

**MARIANA AMATA MUDADO LOPES**

**Avaliação da presença de *Leishmania* sp. em ossos autoclavados ou armazenados em glicerol para enxertia cortical.**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Cleuza Maria de Faria Rezende

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Maria Norma Melo

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG

2013

Ficha catalográfica

Comissão Examinadora

---

Prof. Dra. Cleuza Maria de Faria Rezende  
Orientadora

---

Prof. Dra. Andrea Pacheco Batista Borges

---

Prof. Dr. Ricardo Gonçalves



Por todo carinho, amor, amizade e compreensão, dedico este trabalho a toda minha família,  
especialmente:  
Aos meus pais, Irma Elenise Amata Mudado e Sérgio Mudado Silva,  
Ao meu marido, Fernando César Vasconcelos Lopes,  
Aos meus irmãos, Fernando Amata Mudado e Flávia Amata Mudado,  
Às minhas avós Irma Bassi Amata e Orphila Mudado Silva,  
E aos meus queridos companheiros caninos Ludwig, Mussum, Paçoca, Rodin, Beethoven,  
Bismarck e Sherra.

### **Agradecimentos:**

Agradeço a Deus primeiramente pela vida, e pelas pessoas, oportunidades e momentos maravilhosos que colocou em meu caminho.

Ao meu marido Fernando César, meus pais, Irma e Sérgio, e meus irmãos, Flávia e Fernando, por sempre me apoiarem em meus projetos.

À minha orientadora Professora Cleuza Maria de Faria Rezende por sua amizade, dedicação, pelo conhecimento transmitido e também pelos votos de confiança que sempre me foram prestados.

À minha coorientadora Professora Maria Norma Melo pelo grande auxílio neste trabalho, tendo envolvimento em vários processos realizados, sempre de bom humor e com boa disposição para ajudar.

À professora Rogéria Serakides pelo auxílio com a interpretação histológica, pela amizade e pelo extenso conhecimento transmitido.

À professora Marivalda de Magalhães Pereira pela inestimável ajuda com os testes mecânicos de compressão.

Ao professor Wagner Luis Tafuri e à professora Izabela Ferreira Gontijo de Amorim pela amizade e pela colaboração nos exames de imuno-histoquímica.

À professora Ângela Maria Quintão Lana e ao técnico Danilo Gonçalves Bastos, por todos os ensinamentos de estatística que foram aplicados no projeto.

À professora Eliane Gonçalves de Melo e ao Professor Rafael Resende Faleiros pela colaboração para utilização do bloco cirúrgico.

Aos professores Andrea Pacheco Batista Borges e Ricardo Gonçalves pelas importantíssimas contribuições feitas a este trabalho durante a defesa da dissertação.

A todos os demais professores da pós-graduação que com certeza me ajudaram de alguma forma.

À doutoranda e técnica Soraia, por ter me ajudado e orientado inúmeras vezes nos procedimentos de cultura e PCR, pela amizade e atenção dedicadas.

Às técnicas Leimar, Vânia e Alice, pela ajuda com o processamento do material para exame histopatológico.

A todos os colegas do Laboratório de Leishmanioses, Paula, Gregório, Sidney, Juliana, Priscila, Guilherme, Moan, pela amizade e por toda ajuda prestada.

Aos colegas e amigos de pós-graduação Jessica, Omar, Felipe, Renato, Endrigo, Mariana e Rodrigo que muito me ajudaram nessa jornada.

Aos funcionários do Hospital Veterinário, Carlos, Terezinha, Tamires, Ronaldo, Flávia, Cleide, Ana, Sílvia, Joaquim, Messias e Adão, que sempre estiveram prontos para ajudar.

Às funcionárias da secretaria Luzzeti, Eliane, Rosangela, Lurdes, que muito me ajudaram com as tarefas burocráticas.

Aos técnicos Eduardo, Elias e Eli pela cooperação na realização dos exames radiográficos.

Aos residentes do HV, especialmente Erick e Leila, pela inestimável ajuda com os animais do experimento.

