticaram ceratites (Donatien e Lestoquard, 1935; Nattan-Larrier e Guimard, 1935; Leitão, 1946; Deane e Deane, 1955) e blefarites (Ho et al., 1947) no curso da LVC. Também se isolou parasitos na esclera de um cão com ceratite ulcerativa superficial (Falchetti e Faure-Brack, 1932) e na lágrima de

animais infectados (Faure-Brack, 1933 e Nattan-Larrier e Guimard, 1935).

Slappendel (1988), em estudo retrospectivo na Holanda, avaliou 95 cães com leishmaniose e encontrou 40 animais (42,1%) com oftalmopatias. Dentre estas alterações, destacaram-se a conjuntivite em 26 (27,4%), ceratite em sete (7,4%), uveíte em um animal (1,0%) e panoftalmite em outro (1,0%).

Molleda et al. (1993) avaliaram 41 cães naturalmente infectados na Espanha e diagnosticaram 80,5% de animais com oftalmopatias, sendo a conjuntivite a mais prevalente (34,2%). As outras alterações foram ceratoconjuntivite seca (CCS - 26,8%), blefarite (24,4%), uveíte anterior (14,6%), blefaroconjuntivite e coriorretinite (9,8%), ceratite e atrofia de retina (4,9%) e atrofia do nervo óptico (2,4%). Após avaliação histopatológica de 46 bulbos oculares, encontraram 96,7% destes acometidos. Em relação aos achados microscópicos, infiltrado inflamatório linfo-histio-plasmocitário de intensidade e distribuição variadas foram observados em várias estruturas, como a terceira pálpebra, córnea, limbo, corpo ciliar e íris.

Ciamella et al. (1997), avaliando 150 cães naturalmente infectados com leishmaniose no sul da Itália, observaram 24 animais (16%) com oftalmopatias, sendo 13 casos de ceratoconjuntivite, três de CCS, seis de uveíte e dois de panoftalmite. Os autores não consideraram a alopecia periocular (27 animais - 18%) como uma alteração oftalmológica, mas sim dermatológica.

Koutinas e colaboradores (1999), em estudo clínico envolvendo 158 cães com LVC na Grécia, encontraram 38 animais (24,1%) com alterações no olho e em seus anexos. Todos os animais apresentavam conjuntivite, havendo 19 (12%) com

blefarite, 13 (8,2%) com uveíte e oito (5,1%) com CCS.

Peña et al. (2000), avaliando 430 cães com leishmaniose na Espanha, encontraram 105 animais (24,4%) com oftalmopatias associadas à doença. As alterações oculares encontradas foram uveíte anterior (42,8%), conjuntivite e ceratoconjuntivite (31,4%), blefarite (29,5%), alopecia periocular (26,7%), uveíte posterior (3,8%), CCS (2,8%) e celulite orbital (1,9%). Descreveram ainda a ocorrência de glaucoma em um cão, provavelmente devido a uveíte crônica.

Fulgêncio e colaboradores (2004) descreveram as manifestações oculares e perioculares em 10 cães com leishmaniose assintomática, pois não apresentavam sinais sistêmicos da doença, sendo a oftalmopatia a única queixa do proprietário. As lesões oculares apresentaram-se de forma bilateral em seis animais (60%) e em dois cães (três olhos) existiam mais de um sinal ocular. Conjuntivite ocorreu em cinco olhos (25%), uveíte anterior em quatro (20%), blefarite e alopecia periocular em três (15%) e ceratoconjuntivite e CCS em dois (10%).

Pesquisadores avaliaram 65 casos de oftalmopatias em cães com sorologia positiva para *Leishmania sp.* em Belo Horizonte – MG. As alterações mais prevalentes foram blefarite (25,4%), uveíte (23,8%), conjuntivite (20,0%), ceratoconjuntivite seca (15,4%), alopecia periocular (13,9%), descolamento de retina (9,2%), ceratite (7,7%), (Fulgêncio et al., 2006).

As dermatopatias que ocorrem na LVC, ulcerativas ou não, se devem à ação direta do parasito (Ridley e Ridley, 1983; Ferrer et al., 1988) associada a vasculite necrosante causada pela deposição de

imunocomplexos, formando desde pequenos nódulos a ulcerações importantes (Pumarola et al, 1991). Segundo Fondevila e colaboradores (1997), fatores imunológicos envolvendo o parasito e hospedeiro caracterizam as lesões cutâneas, como as blefarites, freqüentemente causadas pela leishmaniose. As lesões palpebrais podem mimetizar enfermidades cutâneas parasitárias, como demodicose e escabiose (Gelatt, 1991; Mozos et al., 1999; Scott et al., 2001). Além destes ácaros, outros protozoários, como *Toxoplasma gondi* e *Neospora canis*, têm sido associados a blefarites alopecicas, descamativas, eritrematosas e, ocasionalmente, ulcerativas e pruriginosas em cães (Scott et al., 2001). O prurido é mais freqüente nas blefarites parasitárias como acariase sarcóptica, otoacariase ou nas infecções bacterianas secundárias em relação àquelas suscitadas pela leishmaniose (Gelatt; 1991 e Scott et al., 2001). Por outro lado, a associação da *Leishmania* e *Demodex canis* envolve predisposição genética e supressão imunológica causada pelo protozoário, determinando as características patogênicas das lesões e explicando, em parte, os escassos relatos envolvendo as duas enfermidades (Barriga et al., 1992 e Mozos et al., 1999).

Em um cão portador de infecção experimental, estudos histopatológicos dos bulbos oculares demonstraram lesões e parasitos em diversos tecidos oculares, excetuando o cristalino, retina e nervo óptico (Nicolau e Perard, 1936).

McConnell e colaboradores (1970) relataram o isolamento de *L. donovani* na conjuntiva palpebral, humor aquoso e humor vítreo em um cão. As alterações microscópicas incluíram proliferação de tecido fibroso e vascular, com predomínio de infiltrado inflamatório composto

principalmente por histiócitos e linfócitos. Embora a maioria das estruturas intra-oculares estivesse envolvida, as lesões foram mais pronunciadas na córnea, limbo e úvea anterior. As alterações palpebrais observadas foram hiperqueratose e infiltrado predominantemente histiocitário, com formas amastigotas intracitoplasmáticas em algumas células. Notou-se exsudato evidente nas câmaras anterior, posterior e vítrea. Clinicamente, o animal apresentava blefarite e endoftalmite bilaterais.

Em outro estudo histopatológico, utilizando material de uma cadela com linfadenopatia generalizada e endoftalmite bilateral, evidenciou-se o parasito na pálpebra, esclera, córnea, íris, corpo ciliar e coróide, além de outros órgãos do corpo. Infiltrado inflamatório mononuclear também foi observado em várias estruturas, como pálpebra, úvea, íris, corpo ciliar e coróide (Giles et al., 1975).

Naranjo e colaboradores (2005) estudaram as glândulas envolvidas na produção lacrimal e a possível patogenia da CCS em cães com leishmaniose. Observaram infiltrado inflamatório histio-lymfocitário nas glândulas da terceira pálpebra e de meibômio e neutrófilos em focos isolados. O infiltrado mononuclear observado ao redor dos ductos e glândulas lacrimais provocava dilatação e acúmulo de secreção nestas estruturas. Segundo estes autores, esta seria a principal causa de CCS em cães com leishmaniose visceral.

Investigando a CCS em cães com LV, Fulgêncio e colaboradores (2005) monitoraram três animais portadores destas alterações, sendo dois assintomáticos e um sintomático. Observaram, nestes cães, que a redução

da produção de lágrimas ocorreu de forma aguda, sem determinar envolvimento corneano.

Roze (1986a) citou três possíveis teorias envolvendo a patogenia CCS em cães com leishmaniose. A primeira refere-se à destruição direta da glândula pelo parasito, associada com intensa inflamação; a segunda devido à obstrução dos ductos das glândulas pelo processo inflamatório adjacente e, finalmente, a diminuição do reflexo de secreção lacrimal por hipoestesia corneana devida a lesões nesta estrutura. Além disso, concluiu que o envolvimento corneano isolado é raramente observado na LVC, geralmente ocorrendo em associação com outras oftalmopatias.

A conjuntiva é uma estrutura rica em tecido linfóide com função imunológica essencial para a higidez ocular (Hendrix, 1999). Acredita-se que, por estas características, ela seja freqüentemente envolvida na LVC, sendo a estrutura ocular mais acometida pela doença em vários trabalhos na Europa e no Brasil (Roze, 1986b; Slappendel, 1988; Molleda et al, 1993; Koutinas et al, 1999; Brito, 2004; Fulgêncio et al., 2004).

Ao contrário da elevada freqüência de envolvimento conjuntival, a córnea é raramente acometida de forma isolada, sendo ceratites primárias raramente reportadas em cães com leishmaniose (Naranjo et al., 2005). Processos edematosos que determinam pigmentação corneana podem diminuir a sensibilidade da mesma, reduzindo a produção de lágrimas (Xu et al., 1996). Entretanto, uma outra possibilidade é a redução da produção de lacrimal causada pela CCS, comprometendo a fisiologia da córnea causando edema, vascularização e, em casos crônicos, pigmentação (Moore, 1999).

Abboud e colaboradores (1970) afirmaram que a conjuntivite e a ceratite não teria significado importante no diagnóstico clínico da LVC, pois poderiam ter outras etiologias.

Dois cães com leishmaniose apresentavam vasculite sistêmica necrosante afetando vários órgãos, inclusive os olhos. Os animais mostravam graus distintos de hemorragia nas câmaras anterior e posterior (Pumarola et al., 1991). Em outro trabalho, observou-se ceratoconjuntivite intensa associado a opacificação da córnea e secreção purulenta em 25% dos cães estudados (Genaro, 1993).