Às grandes amigas Livia e Adriana que sempre me incentivaram a continuar principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos animais utilizados neste experimento, pela colaboração com a pesquisa.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

---

## SUMÁRIO

---

	LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
	LISTA DE TABELAS.....	10
	LISTA DE FIGURAS.....	10
	LISTA DE QUADROS.....	12
	LISTA DE ANEXOS.....	12
	<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>14</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.</b>	<b>Leishmaniose Visceral Canina.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.1.</b>	<i>Apresentação clínica da LVC.....</i>	<i>17</i>
<b>2.1.2.</b>	<i>Ciclo de vida do parasita e vias de transmissão.....</i>	<i>19</i>
<b>2.1.3.</b>	<i>Técnicas Diagnósticas.....</i>	<i>20</i>
<b>2.2</b>	<b>Enxertos ósseos.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1.</b>	<i>Função e classificação.....</i>	<i>21</i>
<b>2.2.2.</b>	<i>Aloenxertos corticais.....</i>	<i>22</i>
<b>2.2.3.</b>	<i>Morfofisiologia do tecido ósseo.....</i>	<i>24</i>
<b>2.2.4.</b>	<i>Comportamento biomecânico do osso.....</i>	<i>24</i>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.</b>	<b>Obtenção dos animais.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.</b>	<b>Coleta do material.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.1.</b>	<i>Grupo I: Animais naturalmente infectados com Leishmania sp.....</i>	<i>25</i>
<b>3.2.2.</b>	<i>Grupo II: Animais não infectados por Leishmania sp.....</i>	<i>27</i>
<b>3.3.</b>	<b>Cultura da medula óssea e dos fragmentos de fêmur antes de processamento.....</b>	<b>27</b>
<b>3.4.</b>	<b>Cultura dos fragmentos de fêmur após os processamentos.....</b>	<b>28</b>
<b>3.5.</b>	<b>Avaliação histológica.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6.</b>	<b>Teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</b>	<b>29</b>
<b>3.7.</b>	<b>Ensaio de compressão mecânica.....</b>	<b>29</b>
<b>3.8.</b>	<b>Análise estatística dos dados.....</b>	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.</b>	<b>Confirmação do grupo de animais não infectados.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.</b>	<b>Avaliação do crescimento de <i>Leishmania</i> sp. em meio de cultura..</b>	<b>30</b>
<b>4.3.</b>	<b>Ensaio mecânico de compressão.....</b>	<b>35</b>

---



---

<b>4.4.</b>	<b>Avaliação histológica.....</b>	<b>38</b>
<b>4.5.</b>	<b>Comparação entre os testes diagnósticos.....</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>

---

---

---

LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>CETEA</b>	Comitê de Ética em Experimentação Animal
<b>CR</b>	Receptor de complemento
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>DCCV</b>	Departamento de Clínica e Cirurgia veterinárias
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biológicas
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS ou NOS2</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>kDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
<b>LC</b>	Leishmaniose cutânea
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LVC</b>	Leishmaniose Visceral Canina
<b>MCL</b>	Leishmaniose muco-cutânea
<b>MEM</b>	Minnimum Essential Medium
<b>NK-</b>	<i>Natural killers</i>
<b>NNN</b>	<i>Novy McNeal Nicolle</i>
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>PA</b>	<i>Pro analyse</i>
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>RIFI</b>	Reação de imunofluorescência indireta
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais

---

---

---

LISTA DE TABELAS

---

<b>TABELA 1:</b>	Valores de tensão máxima e módulo de elasticidade obtidos para as amostras de cães infectados e não infectados por <i>Leishmania</i> sp.....	36
<b>TABELA 2:</b>	Contagem diferencial de canalículos, osteócitos e matriz óssea nos animais dos grupos infectados e não infectados.....	39
<b>TABELA 3:</b>	Relação de animais e resultados dos exames diagnósticos realizados...	40

---

---

---

LISTA DE FIGURAS

---

<b>FIGURA 1:</b>	Fotografia de cães mostrando alguns dos sinais clínicos encontrados na LVC: Lesões esfoliativas (A e C); Linfadenomegalia (B), alopecia e seborreia seca (D); lesão ulcerativa (E); lesões ulcerativas de ponta de orelha (F).	17
------------------	--	----