Roze (2002) concluiu que a inflamação do trato uveal constitui uma das alterações oculares mais comuns da LVC em áreas endêmicas, podendo ser responsável por até 70% das oftalmopatias. Como consequência desta inflamação pode ocorrer hifema, glaucoma e outros sinais menos comuns, como degeneração corneana, exoftalmia e estrabismo. Outras alterações, como descolamento e atrofia de retina, foram citadas. Em relação ao descolamento de retina, a hipertensão secundária à falência renal constitui a causa mais provável, podendo ocorrer em até 80% dos casos (Dimski e Hawkins, 1988).

Em um trabalho realizado em Belo Horizonte - MG isolou-se *L. (L.) chagasi* a partir de amostras do humor aquoso e vítreo. Também foram avaliadas 24 amostras dos bulbos oculares, onde se encontrou infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares e formas amastigotas na esclera e íris. Este mesmo infiltrado também foi observado na córnea, mas sem a presença do parasito; na retina havia células inflamatórias associadas a formas amastigotas intracitoplasmáticas. Em

relação à concentração de imunoglobulinas, concluiu-se que anticorpos dos meios intra-oculares de cães com parasitismo ocular apresentavam-se em níveis superiores aos de cães sem o mesmo e não existiu correlação entre as concentrações de proteínas no plasma e nestes meios (Dias, 1998).

Em um estudo realizado no Estado do Pernambuco em cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*, além do infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, foi observado espessamento estromal, congestão e dilatação vascular na úvea anterior e posterior. O envolvimento do aparato lacrimal também foi reportado, havendo dilatação dos ductos lacrimais com retenção de suas secreções. À avaliação macroscópica, a conjuntiva mostrou-se acometida em 40% dos casos (Brito, 2004).

Garcia-Alonso e colaboradores (1996) estudaram a imunopatogenia da uveíte em cães com leishmaniose na Espanha. À avaliação microscópica de quatro amostras do bulbo ocular, observaram processos inflamatórios intensos, notadamente histio-linfocitários, na esclera, limbo, úvea anterior e no aparato lacrimal. Nesta última estrutura, este infiltrado era acompanhado de necrose do epitélio glandular. Além destes achados, observaram intensa vasculite e dilatação vascular na esclera, limbo e úvea anterior. Edema intersticial, infiltrado de células mononucleares em graus variados e formas amastigotas no interior de histiócitos foi igualmente relatado. Ainda segundo estes pesquisadores a inflamação intra-ocular em cães com leishmaniose visceral podem ter duas origens possíveis. A primeira hipótese da uveíte anterior pode estar relacionada com a intensa migração leucocitária provocada pela

presença de formas amastigotas, como acontece na pele, conforme também descrito por Brenner e colaboradores (1984) e Ginel e colaboradores (1993). Por outro lado, a inflamação pode ser conseqüente de hipersensibilidade imunomediada tipo III, suscitada por antígenos do parasito e deposição de imunoglobulinas não específicas, como ocorre na barreira de filtração glomerular (Sartori et al., 1987 e Nieto et al., 1992).

Coriorretinite multifocal associada a áreas focais de hiporefletividade também foi observada na LVC, apesar da baixa predileção do parasito pelo segmento posterior do olho (Roze, 1986a).

2.5. Diagnóstico laboratorial

Devido à ampla e inespecífica sintomatologia clínica dos animais parasitados, principalmente em áreas endêmicas, o diagnóstico clínico da LVC tende a ser inconclusivo, havendo sempre a necessidade de exames laboratoriais para o diagnóstico definitivo da doença (Ferrer et al., 1995; Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999).

2.5.1. Métodos parasitológicos

O exame parasitológico se baseia na demonstração do parasito em amostras obtidas por punção de linfonodos, medula óssea, baço ou fígado, além da biópsia ou escarificação da pele. É um método muito específico, pois a presença de um único parasito determina a certeza da doença (Ferrer, 1995 e Koutinas et al., 1999). A visibilização das formas amastigotas é fácil nas amostras com intenso parasitismo, mas quando a carga parasitária é pequena pode haver dificuldade (Ferrer, 1995). Além disso, pode ocorrer retração do material causada pela fixação, comprometendo a

identificação do cinetoplasto presente na forma amastigota, sem o qual não se tem a confirmação diagnóstica (Pirmez, 1986).

As técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) confirmam a identificação microscópica do parasito, pois anticorpos específicos marcados detectam com grande sensibilidade as formas amastigotas nas amostras de tecido (Ferrer, 1995). Segundo Xavier (2002), há maior sensibilidade pela IHQ em relação à coloração com hematoxilina-eosina, pois a primeira técnica propiciou a identificação de parasitos em cortes de tecidos considerados duvidosos ou negativos pela segunda metodologia. Frente à importância da IHQ na determinação de formas amastigotas, alguns pesquisadores utilizaram apenas esta técnica para determinação da intensidade do parasitismo (Solano-Gallego et al., 2004).

2.5.2. Métodos sorológicos

Os métodos sorológicos detectam anticorpos anti-leishmania, constituindo a principal metodologia em campanhas de inquérito epidemiológico. A reação de fixação de complemento foi utilizada amplamente no Brasil para diagnóstico sorológico da LVC (Alencar, 1959; Costa et al., 1991; Michalick et al., 1992), sendo posteriormente substituída pela imunofluorescência indireta (RIFI) (Genaro, 1993).

Atualmente, a RIFI é largamente utilizada, apresentando grande sensibilidade, embora a especificidade possa ser comprometida em áreas associadas com a presença de leishmaniose tegumentar ou doença de Chagas, onde podem ocorrer reações cruzadas (Costa et al., 1991). Gradoni (2002) considera a RIFI como padrão-

ouro para diagnóstico sorológico da LVC, além de ser considerada a metodologia de eleição na Europa.

O ELISA se destaca para a confirmação da leishmaniose, representando a segunda técnica mais utilizada pelos pesquisadores europeus (Carrera et al., 1996 e Gradoni, 2002). Nos dias atuais, é indicado para triagem e posterior determinação da doença em inquéritos epidemiológicos no Brasil (Manual..., 2003). As reações imunológicas consideradas fracamente positivas através da RIFI, ocasionadas inclusive por diagnósticos falso-positivos, podem ser, em grande parte, confirmadas pelo ELISA (Carrera et al., 1996; Gradoni, 2002; Scaloni et al., 2002).

2.5.3. Biologia molecular

Muitas vezes a sensibilidade das técnicas de visibilização dos parasitos e avaliações sorológicas falha em confirmar a leishmaniose (Fisa et al., 2001). A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se mostrado muito útil para a confirmação da LVC em amostras de animais com baixo nível de anticorpos, por sua maior sensibilidade e, principalmente, pela elevada especificidade (Ferrer, 1995 e Fisa et al., 2001).

2.6. Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no Brasil

Durante muito tempo a ocorrência da leishmaniose visceral humana se limitou a áreas rurais, mas atualmente regiões de urbanização recente e subúrbios de grandes cidades apresentam casos emergentes. Neste contexto, destacam-se cidades como São Luis, Santarém, Teresina, Fortaleza, João Pessoa, Recife, Aracaju, Rio de Janeiro, Corumbá e Belo Horizonte (Genaro et al., 1990; Vieira e

Coelho, 1998; Oliveira e Assunção, 2001).

Dados recentes mostram que a LVC ocorre em 19 das 27 unidades da Federação, envolvendo mais de 1.600 municípios com casos de transmissão autóctone (Manual..., 2003). Atualmente, a LVC apresenta nítido processo de transição epidemiológica, com incidência crescente nos estados do nordeste, sudeste e centro-oeste (Manual..., 2003 e Alves e Bevilacqua, 2004).

2.7. Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no município de Belo Horizonte

De acordo com o censo do ano de 2000, existem em Belo Horizonte 2.091.380 habitantes, 636.515 domicílios e 268.272 cães em uma área de aproximadamente 335,5 km², havendo assim uma relação de um cão para cada oito habitantes (Censo, 2000).

O município é dividido em nove regionais administrativas autônomas, possuindo em cada uma um distrito sanitário. Cada regional possui um Serviço de Vigilância e Controle de Zoonoses e um de Vigilância Epidemiológica, sendo o primeiro responsável pelo controle da doença no cão e o segundo pela investigação dos casos humanos (Prefeitura de Belo Horizonte, 2006).

Em 1989 detectou-se um caso de leishmaniose humana no município de Sabará, localizado a poucos quilômetros de Belo Horizonte, sendo a seguir descobertos três cães infectados na região (Genaro et al., 1990). Em Belo Horizonte, os primeiros animais infectados foram notificados em 1992. Após inquérito epidemiológico nas regiões vizinhas onde viviam estes cães, outros animais

portadores foram identificados (Michalick et al., 1992).

Os primeiros cães diagnosticados com LV pertenciam a duas regionais administrativas vizinhas à cidade de Sabará. Em 1993 foram coletadas 2.288 amostras de cães de forma aleatória e encontrou-se 133 animais positivos (5,8%). Em 2005 foram avaliadas 149.470 amostras, com 11.901 animais positivos, havendo uma prevalência de aproximadamente 7%. No ano seguinte houve um aumento para aproximadamente 9,7%, com 6.727 animais infectados em total de 69.347 cães avaliados até o dia 15 de setembro de 2006 (Prefeitura de Belo Horizonte, 2006).

3. OBJETIVOS

Tendo em vista a escassez de relatos envolvendo a frequência ou a prevalência das oftalmopatias associadas à leishmaniose nas Américas, os objetivos deste trabalho foram:

- a. Avaliar a prevalência das manifestações oculares e perioculares em cães portadores de leishmaniose visceral em Belo Horizonte;
- b. Relatar as características oftalmológicas destas alterações e as principais estruturas envolvidas;
- c. Descrever os principais achados histológicos de algumas oftalmopatias e sua possível associação com a presença do parasito.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Os cães utilizados neste estudo foram oriundos de 23 clínicas veterinárias particulares (sendo pelo menos duas em cada Regional Municipal), do Hospital

Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG e de experimentos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Foram selecionados 100 animais de forma aleatória em relação ao sexo, idade, peso e raça, positivos para LVC pelos testes de RIFI e ELISA, de acordo com parâmetros estabelecidos pela Fundação Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, 2001), cujos exames foram realizados no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Vinte seis cães pertencentes aos experimentos e quinze animais de proprietários possuíam diagnóstico parasitológico positivo baseado na identificação de formas amastigotas à microscopia óptica de luz.

Os animais foram submetidos à avaliação clínica e oftalmológica e posteriormente classificados em sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, em conformidade com o sugerido por Mancianti et al. (1988). Também foram individualizados quanto à presença ou não de enfermidades oculares. Em seguida, os animais que apresentavam manifestações oculares e perioculares foram classificados de acordo com o tecido acometido e o tipo de patologia. Após serem numerados, foi preenchida uma ficha de avaliação clínica e oftalmológica descrevendo as alterações diagnosticadas.

4.2. Avaliação oftalmológica

Após o exame clínico com avaliação dos principais parâmetros vitais, realizou-se semiotécnica oftalmológica, incluindo inspeção das pálpebras, sistema lacrimal e bulbo ocular. Esta avaliação foi realizada com o auxílio de fonte de luz apropriada¹,

¹ Lanterna Maglite - Mag Instruments - California - EUA

tiras para teste lacrimal de Schirmer², tonometria de aplanção³, oftalmoscopia direta⁴ e oftalmoscopia indireta⁵. O acompanhamento por documentação fotográfica foi realizado em todos os bulbos oculares e anexos examinados, com auxílio de câmera digital⁶.

4.3. Colheita e preparação de material

Amostras de sangue de cada animal foram colhidas por venopunção e colocadas em frascos sem anticoagulante. Posteriormente, o soro sanguíneo foi obtido por centrifugação a 1500 G por 10 minutos e congelado a -20°C até o momento da realização dos testes.

Todos os animais foram positivos aos testes de RIFI e ELISA. Na primeira metodologia, os cães que apresentaram títulos de IgG iguais ou superiores a 1:40 foram considerados positivos. Os resultados foram expressos em títulos de anticorpos, obtidos pelo fator dois de diluição, até a diluição máxima final. Todas as amostras negativas foram confirmadas por meio de repetição. Para a segunda metodologia, a leitura foi efetuada em leitor de ELISA⁷ a 490 nm. O ponto de corte correspondeu à média de absorbância de oito amostras de soro de cães negativos para *L. (L.) chagasi*, mais três desvios-padrão testados em cada placa. A média da duplicata de cada soro testado foi dividida pelo valor de corte da placa com o objetivo de determinar o

² Schirmer Tear Test - Schering-Plough Animal Health - New Jersey - EUA

³ TonoPen XL - Mentor O & O - Massachusetts - EUA.

⁴ Oftalmoscópio Heine K180 - Heine Optoteknik - Herrsching - Alemanha

⁵ Oftalmoscópio indireto binocular - Opto Eletrônica Ltda. - São Paulo - SP

⁶ Mavica CD500 - Sony Co. Tóquio - Japão

⁷ Bio-Rad 2550 Model 550, Microplate Reader Bio-Rad Laboratories - Califórnia - USA

índice de reatividade (IR), segundo Antas e colaboradores (2000). Soros com valores de IR igual ou maior que um foram considerados positivos.

Oito animais foram eutanasiados e tiveram seus tecidos utilizados para estudos histopatológicos, de acordo com normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA / UFMG) sob o protocolo n° 123/05. A eutanásia foi realizada com base na resolução n° 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de sacrifício em animais. Utilizou-se de tiopental sódico⁸ endovenoso, na dose de 200 mg/kg, suficiente para obtenção de parada cardíaca e respiratória.

Coletaram-se fragmentos das pálpebras e glândulas lacrimais. Os bulbos oculares foram removidos após cantotomia lateral e dissecados por incisão no fórnice conjuntival, permanecendo a conjuntiva parcialmente aderida. Os músculos extra-oculares e a periórbita foram dissecados posteriormente em direção ao nervo óptico, que foi seccionado e o bulbo removido. A glândula lacrimal orbitária e a da terceira pálpebra também foram dissecadas e removidas. A borda palpebral foi dissecada em forma retangular e, quando possível, obtidas áreas acometidas e híginas no mesmo fragmento.

A secção do bulbo ocular foi realizada no sentido do plano antero-posterior, formando um meridiano do nervo óptico até a córnea. Em seguida, fatias do bulbo ocular, glândulas acessórias e pálpebras foram fixadas em solução de formol tamponado (pH 7,2) a 10%, desidratadas, diafanizadas, embebidas e incluídas em

parafina e cortadas com espessura de 4-5 µm em micrótomo, com posterior montagem em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas pela coloração HE e posteriormente analisadas ao microscópio óptico de luz⁹, de acordo com as recomendações de Luna (1968).

Os achados histológicos foram relatados de forma descritiva, de acordo com as alterações encontradas e estrutura acometida.

Para a técnica de imuno-histoquímica, seguindo-se as recomendações de Tafuri et al. (2004), secções desparafinadas foram submetidas à coloração pela estreptavidina-peroxidase, usando anticorpo monoclonal anti-leishmania comercial¹⁰, anticorpo policlonal e soro canino hiperimune como anticorpos primários. O anticorpo monoclonal foi utilizado na diluição 1:100 em PBS 0,01M.

Cortes histológicos de 5 µm, fixados em lâminas de vidro, foram inicialmente hidratados em soluções de álcoois decrescentes e a seguir submetidos a banhos em PBS (0.01M e pH 7.2). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado adicionando-se ao banho de PBS peróxido de hidrogênio a 4% (30 minutos à temperatura ambiente). O bloqueio de reações inespecíficas foi obtido com leite em pó a 5% incubado com anticorpo primário (diluição 1:100) em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, durante 18 a 24 horas em câmara úmida a 4°C. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado em câmara úmida por 30 minutos, lavada em PBS e novamente e incubada com streptavidina-peroxidase¹¹ por 30 minutos

⁸ Thionembutal - Laboratório Cristália S.A. - São Paulo - SP, Brasil

⁹ Carl Zeiss - Alemanha

¹⁰ CEDARLANE - Laboratories - Canadá

¹¹ LSAB+ Kit - Dako Corp. - St. Louis - USA

em câmara úmida, sempre à temperatura ambiente. A revelação foi realizada com solução 0,0024% de diaminobenzidina¹² e 0,016% de peróxido de hidrogênio por três minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por três segundos, lavadas, desidratadas, diafanizadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá.

Os controles negativos foram obtidos pela substituição dos anticorpos primários com soro de cão normal na diluição de 1:100 e/ou PBS em substituição dos anticorpos primários, em uma lâmina de cada bateria. Os controles positivos foram feitos utilizando-se uma lâmina com corte histológico de baço ou fígado de um cão naturalmente infectado e sabidamente com alto parasitismo, quando observado ao microscópio óptico de luz na coloração pela HE.

4.4. Definição da amostra e análise estatística

Como se trata da descrição das oftalmopatias de cães infectados com LV e sua associação com manifestações sistêmicas da doença, optou-se em trabalhar com percentagem. Os achados histológicos dos fragmentos do bulbo ocular, pálpebras e glândulas lacrimais foram detalhados de forma descritiva.

Para a estimativa da prevalência de oftalmopatias em cães com LC, obteve-se uma amostragem que refletiu da forma mais fiel possível a população canina total. Como as oftalmopatias em cães parasitados, na Europa, variam de 24,1% a 80,5% (Slappendel, 1988; Molleda et al., 1993; Koutinas et al., 1999; Peña et al., 2000), perfazendo media aproximada de 50% e adotando-se 95% como grau de confiança, em concordância com a

metodologia recomendada na Publicação Técnica nº18 do Centro Panamericano de Zoonoses (Procedimentos..., 1979) para estudo da prevalência por amostragem, aplicou-se à fórmula:

$$n = p(100-p) \cdot \alpha^2 / (d \cdot p/100)^2 \text{ onde:}$$

n = número de amostras para estimar a prevalência em uma população infinita;

p = prevalência esperada (50%);

α^2 = fator determinante do grau de confiança (4);

d = erro amostral (20%).

$$n = 50(100-50) \cdot 4 / (20 \cdot 50/100)^2 = 100 \text{ cães}$$

As vantagens de um estudo amostral são as reduções de tempo e custo de execução, a possibilidade de inferir os resultados obtidos para todo o universo e permitir a obtenção de resultados mais precisos. A principal desvantagem consiste na diferença em relação ao universo devido à variabilidade dos indivíduos. Isso corresponde ao erro amostral que pode ser medido e no estudo em questão representou 20% (Torres, 2003).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação clínica geral

Dos 100 animais examinados, 50% eram machos com idade variando entre três meses e 10 anos (média de quatro anos e sete meses). A amostragem era bastante distinta em relação ao porte e raça. Em relação ao peso, encontraram-se animais entre dois e 48 kg, com média de 17 kg. Pertenciam a 24 raças diferentes, sendo os mestiços (37 cães), Poodles (oito cães), Pastores Alemães, Retrievers do Labrador e Rottweilers (seis cães) os mais frequentes.