---

<b>FIGURA 2:</b>	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.....	20
	Procedimento de coleta do fêmur de animais infectados com <i>Leishmania</i> sp. A: Exposição do fêmur. B: Fêmur removido. C: Secção de cabeça e colo femorais com serra sagital. D:	
<b>FIGURA 3:</b>	Armazenamento da medula em tubo tipo <i>eppendorf</i> ®. E: Fragmentação da diáfise femoral com pinça goiva. F: Fragmentos da diáfise após lavagem com soro fisiológico a 0,9%.....	26
<b>FIGURA 4:</b>	Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. em macrófagos, em esfregaço de medula óssea.....	27
<b>FIGURA 5:</b>	Radiografia das amostras de osso após 20 dias em solução descalcificadora. As setas apontam regiões ainda calcificadas.....	28
<b>FIGURA 6:</b>	Equipamento de ensaios universal Instron modelo 5582 (A); Amostra de osso cortical posicionada em seu eixo longitudinal no equipamento para o início do ensaio (B).....	29
<b>FIGURA 7:</b>	Equipamento de ensaios universal Instron modelo 5582.....	30
<b>FIGURA 8:</b>	Número de amostras positivas, negativas e contaminadas no cultivo de osso cortical e medula óssea sem tratamento e submetidos a esterilização em autoclave e armazenamento em glicerol de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania</i> sp. n= 43.....	31
<b>FIGURA 9:</b>	Relação de animais sorologicamente positivos para <i>Leishmania</i> sp, envolvidos no experimento, e crescimento dos parasitos em meio de cultura antes e após cada processamento do osso. No eixo das ordenadas 0= ausência de crescimento e 1= crescimento de formas amastigotas.	32
<b>FIGURA 10:</b>	Formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> cultivadas a partir de amostra de osso cortical. No centro, os parasitos se reúnem formando rosetas.	32
<b>FIGURA 11:</b>	Número de amostras positivas (Pos) e negativas (Neg) na cultura de <i>Leishmania</i> antes (Controle) e após os tratamentos dos ossos (esterilização em autoclave ou armazenamento em glicerol).	33
<b>FIGURA 12:</b>	Relação das amostras de cada animal positivas na cultura e o período entre o óbito do paciente e a coleta do material.	35
<b>FIGURA 13:</b>	A e B: Exemplos das amostras após sua ruptura (setas), no momento em que o teste era interrompido.	36
<b>FIGURA 14:</b>	Tensão (MPa) versus deformação(%) das amostras de osso não infectadas. A faixa encontrada entre os traçados A e B foi utilizada para o cálculo do módulo de elasticidade.	37

<b>FIGURA 15:</b>	Tensão (MPa) versus deformação(%) das amostras de osso infectadas com <i>Leishmania infantum</i> . A faixa encontrada entre os traçados A e B foi utilizada para o cálculo do módulo de elasticidade .	38
<b>FIGURA 16:</b>	Porcentagem (%) de osteócitos na cortical óssea de animais negativos e positivos para Leishmaniose visceral.	39

---

**LISTA DE QUADROS**

---

<b>QUADRO 1:</b>	Manifestações clínicas e anormalidades laboratoriais encontradas na leishmaniose canina por <i>L. infantum</i> .....	18
------------------	--	----

---

**LISTA DE ANEXOS**

---

<b>ANEXO 1:</b>	Protocolo de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).....	50
-----------------	--	----

---

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da esterilização em autoclave e do armazenamento em glicerol a 85% de osso cortical de cães infectados por *Leishmania* sp., e avaliar suas características mecânicas e morfométricas. Foram utilizados 43 cadáveres de cães com leishmaniose e 11 cadáveres de cães isentos da doença. Dos animais infectados, foram colhidas 43 diáfises de fêmur direito e 43 amostras da medula óssea correspondente. A diáfise foi dividida em duas, uma parte fragmentada em pequenas partículas e a outra seccionada em dois fragmentos de cerca de 1cm de comprimento para testes mecânicos e estudo morfométrico. A parte fragmentada foi submetida à cultura do parasito antes e após a esterilização em autoclave e armazenamento em glicerol. Amostras da diáfise dos cães negativos foram também submetidos às avaliações mecânica e morfométrica. Ambos os tratamentos foram eficazes para impedir o crescimento do parasito *in vitro*. Os testes mecânicos não mostraram diferença estatística na tensão de deformação nem no módulo de elasticidade à compressão mecânica entre os grupos de cães infectados e não infectados. Verificou-se na avaliação morfométrica aumento significativo da percentagem de osteócitos na cortical de animais infectados. Concluiu-se que os tratamentos são eficazes na eliminação do parasito e não há alteração de resistência mecânica do osso devido à infecção, sendo viável seu emprego em enxertia. São necessários mais estudos sobre os mecanismos envolvidos no aumento de osteócitos no tecido cortical.

**Palavras-chave:** Enxerto ósseo, Leishmaniose Visceral Canina, glicerol, esterilização.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of autoclaving and storage in 85% glycerol in cortical bone of dogs infected by *Leishmania* sp., and evaluate their morphological and mechanical characteristics. We used 43 cadavers of dogs with leishmaniasis and 11 cadavers of dogs free from the disease. From the infected animals were harvested 43 diaphysis of the right femur and 43 corresponding bone marrow samples. The shaft was divided in two, one part fragmented into small particles and the other split into two fragments of about 1cm in length for mechanical testing and morphometric study. The fragmentary was subjected to culture the parasite before and after autoclaving and storage in glycerol. Samples of the diaphysis of negative dogs were also subjected to morphometric and mechanical ratings. Both treatments were effective in preventing the growth of the parasite *in vitro*. The mechanical tests showed no statistical difference in deformation tension or the elastic modulus by mechanical compression between the infected and uninfected groups. There was a significant increase in the morphometric analysis of the percentage of cortical osteocytes in infected animals. It was concluded that the treatments are effective in eliminating the parasite and there is no change in strength of the bone due to infection, therefore being viable their use in grafting. More studies are needed on the mechanisms involved in the increase of osteocytes in cortical tissue.

**Keywords:** bone graft, Canine Visceral Leishmaniasis, glycerol, sterilization.

## 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose transmitida por vetores Diptera, Phlebotominae, decorrente da replicação dos parasitas no sistema mononuclear fagocitário. É causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani*, que inclui *L. donovani* e *L. infantum* (Alvar et al., 2004). A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem grande importância epidemiológica devido à alta prevalência e ao intenso parasitismo cutâneo no cão, que favorece a infecção do vetor com possível transmissão ao homem (Deane e Deane, 1955; Gontijo e Melo, 2004; Gramiccia, 2011; Harhay, 2011).

A leishmaniose humana, causada por várias espécies de *Leishmania*, compreende um grupo de doenças que são em sua maioria de caráter zoonótico. Estas incluem a leishmaniose visceral, que compromete órgãos internos e é fatal se não tratada, e as formas cutânea (LC) e mucocutânea (MCL), que acometem a pele ou junções mucocutâneas, cujas lesões podem até se curar espontaneamente, permanecendo cicatrizes desfigurantes (Murray et al., 2005).

Mais de 90% dos casos de LV no mundo ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. A LC é a mais amplamente distribuída, com aproximadamente um terço dos casos ocorrendo em cada uma das três regiões epidemiológicas: as Américas, a bacia do Mediterrâneo e a Ásia (Bhargava e Singh, 2012). Segundo Alvar et al. (2012), os dez países com os maiores números de casos da doença são Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, correspondendo a 70-75% da estimativa global de incidência de LC.