¹² DAB - Sigma - St. Louis - USA

Baseado na classificação de Mancianti et al. (1988), encontraram-se 40 cães sem sinais clínicos sistêmicos, 21 oligosintomáticos e 39 sintomáticos. Excetuando as oftalmopatias, os sintomas clínicos mais freqüentes nos cães oligosintomáticos e sintomáticos (60 animais) foram linfadenopatias em 46 (76,7%), dermatites em 37 (61,7%), emagrecimento em 23 (38,3%) e onicogrifose em 20 (33,3%). Dentre os achados dermatológicos se destacaram a dermatite e alopecia periocular; a dermatite foi observada em 30 cães (81,1%) e alopecia em 24 (64,9%). Três cães (8,1%) apresentaram demodicose confirmada por raspados de pele.

5.2. Avaliação oftalmológica

Quarenta e oito cães eram portadores de pelo menos uma das 14 oftalmopatias diagnosticadas. Neste grupo, 16 (33,3%) eram assintomáticos, oito (16,7%) oligosintomáticos e 24 (50%) sintomáticos. Os machos representaram 23 animais (48%) e as fêmeas 25 (52%), com idade variando de três meses a oito anos (média 4,2 anos) e peso entre três e 35 kg (média de 17,2 kg). As raças mais prevalentes foram 21 mestiços (43,8%), cinco Poodles (10,4%), quatro Rottweilers (8,3%) e três Retrievers do

Labrador (6,3%). Em relação ao número total de 96 olhos e anexos nos 48 animais houve maior prevalência de blefarite (23 olhos – 23,9%) (FIG. 1, 2 e 3), uveíte anterior (20 – 20,8%) (FIG. 4 e 5), conjuntivite (19 – 19,8%) (FIG. 6 e 7), ceratoconjuntivite seca (18 – 18,7%) (FIG. 8 e 9) e alopecia periocular (12 – 12,5%) (FIG. 10). Outras alterações oculares menos freqüentes incluíram panuveíte (FIG. 11), descolamento de retina (FIG. 12) e ceratite, dentre outras (TAB. 1).

Em relação ao número de animais envolvidos, observou-se como oftalmopatia mais prevalente a uveíte anterior, que foi diagnosticada em 13 animais, seguida por blefarite (12), conjuntivite (10) ceratoconjuntivite seca (10) e alopecia periocular (6) (TAB. 2).

Quando consideradas as diversas estruturas oculares, as pálpebras foram acometidas em 37,5%, úvea em 29,2%, esclera em 19,8%, sistema lacrimal em 18,6%, córnea em 9,4%, retina em 8,3% e cristalino em 5,2% (TAB. 3). Ambos os segmentos oculares foram envolvidos, sendo o anterior mais notadamente acometido (82,6%) em relação ao posterior (11,4%) e, em 6,1% dos casos, havia alterações em todo o bulbo.

Tabela 1 - Oftalmopatias diagnosticadas em 48 cães (96 olhos) soropositivos para leishmaniose visceral em relação ao número de olhos (Belo Horizonte - MG).

Oftalmopatias	Olhos acometidos	Prevalência (%)
Blefarite	23	23,9
Uveíte anterior	20	20,8
Conjuntivite	19	19,8
Ceratoconjuntivite seca	18	18,7
Alopecia periocular	12	12,5
Panuveíte	7	7,3
Descolamento de retina	7	7,3
Ceratite	6	6,2
Degeneração corneana	3	3,1
Catarata	3	3,1
Esclerose nuclear	2	2,0
Glaucoma	1	1,0
Nódulo iridiano	1	1,0
Nódulo palpebral	1	1,0

Tabela 2 - Oftalmopatias diagnosticadas em 48 cães soropositivos para leishmaniose visceral em relação ao número de animais (Belo Horizonte - MG).

Oftalmopatias	Animais acometidos	Prevalência (%)
Uveíte anterior	13	27,1
Blefarite	12	25,0
Conjuntivite	10	20,8
Conjuntivite seca	10	20,8
Alopecia periocular	6	12,5
Panuveíte	4	8,3
Descolamento de retina	4	8,3
Ceratite	4	8,3
Degeneração corneana	2	4,2
Catarata	2	4,2
Esclerose nuclear	1	2,1
Glaucoma	1	2,1
Nódulo iridiano	1	2,1
Nódulo palpebral	1	2,1

Tabela 3 - Oftalmopatias diagnosticadas em 48 cães soropositivos para leishmaniose visceral em relação à estrutura acometida (Belo Horizonte - MG).

Tecido acometido	Olhos envolvidos	Prevalência (%)
Pálpebras	36	37,5
Úvea	28	29,2
Esclerótica	19	19,8
Sistema lacrimal	18	18,8
Córnea	9	9,4
Retina e disco óptico	8	8,3
Cristalino	5	5,2

Do total de 100 animais (200 olhos), 76 olhos (38%) apresentaram pelo menos uma alteração ocular. Considerando apenas os cães com oftalmopatias (48), estas lesões ocorreram de forma bilateral em 38 casos (79,2%) e diagnosticou-se uma única alteração ocular, podendo ser uni ou bilateral, em 31 (64,6%) dos animais.

Em treze animais (17,6%) dos 74 que possuíam proprietário, as manifestações

oculares e perioculares constituíram a principal queixa e motivo da consulta oftalmológica especializada. Estas alterações ocorreram de forma bilateral em 10 animais, sendo quatro com uveíte (seis olhos - 23,1%), três com conjuntivite (seis olhos - 19,2%), dois com descolamento de retina (quatro olhos - 15,4%) e um com catarata (dois olhos - 7,7%) (TAB. 4).

Tabela 4 - Oftalmopatias diagnosticadas em 13 cães soropositivos leishmaniose visceral, cujo motivo da consulta foi alteração ocular (Belo Horizonte - MG).

Oftalmopatia	Animais	Olhos acometidos	Prevalência (% olhos)
Uveíte	4	6	23,1
Conjuntivite	3	6	23,1
Blefarite	3	5	19,2
Descolamento de retina	2	4	15,4
Catarata	1	2	7,7

5.3. Exames laboratoriais, histopatológicos e imuno-histoquímicos

Todos os animais foram positivos aos testes de RIFI e ELISA. A diluição final observada na RIFI variou entre 1:160 a 1:20.480. Os vinte e seis cães naturalmente infectados apresentaram formas amastigotas à microscopia em amostras teciduais oriundas do fígado,

baço ou medula óssea, conforme protocolo de diagnóstico. Após exame exaustivo, não se encontraram formas amastigotas nos bulbos oculares e em seus anexos através da histopatologia na coloração HE ou da IHQ, embora dois cães portadores de oftalmopatias apresentassem formas amastigotas em material de raspado conjuntival.

As pálpebras apresentaram alterações significativas em seis amostras, com presença de infiltrado inflamatório misto focal a difuso e leve a acentuado, com envolvimento das camadas da epiderme e derme em todos os casos. Em três amostras havia degeneração balonosa focal ou multifocal das células epiteliais e em duas, acantose moderada e hiperqueratose ortoqueratócica difusa de intensidade leve a moderada (FIG. 13). Notaram-se áreas focais ou multifocais de ulceração do epitélio palpebral e, adjacente a estas regiões, proliferação de tecido conjuntivo fibroso associado a infiltrado inflamatório perilesional misto focal e discreto a moderado. Na derme de dois animais evidenciou-se infiltrado inflamatório perivascular linfo-histio-plasmocitário multifocal de grau discreto a leve. Na derme profunda, próxima à camada muscular, observou-se um infiltrado inflamatório difuso e acentuado histio-plasmocitário entremeando as glândulas anexas em duas amostras.

Cinco animais apresentaram alterações microscópicas relevantes na terceira pálpebra. Em três deles havia erosão focal do epitélio, variando de discreta a extensa, associada com infiltrado inflamatório moderado a acentuado com predomínio de macrófagos, plasmócitos e neutrófilos, acompanhando graus diversos de hemorragia. Discreta degeneração do epitélio desta estrutura foi observada em duas das três lâminas citadas anteriormente. Houve extensão do infiltrado entremeando as glândulas lacrimais de forma difusa e moderada a acentuada. Apenas infiltrado inflamatório linfo-histiocitário multifocal moderado foi visibilizado em uma lâmina e degeneração discreta e erosão focal do epitélio da terceira pálpebra em outra. Nesta última amostra, observou-se disposição periglandular do infiltrado

com dilatação dos ductos das glândulas lacrimais (FIG. 14).

A conjuntiva bulbar foi a estrutura mais acometida à avaliação histopatológica, ocorrendo alterações em nove das 16 amostras, que apresentavam infiltrado inflamatório diversificado entre focal a difuso e discreto a acentuado, com predomínio de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Em dois animais o infiltrado apresentou disposição notadamente periglandular e em outro havia degeneração multifocal discreta do epitélio.

Três tipos de uveíte ocorreram neste estudo, caracterizadas como (a) uma forma subclínica, com discreto edema de córnea, pequena diminuição da pressão intra-ocular e moderada miose; (b) uma forma clássica, com edema de córnea importante que impossibilitou a avaliação dos meios intra-oculares, associado com hiperemia conjuntival e blefaroespasmos e (c) panuveíte ou envolvimento de todo o bulbo ocular, com sinais evidentes de cronicidade. Observaram-se as formas subclínica e clássica nas manifestações agudas da doença, sendo mais frequentes de forma unilateral em cães assintomáticos ou oligosintomáticos. Já a forma crônica, com presença de panuveíte, foi diagnosticada em cães sintomáticos e de forma bilateral.

Seis animais apresentavam alterações na íris sendo cinco com irite e um com formação nodular. Linfócitos e plasmócitos predominaram de forma marcante no estroma da estrutura. Este infiltrado estava disposto de forma focal a difusa e intensidade leve a acentuada (FIG. 15). Na amostra com espessamento nodular havia proliferação difusa de melanócitos. Entremeando estas células notaram-se focos de infiltrado

inflamatório discretos, compostos por macrófagos e neutrófilos.

O corpo ciliar estava alterado em cinco das 16 amostras examinadas. Todas apresentavam ciclite caracterizada por infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário focal a difuso e discreto a acentuado.

O limbo estava envolvido em quatro amostras, onde se observou infiltrado inflamatório moderado e multifocal com grande variedade em relação ao tipo celular. A córnea foi acometida como extensão deste infiltrado em uma amostra.

Dois animais dentre os 16 apresentaram alterações microscópicas na córnea, sendo um deles como extensão da inflamação do limbo e o outro com perda difusa e acentuada do epitélio anterior, necrose das células epiteliais e formação de uma

monocamada celular sobre o estroma. Observaram-se ainda angiogênese discreta e infiltrado inflamatório moderado e multifocal coalescente, constituído principalmente de linfócitos e histiócitos (FIG.16).

A coróide estava espessada em duas das 16 amostras examinadas. Notaram-se vasos dilatados associados com infiltrado inflamatório predominantemente linfo-plasmocitário multifocal discreto a moderado. Adjacente à gordura periorbital observou-se áreas hemorrágicas multifocais em duas amostras.

Não se evidenciaram alterações microscópicas no cristalino, disco óptico ou nervo óptico nas 16 amostras colhidas.



Figura 1 - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*. Notar blefarite difusa e intensa com envolvimento das glândulas de meibômio.



Figura 2 - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*. Notar blefarite nodular com formações de diversos nódulos nas bordas pálpebrais.



Figura 3 - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*. Notar blefarite ulcerativa com erosões na região periocular medial.

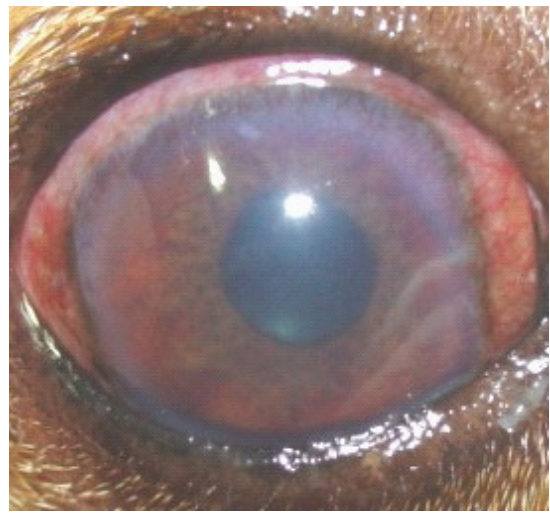


Figura 4 - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*. Notar uveíte anterior, injeção ciliar, edema de córnea e íris, hifema e miose.



Figura 5 - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*. Notar uveíte, hiperemia conjuntival e edema de córnea intenso.



Figura 6 - Fotografia de olho esquerdo de cão com *Leishmania chagasi*. Notar panuveíte, injeção ciliar, edema e vascularização corneana.

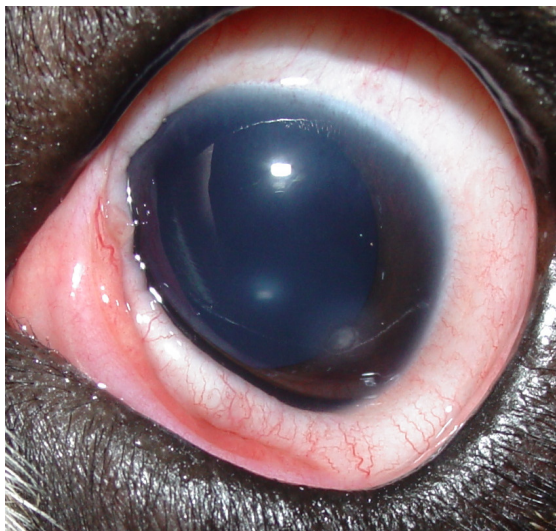


Figura 7 - Fotografia de olho esquerdo de cão com *Leishmania chagasi*. Notar conjuntivite, quemose acentuada e hiperemia conjuntival moderada.



Figura 8 - Fotografia de olho esquerdo de cão com *Leishmania chagasi*. Notar conjuntivite, hiperemia conjuntival e acúmulo de secreção mucopurulenta.



Figura 9 - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*. Notar CCS com intenso acúmulo de secreção ocular mucosa na superfície ocular.



Figura 10 - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*. Notar CCS com moderado acúmulo de secreção mucosa.

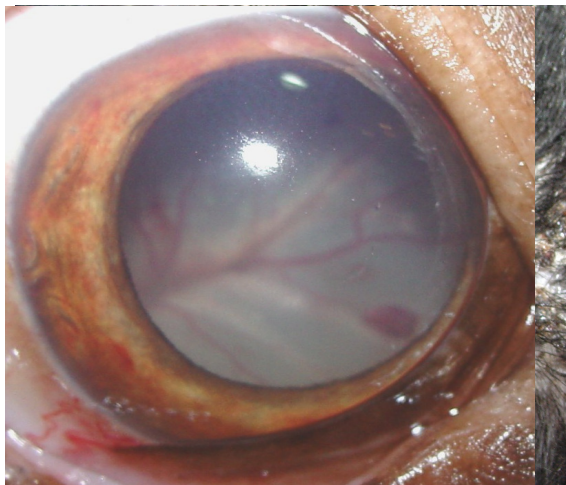
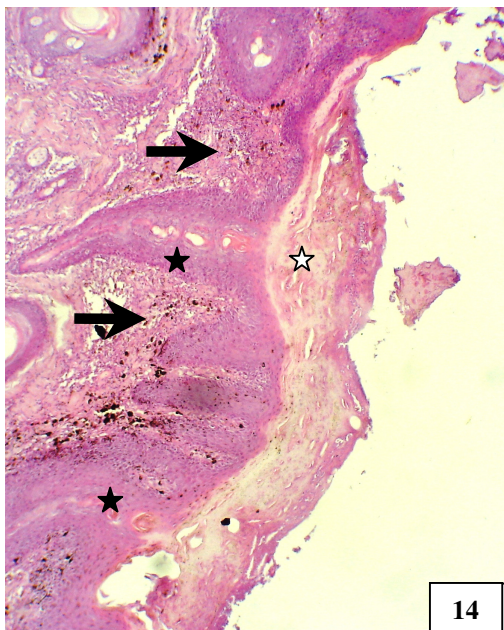
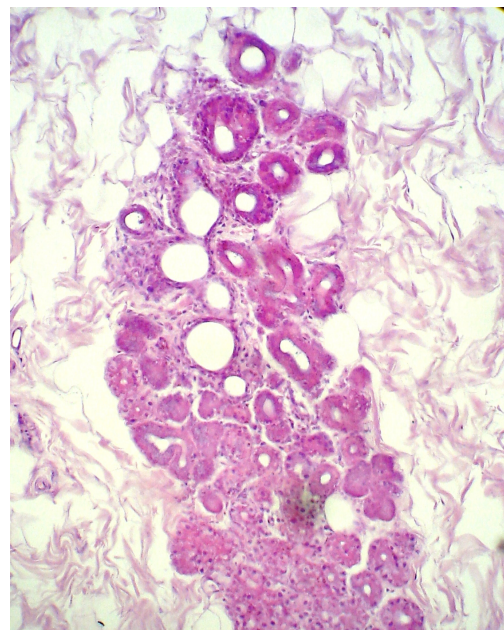


Figura 11 - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*. Notar alopecia periocular na porção medial e formações nodulares corneococonjuntivais.

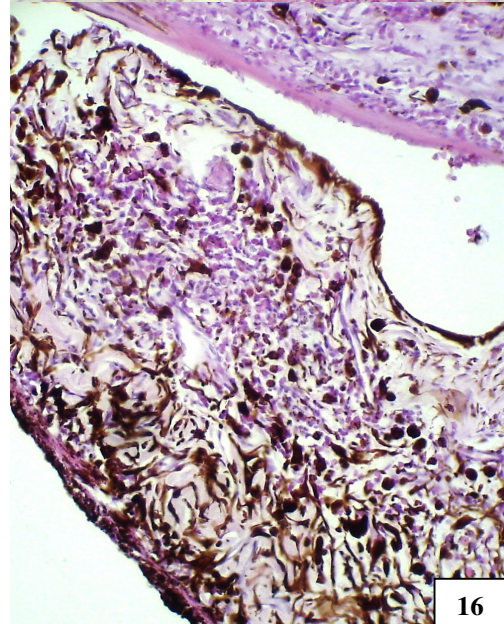
Figura 12 - Fotografia de olho direito de cão com *Leishmania chagasi*. Notar descolamento de retina total e hemorragia retiniana.



14



15



16

Figura 13. Fotomicrografia da pálpebra de cão positivo, mostrando blefarite linfoplasmocitária discreta e focal (seta) associada a hiperqueratose ortoqueratótica difusa (estrela branca) e acantose moderada (estrela preta). HE. 25x.

Figura 14. Fotomicrografia da terceira pálpebra de cão positivo, mostrando a dilatação focal dos ductos das glândulas lacrimais (estrela). HE. 50x.

Figura 15. Fotomicrografia da córnea de cão positivo, mostrando ceratite linfo-histiocitária multifocal moderada (seta) e discreto edema (estrela). HE. 100x.

Figura 16. Fotomicrografia da íris de cão positivo, mostrando irite linfoplasmocitária multifocal intensa (seta) associada a espessamento estromal. HE. 50x.

6. DISCUSSÃO

Os sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral neste trabalho sugerem diversas enfermidades, como as infecciosas, metabólicas, imunomediadas e parasitárias, dentre outras. Estas alterações incluíram dermatopatias, linfadenopatias, emagrecimento e onicogribose. Os principais sinais clínicos observados nestes cães foram também encontrados nos animais da Europa (Ciaramella et al., 1997 e Koutinas et al., 1999). No que concerne às oftalmopatias diagnosticadas em animais com LVC em Belo Horizonte, Brasil, encontrou-se similaridade em relação aos relatos científicos do Velho Mundo (Roze, 1986a; Molleda et al., 1993; Koutinas et al., 1999; Peña et al., 2000). Entretanto, as alterações microscópicas do bulbo ocular e seus anexos foram pouco frequentes neste trabalho frente aos achados de Molleda e colaboradores (1993), embora estes autores não detalhassem qual a origem destes cães nem tão pouco se amostra estudada foi incluída no projeto de forma aleatória ou proposital.