A transmissão da LV difere geograficamente. Na bacia do Mediterrâneo, Brasil e parte da África, o cão é o principal reservatório e a LV é zoonótica, enquanto

que no subcontinente indiano e em partes da África, a LV é de caráter antroponótico (Alvar et al., 2004)

A LVC, causada pela *L. infantum* (= *L. chagasi*), é uma doença na qual a infecção não significa o mesmo que doença clínica, devido à alta prevalência de infecções subclínicas (Solano-Gallego et al., 2001; Baneth et al., 2008). Cães com leishmaniose clinicamente detectável são aqueles que apresentam sinais clínicos e/ou anormalidades clinico-patológicas cuja infecção por *L. infantum* é confirmada por testes diagnósticos. Cães com infecção subclínica, ou cães infectados, porém clinicamente saudáveis, são aqueles que não apresentam sinais clínicos ao exame físico e nem anormalidades clinico-patológicas nos testes laboratoriais de rotina (hemograma e leucograma, perfil bioquímico e urinálise), mas possuem infecção por *L. infantum* confirmada por testes específicos para o parasito (Solano-Gallego e Baneth, 2008).

A infecção por *L. infantum* em cães é de caráter endêmico em aproximadamente 50 países na Europa, África, Ásia, na área do Mediterrâneo e nas Américas (Alvar et al., 2004), e apresentam taxas variáveis de prevalência, dependendo das condições climáticas e ecológicas que determinam a abundância de vetores (Maroli et al., 2008). O Brasil é um dos países que apresenta elevada casuística (Alvar et al., 2012), com a maior concentração dos casos nas regiões Nordeste e Norte, seguidas pela região Sudeste e Centro-Oeste, com números crescentes de casos em áreas urbanas como por exemplo, na cidade de Belo Horizonte (Ministério da Saúde, 2012 e Prefeitura de Belo Horizonte, 2012).

A transmissão decorre principalmente do repasto sanguíneo de insetos flebotomíneos contaminados. Carrapatos e pulgas foram avaliados como potenciais vetores de *Leishmania* sp., mas não foram encontradas evidências que comprovassem seu papel na

transmissão natural do protozoário (Coutinho et al., 2005; Coutinho e Linardi, 2007). Outras formas de transmissão foram relatadas, dentre elas a decorrente de transfusão sanguínea (de Freitas et al., 2006; Tabar et al., 2008), o que sugere a mesma possibilidade em relação aos diversos tipos de transplantes e enxertos de órgãos e tecidos, dentre estes o ósseo. Assim, com a disseminação da infecção por *Leishmania* sp., tornou-se impraticável a colheita de ossos de animais submetidos à eutanásia por lesões nervosas irrecuperáveis, cujo histórico anterior é desconhecido. Esta situação levou à redução drástica e até mesmo ao fechamento de banco de ossos, tão útil e necessário em determinadas situações ortopédicas que exigem enxerto ósseo cortical.

A utilização de enxertos ósseos é uma prática frequente na cirurgia ortopédica de pequenos animais e seu uso tem permitido a cura de afecções ósseas de diferentes magnitudes (Cavassani et al., 2001). Os enxertos desempenham função osteogênica e/ou de sustentação mecânica, dependendo do tipo utilizado (Fitch et al., 1997). São indicados quando se deseja promover a consolidação de união retardada, não união (Fitzpatrick et al, 2009) em osteotomias e artrodeses (Piermattei et al., 2006 ). Os enxertos corticais são utilizados em situações que necessitam suporte estrutural (Johnson et al., 1992; Fitch et al., 1997; Millis e Martinez, 2003), como reparo de fraturas cominutivas (Torres et al., 2009) e para preservação de membros após excisões tumorais (Morello et al., 2001; Ziliotto et al., 2003). Estes devem reestabelecer a integridade do osso e oferecer suporte à carga, o que torna as propriedades mecânicas do enxerto necessárias. Os parafusos precisam se fixar firmemente ao enxerto até a consolidação da interface osso enxertado/hospedeiro, e o enxerto deve ser capaz de resistir às forças mecânicas transmitidas através deste (Roe et al., 1988; Morello et al., 2001).