Em relação à frequência de lesões oculares em cães assintomáticos como única alteração da doença, valores encontrados no Velho Mundo são inferiores àqueles do Brasil. Não foi possível identificar os fatores responsáveis por esta diferença, pois os trabalhos consultados não especificaram quais eram estas alterações oculares diagnosticadas de forma precoce e anteriormente ao desenvolvimento de outras lesões sistêmicas.

As oculopatias mais prevalentes nos cães com leishmaniose assintomáticos encontradas neste trabalho estão de acordo com Fulgêncio e colaboradores (2004). As características clínicas destas

lesões oculares muitas vezes sugerem o envolvimento de uma doença sistêmica (Peña et al., 2000 e Fulgêncio et al., 2004; Fulgêncio et al., 2006). Entretanto, formas singulares de certas desordens oftalmológicas, como blefarite, uveíte, conjuntivite e ceratoconjuntivite seca despertam a suspeita do envolvimento de doença sistêmica.

Observou-se uma grande disparidade em relação à prevalência de oftalmopatias nos países europeus, possivelmente, resultante de diferentes metodologias e técnicas semiológicas utilizadas, como nos estudos de Slappendel (1988), Molleda e colaboradores (1993) e Koutinas e colaboradores (1999). Por outro lado, Ciaramella e colaboradores (1997) encontraram uma menor frequência de portadores de oftalmopatias dentre os animais parasitados, o que pode ser explicado pelo fato destes pesquisadores não considerarem a alopecia periocular como uma enfermidade oftálmica, mas sim dermatológica.

A maior frequência de envolvimento ocular bilateral em relação ao unilateral foi relatada por outros autores. Embora a leishmaniose inicialmente acometa apenas um olho, normalmente durante o curso da doença ocorre o envolvimento bilateral associado à progressão de outras enfermidades sistêmicas (Molleda et al., 1993; Koutinas et al., 1999; Peña et al., 2000; Roze, 2004; Fulgêncio et al., 2006).

Considerando a ocorrência de alterações nos diversos tecidos oculares, as pálpebras, a úvea, a conjuntiva e o sistema lacrimal foram mais acometidos em ordem decrescente. Estes resultados diferem de Molleda e colaboradores (1993), que identificaram uma maior prevalência de lesões na conjuntiva e córnea.

A blefarite foi a oftalmopatia mais freqüentemente observada, sendo diagnosticadas três formas clínicas distintas, em concordância com a literatura (Molleda et al., 1993; Peña et al., 2000; Fulgêncio et al., 2006). A blefarite difusa apresentou características clínicas similares e também constituiu a desordem palpebral mais freqüente nos estudos de Peña e colaboradores (2000) e Fulgêncio e colaboradores (2006).

O diagnóstico da inflamação das pálpebras foi baseado na apresentação clínica, verificando-se a presença de edema e eritema palpebrais, hiperemia conjuntival, epífora e crostificação periocular, que podem estar isolados ou associados e variando em intensidade de acordo com o tipo de blefarite presente.

Dentre as etiologias de blefarite parasitária, destacaram-se a demodicose e escabiose (Scott et al., 2001). Entretanto, não se diagnosticou ácaros nas regiões palpebrais acometidas através de raspados de pele. Os dois cães que apresentaram *Demodex canis* na pele não apresentavam oftalmopatias.

Metade dos animais que portavam alopecia periocular também apresentava CCS bilateral. Os sinais clínicos desta alteração, descrita por Peña e colaboradores (2000), assemelharam-se aos deste estudo. Quatro dos seis animais com alopecia periocular também possuíam outras de área de alopecia disseminadas pelo corpo. Não se identificaram ácaros ou fungos nas amostras oriundas de raspados da pele periocular, embora três dos 24 cães portadores de dermatopatias alopécicas apresentassem *Demodex canis*. Como já citado, estes cães portadores de ácaros na pele não apresentavam oftalmopatias.

As principais alterações microscópicas observadas nas pálpebras corroboram

com aquelas citadas por McConnel e colaboradores (1970) e Giles e colaboradores (1975). Conforme citado por Naranjo e colaboradores (2005), também se observou infiltrado disposto de forma periglandular no tecido anexo às pálpebras. Embora estas estruturas sejam freqüentemente envolvidas pela doença, sua avaliação microscópica não foi realizada rotineiramente pela maioria dos autores citados.

Diagnosticou-se CCS nos animais sem sinais de conjuntivite primária e que apresentaram ao TLS valores iguais ou inferiores a nove milímetros e acúmulo de secreção mucosa. Não existe consenso em relação à freqüência de CCS em cães com leishmaniose. Alguns estudos encontraram baixa prevalência, variando entre 2,0% a 5,1% (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999; Peña et al., 2000). Não há, nestes estudos, informações sobre a mensuração da produção lacrimal de forma qualitativa ou quantitativa em todos os animais. Além disso, não foram citados os parâmetros nosológicos da CCS.

Molleda e colaboradores (1993) relataram 26,8% dos animais da Espanha e Fulgêncio e colaboradores (2006) 15,4% cães no Brasil com LVC e baixa produção lacrimal, valores próximos dos 18,7% encontrados neste estudo. A elevada incidência de CCS na leishmaniose pode ser relacionada com a acentuada inflamação das glândulas lacrimais provocando a obstrução de seus ductos secretores (Roze, 1986a). A inflamação no aparato lacrimal com disposição periglandular do infiltrado confirmou os achados de Garcia-Alonso e colaboradores (1996) e Naranjo e colaboradores (2005). Ainda foi visibilizada a dilatação dos ductos lacrimais com retenção de secreções (Brito, 2004 e Naranjo et al., 2005).

A obstrução dos ductos das glândulas lacrimais provocada pelo processo inflamatório adjacente foi a provável etiologia da CCS. Ainda não se sabe qual é a real contribuição da perda da sensibilidade da córnea na manutenção lacrimal e qual seria a intensidade desta injúria para reduzir significativamente a produção de lágrimas. Esta observação corrobora com a teoria postulada por Roze (1986a) e também proposto por Naranjo e colaboradores (2005).

A conjuntivite foi a alteração ocular mais freqüente entre os animais assintomáticos e com apresentação bilateral em 90% dos casos, concordando com os achados de Fulgêncio e colaboradores (2004), que encontraram esta alteração em 60% dos cães deste grupo. A quemose observada em dois animais também foi descrita por Roze (1986b), Moleda e colaboradores (1993), Peña e colaboradores (2000) e Fulgêncio e colaboradores (2006).

A maior freqüência de alterações conjuntivais microscópicas encontrada neste trabalho não confirma os achados de Molleda e colaboradores (1993), que não descreveram detalhes acerca deste envolvimento, embora a estrutura tenha sido a mais acometida ao exame macroscópico, como em outros trabalhos (Koutinas et al., 1999 e Brito, 2004).

Nódulos ou granulomas corneconjuntivais formados por infiltrado linfo-histio-plasmocitário foram descritos por Molleda e colaboradores (1993) e Peña e colaboradores (2000). Dois cães deste estudo apresentaram tais nódulos, o primeiro sintomático com blefarite nodular bilateral e o segundo oligosintomático e de forma unilateral. Como estes nódulos são notadamente ricos em formas amastigotas, raspados conjuntivais podem evidenciar o parasito em casos duvidosos. Neste estudo, os

raspados conjuntivais mostraram o agente em dois dos 16 animais com oftalmopatias sem sinais sistêmicos da doença, em conformidade com a descrição de Peña et al. (2000). Em dois cães com conjuntivite bilateral o raspado conjuntival logrou sucesso em evidenciar o parasito. Esta metodologia pouco invasiva e de fácil realização pode constituir uma opção prática e barata de diagnóstico em cães com leishmaniose visceral.

Apesar da importância da conjuntiva nas reações imunológicas, a conjuntivite pode estar diretamente relacionada à presença do parasito, pois este é ocasionalmente encontrado em estudos histopatológicos e, eventualmente, em raspados conjuntivais. Fazem-se necessários novos estudos com o objetivo de determinar qual a importância da presença do parasito e também dos mecanismos imunomediados na etiopatogenia da conjuntivite, bem como nas formações nodulares na conjuntiva e limbo de cães com leishmaniose visceral.

O envolvimento da córnea ocorreu principalmente por extensão de processos inflamatórios da íris, corpo ciliar ou limbo, principalmente CCS e uveíte anterior. Não foi notada alteração corneana de forma isolada, em concordância com o relatado por Roze (1986b). As principais alterações visibilizadas nesta estrutura se assemelham ao descrito na literatura consultada (McConnel et al., 1970; Giles et al., 1975; Molleda et al., 1993), discordando de Dias (1998), que não encontrou lesões significativas. Os achados microscópicos no limbo estão de acordo com outros pesquisadores (McConnel et al., 1970; Garcia-Alonso et al., 1996).

Ainda não está elucidado se a ceratite está envolvida na patogenia da CCS. Apesar de sugeridos outros fatores, acredita-se que a redução da produção lacrimal causada pela CCS ocorra anteriormente à inflamação da córnea, comprometendo a fisiologia e transparência desta estrutura, como já relatado por Fulgêncio e colaboradores (2005).

É relevante especular acerca do desenvolvimento de degeneração corneana em dois cães com leishmaniose visceral, pois doenças renais associadas com uremia ocorrem frequentemente nestes animais e constituem uma das causas desta alteração. Roze (2002) também aventou a possibilidade de correlação entre degeneração corneana e a leishmaniose.

Em concordância com outros estudos (Slapendel, 1988; Molleda et al., 1993; Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999; Fulgêncio et al., 2006), a uveíte não foi a alteração ocular mais prevalente, quando considerados o número de olhos acometidos. Entretanto, quando se considera o número de animais, há concordância com os achados de Peña e colaboradores (2000), pois a alteração passa a ser a manifestação ocular mais comum.

Em relação ao tipo de infiltrado inflamatório no trato uveal, houve similaridade deste estudo com outros trabalhos (McConnel et al., 1970; Giles et al., 1975; Molleda et al., 1993; Garcia-Alonso et al., 1996; Dias, 1998; Brito, 2004). Entretanto, a dilatação vascular na úvea reportada neste trabalho foi observada apenas por Garcia-Alonso e colaboradores (1996) e Brito (2004). Não foi encontrada correlação entre a leishmaniose e o espessamento nodular com proliferação difusa de melanócitos

no estroma da íris observada em uma amostra.

As características microscópicas sugerem que a úvea posterior ou a coróide foram infiltradas por células inflamatórias oriundas da úvea anterior. Esta forma de distribuição do infiltrado inflamatório foi relatada por McConnel e colaboradores (1970) e Giles e colaboradores (1975). As alterações observadas na coróide confirmam aquelas sugeridas por Brito (2004).

O segmento posterior do olho provavelmente foi acometido como extensão de processos inflamatórios da úvea anterior, pois todos os animais com uveíte posterior também apresentavam uma inflamação importante na íris e/ou corpo ciliar, caracterizando a panuveíte. Nos animais onde foi possível avaliar os meios intra-oculares notou coriorretinite em dois olhos. Outras alterações do segmento posterior observadas por Roze (1986a) e Peña e colaboradores (2000), apesar da possibilidade de estarem presentes, não foram diagnosticadas neste estudo, pois a diminuição da transparência dos meios intra-oculares e a resistência pupilar à ação dos midriáticos dificultaram a avaliação fundoscópica do bulbo ocular.

Dos quatro animais com descolamento de retina, três a apresentavam de forma bilateral. Estes cães portavam nefropatia grave, diagnosticada pela urinálise e determinação da uréia e creatinina plasmáticas. Suspeita-se que estes animais eram hipertensos secundariamente à insuficiência renal, sendo esta a causa do descolamento de retina e, conseqüentemente, da perda de função visual, em concordância com outros relatos (Dimski e Hawkins, 1988; Roze, 2002; Roze, 2004; Fulgêncio et al., 2006).

O glaucoma é raramente observado na LVC e ocorre como consequência da uveíte (Molleda et al., 1993; Peña et al., 2000; Roze, 2002; Roze, 2004). Tais inflamações determinam aumento da celularidade do humor aquoso e/ou hifema e hipópio, apresentam real possibilidade de desenvolvimento de glaucoma. O achado de um único caso corrobora as observações destes autores.

Os animais diagnosticados com catarata neste trabalho eram das raças Poodle e Cocker Spaniel Inglês. Embora nenhuma correlação esteja estabelecida entre a formação da catarata e a leishmaniose, é prudente assumir que distúrbios no humor aquoso possam envolver a lente, opacificando-a. Entretanto, como estas raças citadas apresentam predisposição hereditária à formação de opacidades na lente ou em sua cápsula, podem ser frequentemente acometidos pela catarata sem quaisquer correlações com a LVC, como sugerem estes achados.

Um cão oligosintomático, após a avaliação oftalmológica, apresentava esclerose nuclear bilateral e formação nodular na íris do olho esquerdo. Na literatura consultada não há descrição da associação de esclerose lenticular em cães com LV e acredita-se, como na catarata, que a esclerose e a formação nodular na íris foram achados ocasionais.

7. CONCLUSÕES

Dentro das condições em que foi realizado o presente trabalho, pode-se concluir que:

- ✓ A prevalência de manifestações oculares e perioculares em cães com leishmaniose visceral em Belo Horizonte - MG é de 48%;

- ✓ Blefarite, uveíte, conjuntivite e ceratoconjuntivite seca foram as oftalmopatias mais prevalentes;
- ✓ Algumas enfermidades oculares, como esclerose nuclear, catarata e nódulos na íris e pálpebra não têm correlação provável com a leishmaniose;
- ✓ As oftalmopatias nos cães com leishmaniose visceral podem ser a primeira ou a única alteração da doença, constituindo o motivo da consulta veterinária;
- ✓ Os achados histopatológicos mais frequentes incluem infiltrado inflamatório linfo-histio-plasmocitário na pálpebra, terceira pálpebra, conjuntiva e trato uveal;
- ✓ Não se identificaram formas amastigotas à avaliação histopatológica pela coloração HE ou pela técnica de imuno-histoquímica, nos tecidos do bulbo ocular ou seus anexos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUD, I. A.; RAGAB, H. A. A.; HANNA, L. S. Experimental ocular leishmaniasis. *British Journal Ophthalmology*, v. 54, p. 256-262, 1970.
- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N.; et al. An experimental model for canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 13, n. 5, p. 537-550, 1991.
- ALENCAR, J. E. *Calazar canino: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil*. 1959. 342 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral

- leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro*, v. 20, p. 259-265, 2004.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; et al. Distribution and relationships between clinical and pathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*, v. 18, p. 147-156, 2003.
- ANTAS, P. R.; AZEVEDO, E. N.; LUZ, M. R.; et al. A reliable and specific enzyme-linked immunosorbent assay for the capture of IgG from human chagasic sera using fixed epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, v. 86, p. 813-820, 2000.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 28, p. 329-337, 2006.
- BARRAL, A.; BADARÓ, R.; BARAL, N. M. Isolation of *Leishmania amazonensis* from the bone marrow in case of American visceral leishmaniasis. *American Journal of the Tropical Medicine and Hygiene*, v. 35, p. 732-734, 1986.
- BARRIGA, O. O.; AL-KALIDI, N. W.; MARTIN, S.; et al. Evidence of immunosuppression by *Demodex canis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 32, p. 37-46, 1992.
- BRENNER, S.; SREBRNIK, A.; HAZAZ, B.; et al. Unusual immunofluorescent pattern in leishmaniasis (Oriental score). *Cutis*, v. 34, p. 60-62, 1984.
- BRITO, F. L. C. *Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (Canis familiaris LINNAEUS, 1758) infectados naturalmente por Leishmania chagasi (CUNHA & CHAGAS, 1937)*. 2004. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- CABRAL, M.; GRADY, J. O.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasitic Immunology*, v. 14, p. 531-539, 1992.
- CABRERA, M. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A.; et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 45, p. 79-83, 2003.
- CARRERA, L.; FERMIN, M. L.; TESOURO, M.; et al. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Experimental Parasitology*, v. 82, p. 139-146, 1996.
- CENSO Demográfico 2000. Disponível em < <http://www.inmet.gov.br.html> > Acesso em: 18/09/2006.
- CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, v. 141, p. 539-543, 1997.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução n° 714, de 20 de junho de 2002. Brasília, 2002.
- COSTA VAL, A. P. *Tratamento da Leishmaniose visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas*. 2004. 125 f. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COSTA, C. A.; GENARO, O.; LANA, M. et al. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica

- utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 24, p. 21-25, 1991.
- COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 128, p. 149-155, 2005.
- CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Estudos sobre o parasito: leishmaniose visceral americana, nova entidade mórbida do Homem na América do Sul. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 32, p. 329-337, 1937.
- DANTAS-TORRES, F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog? *Veterinary Parasitology*, v. 136, p. 379-380, 2006.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em áreas endêmicas no Ceará. *Hospital*, v. 48, p. 61-76, 1955.
- DIAS, D. V. *Leishmaniose visceral canina: Estudo parasitológico, imunológico e histopatológico em olhos de cães*. 1998. 132 f. Dissertação (Doutorado em Oftalmologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro*, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.
- DIMSKI, D. S.; HAWKINS, E. C. Canine systemic hypertension. *Compendion Continus Education*, v. 10, p. 1152-1155, 1988.
- DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Observations et reflexions sur la leishmaniose généralisée du chien. *Archives du Institute Pasteur d'Algérie*. v. 13, p. 320-328, 1935.
- EZQUERRA, J. P. A. *Lãs leishmaniasis: de la biologia al control*. Philadelphia: W.B. Saunders. (2ª ed) 2001. Cap. 6, p. 157-159.
- FALCHETTI, E.; FAURE-BRAC, G. La leishmaniose canine à Nice. Étude épidémiologique. *Bulletin de La Société Pathologie Exotique*, v. 25, p. 1091-1099, 1932.
- FAURÉ-BRAC, G. La leishmaniose canine. *Revue Pathologique Complicetie Hygiene Général*, v. 33, p. 648-649, 1933.
- FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE SECOND INTERNACIONAL CANINE LEISHMANIASIS, 2002. Sevilha: Forum. Sumène, p. 21-24.
- FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Record*, v. 136, p. 514-516, 1995.
- FERRER, L.; MOLLEDA, C. P.; WALDER, E. Skin lesions in canine leishmaniasis. *Journal Small Animal Practice*, v. 29, p. 381-388, 1988.
- FISA, R.; RIERA, C.; GALLEGO, M.; et al. Nested PCR for diagnostic of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, v. 99, p. 105-111, 2001.
- FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal

- immunocompetence in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 56, p. 319-327, 1997.
- FREITAS, E; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, v. 137, p. 159-167, 2006.
- FULGÊNCIO, G. O.; SILVA, M. A. P.; BORGES, K. D. A.; et al. Ceratoconjuntivite seca em três cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) Chagasi*. *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, v. 25, Suplemento, p. 177-178, 2005.
- FULGÊNCIO, G. O.; VIANA, F. A. B.; MICHALICK, M. S. M. Alopecia periocular, blefarite, ceratoconjuntivite e uveíte: Manifestações oftálmicas da leishmaniose visceral canina? *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, v. 24, Suplemento, p. 31-32, 2004.
- FULGÊNCIO, G. O.; RIBEIRO, R. R.; BORGES, K. D. A.; MICHALICK, M. S. M.; VIANA, F. A. B. Manifestações oculares e perioculares da leishmaniose visceral canina: 65 casos (2003-2005). In: Congresso de Pequenos Animais da Anclivepa, 2006, Vitória, Anais..., p.87, 2006.
- GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D.; et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 18, p. 617-623, 1996.
- GELLAT, K. N. The canine eyelids. In: _____ . *Veterinary Ophthalmology* (2^a ed). Philadelphia: Williams & Wilkins, 1991, Cap. 6, p. 256-275.
- GENARO, O. *Leishmaniose Visceral Canina Experimental*. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 1993. 146 f. Dissertação (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GENARO, O.; DA COSTA, C. A.; WILLIAMS, P.; et al. Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.23, n.121, 1990.
- GILES, R. C.; HILDEBRANDT, P. K.; BECKER, R. L.; et al. Visceral Leishmaniasis in a dog with bilateral endophthalmitis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 11, p. 155-159, 1975.
- GINEL, P. J.; MOZOS, E.; FERNANDEZ, A.; et al. Canine pemphigus foliaceus associated with leishmaniasis. *Veterinary Records*, v. 133, p. 526-527, 1993.
- GRADONI, L. *The diagnosis of canine leishmaniasis*. In: PROCEEDINGS OF THE SECOND INTERNACIONAL CANINE LEISHMANIASIS, 2002. Sevilha: Forum. Sumène. 2002, p. 29-33.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 8, p. 332-334, 2002.
- HENDRIX, D. V. N. Diseases and surgery of canine conjunctiva. In: GELATT, K. N. *Veterinary Ophthalmology* (3^a ed). Philadelphia: Williams & Wilkins, Baltimore 1999. Cap. 18, p. 619-634.
- HO, E. A.; CHU, H. J.; YUAN I. C. Visceral leishmaniasis in dogs with special reference to skin examination and

ilium puncture. *Chinese Medical Journal*, v. 40, p. 889-894, 1947.

JEAUME, G. Um cas de leishmaniose naturalisada em cão no Marrocos. *Bull Bulletin de La Société Pathologie Exotique*, v. 225, p. 227-581, 1932.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*. v. 17, p. 279-289, 1999.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS. M. N.; et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 35, p. 376-383, 1999.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution: In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. *The leishmaniasis in Biology and medicine*. Londres: Academic Press 1987. Cap. 1, p. 1-120.

LEITÃO, J. L. S. Canine leishmaniasis. *Amatus*. v. 5, p. 318-326, 1946.

LEMAIRE, G.; SERGENT, E.; L'HÉRITIER, A. Recherches sur la leishmaniose du Chien d'Alger. *Bulletin de La Société Pathologie Exotique*. v. 6, p. 579-581, 1913.

LINARD, P. M.; NAGEM, R. L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 33, n. 4, p. 529-538, 1973.

LONGSTAFF, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F.; et al. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potential human health hazard. *Journal of Small Animal Practice*, v. 24, p. 23-30, 1983.

LUNA, L. G. Routine Staining Procedures. In. _____ *Manual of Histoologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology* (ed). New York: McGraw-Hill Book Co., 1968. Cap. 4, p. 32-46.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; et al. Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infestation of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 566-567, 1988.

MANUAL de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120 f.

MARSELLA, R.; GOPEGUI, R. Leishmaniasis: are emerging zoonoses. *International Journal of Dermatology*. v. 31, p. 801-814, 1998.

MAURICIO, I. L.; STOHARD, J. R.; MILES, L. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, v. 16, p. 188-189, 2000.

McCONNELL, E. F.; CHAFFEE, E. F.; CASHELL, I. G.; et al. Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 156, p. 197-203, 1970.

MICHALICK, M S. M.; GENARO, O.; CHAVES, K. M.; et al. Expansão da leishmaniose visceral em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 25, p. 89, 1992. Suplemento.

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE / CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. Leishmaniose visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos,

clínicos e medidas de controle. *Boletim Epidemiológico*, v. 6, p. 6-11, 2001.

MOLLEDA, J. M.; NOVALES, P. J.; GINEL, A.; et al. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v. 48, p. 173-178, 1993.

MOORE, C. P. Disease and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K. N. *Veterinary Ophthalmology* (3^a ed). Philadelphia: Williams & Wilkins, Baltimore 1999. Cap 16. p. 583-607.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*. v. 18, n. 8, p. 399-405, 2002.

MOZOS, E.; PÉREZ, M. J.; DAY, M. J.; et al. Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology*, v. 120, p. 257-268, 1999.

NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; et al. Characterization of lacrimal gland lesion and possible pathogenic mechanisms of keraconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 133, p. 37-47, 2005.

NATTAN-LARRIER, L.; GRIMARD, L. Étude comparative de tríos disinés au diagnostic sérologique du kala-azar. *Bulletin de La Société Pathologie Exotique*. v. 28, p. 658-665, 1935.

NICOLAU, S.; PEARD, C. H. Étude histo-physio-pathologique de l'oeil et du système nerveux dans la leishmaniose généralisée du chien. *Annalles du Institute Pasteur*, v. 5, p. 463-4485, 1936.

NICOLLE, C. Nouvelles acquisitions sur le kala-azar: cultures inoculations au chien, étiologi. *Hebd Séances Académique Science.*, v. 146, p. 498-499, 1908.

NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A.; et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural Leishmania infection. *Veterinary Parasitology*, v. 45, p. 33-47, 1992.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus*, v. 9, n. 2, p. 16-23, 1999.

OLIVEIRA, C. D.; ASSUNÇÃO, R. M. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 17, p. 1231-1239, 2001.

OWENS, S. D.; OAKLEY, D. A.; MARRYOTT, K.; et al. Transmission of visceral leishmaniasis though blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Medical Association*, v. 15, p. 1076-1083, 2001.

PEÑA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*, v. 3: p. 35-41, 2000.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 1, p. 229-225, 1994.

PIRMEZ, C. *Leishmaniose Tegumentar Canina. Estudo clínico, histopatológico e sorológica da infecção natural e experimental por L. brasiliensis*. 1986. 122 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia Patológica) Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE.
Disponível em:
<http://portal1.pbh.gov.br/pbh/index>.
Acesso em 18/09/06.

PROCEDIMENTOS para estudos de prevalência por muestreo - CEPANZO. Buenos Aires: Centro Pan-americano de zoonosis. 1979. 35p. (Nota técnica n° 18).

PUMAROLA, M.; BREVICK, L.; BADIOLA, L.; et al. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *Journal of Comparative Pathology*, v. 105, p. 279, 1991.

RIDLEY, D. S.; RIDLEY, M. J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. *Journal Pathology*; v. 141, p. 83-96, 1983.

ROSS, R. Notes on the bodies recently described by Leishman na Donovan. *British Medical Journal*, v. 22, n. 2, p. 1261-1262, 1903.

ROSYPAL, A. C.; ZAJAC, A. M.; TROY, G. C.; et al. Infections in immunocompetent and immune-deficient mice with promastigotes of a North American isolate of *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, v. 130, p. 19-27, 2005.

ROZE, M. Manifestations conjunctivales at cornenes de la leishmaniose. *Pratique Medecine et Chirurgie*, v. 4, p. 245-255, 1986a.

ROZE, M. Manifestations Oculaires de la leishmaniose canine. *Recueil de Medecine Veterinaire*, v. 162, p. 19-26, 1986b.

ROZE, M. Ocular manifestation of canine leishmaniasis. Diagnosis and treatment. *The globe Newsletter of the International Society of Veterinary Ophthalmology*, v. 13, 2002.

ROZE, M. Ophthalmologic implications in leishmaniasis. In: International Congress

on Canine leishmaniasis, 2004, Nápolis, Anais..., p.73-77, 2004.

SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; et al. Citokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopatology*, v. 88, p. 21-30, 2002.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, v.12, p. 315-317, 1998.

SARTORI, A.; VIANA DE OLIVEIRA, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; et al. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. *Parasite Immunology*, v. 9, p. 93-103, 1987.

SCALONI, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validations of a standardized enzyme-linked assay. *Veterinary Parasitology*, v.104, p.275-285, 2002.

SCOTT, D. W.; GRIFFIN, C. E.; MILLER, W. H. Diseases of eyelids, claws, anal sacs and ears. In: SCOTT, D. W.; GRIFFIN, C. E.; MILLER, W. H. (6^a ed) *Muller & Kirk's small animal dermatology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. Cap. 17, p. 1185-1190.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quartely*, v. 10, p. 1-16, 1988.

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. *Infectious Diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990. Cap. 79, p. 769-777.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; et al. Histological and Immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* infected dogs. *Journal Comparative Pathology*, v. 130, p. 7-12, 2004.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M.; et al. 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.

TORRES, Z. G. T. Amostragem. In: MEDRONHO, R. A. *Epidemiologia*. São Paulo: Editora Atheneu (2ª ed), 2003. Cap 20, p. 283-294.

VIEIRA, J. B.; COELHO, G. E. Visceral leishmaniasis or Kala-azar: the epidemiological and control aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, p. 85-92, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). TDR diseases/Diseases current portfolio. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish>. Acesso em 18/09/06.

XAVIER, S. C. *Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2002. 46 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

XU, K. P.; YAGI, Y.; TSUBOTA, K. Decrease in cornea sensitivity and changes in tear function in dry eye. *Cornea*, v. 15, n. 3, p. 235-239, 1996.