Uma vez que não foram encontrados na literatura consultada trabalhos referentes à infecção de animais sadios por *Leishmania* sp. por meio de aloenxertos corticais, este projeto propôs avaliar a presença do parasito no osso cortical após o processamento de esterilização em autoclave ou armazenamento em glicerol PA a 85% por 30 dias, sua resistência mecânica à compressão e alterações histológicas do tecido ósseo. O resultado favorável, ou seja, a eliminação da infecção e a inexistência de alterações significativas que prejudiquem a qualidade do enxerto, permitirá a manutenção e ampliação de banco de ossos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leishmaniose Visceral Canina

Em medicina veterinária, a leishmaniose causada por *Leishmania infantum* é especialmente importante em cães, causando doença grave e fatal, e está entre as zoonoses, considerada pela Organização Mundial de Saúde uma das doenças importantes negligenciadas, motivo pelo qual pesquisas testando vacinas contra a doença tanto com parasitas mortos ou antígenos recombinantes para imunização têm sido realizadas (Sharifi et al, 1998; Srivastava et al, 2003; Gramiccia e Gradoni, 2005; Nagill et al, 2009; WHO, 2010).

As fêmeas dos flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) são os principais vetores de *Leishmania*. Estão presentes principalmente em países tropicais ou são ativos durante os meses relativamente quentes em países de clima temperado. A atividade dos flebotomos adultos é crepuscular e noturna da primavera ao outono no Mediterrâneo e durante todo o ano na América do Sul (Killick-Kendrick, 1999; Sharma e Singh, 2008). As espécies mais importantes transmissoras de *L. infantum* no Novo mundo são: *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor nas Américas, *L. cruzi*, vetor em áreas do centro oeste e *L. evansi*, vetor na



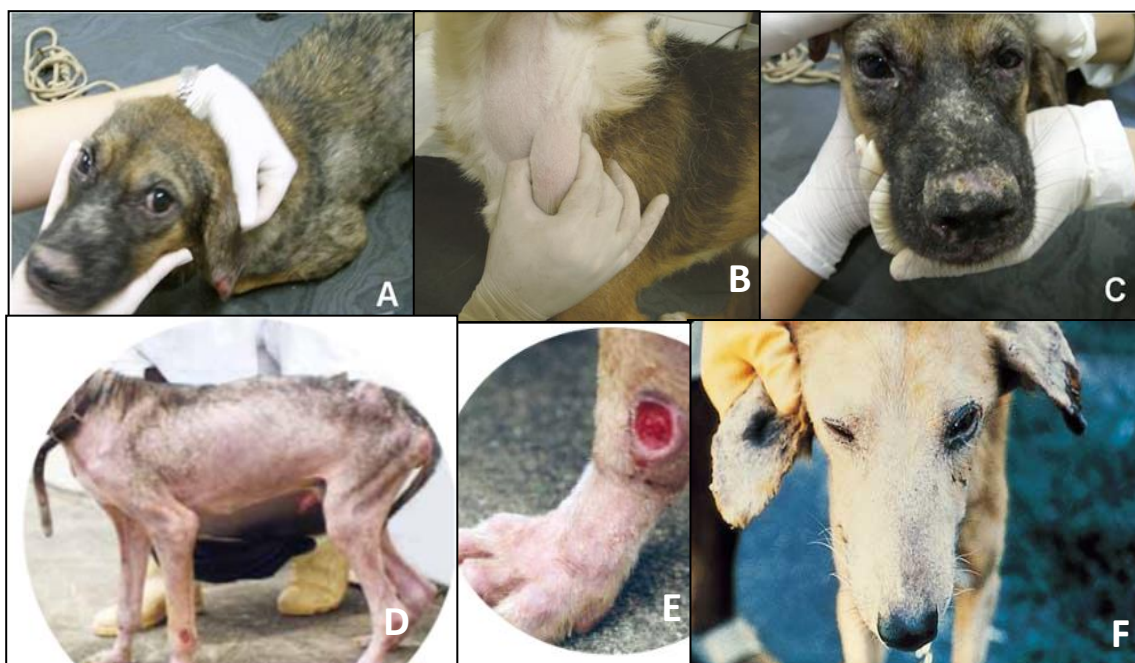
Colômbia. No Velho Mundo as principais espécies transmissoras são: *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus*, *P. langeroni*, *P. tobbi* (Solano-Gallego et al., 2009).

### 2.1.1. Apresentação clínica da LVC

Classicamente, a LVC é descrita como uma patologia acompanhada, inicialmente, por febre, dermatites, queda de pelo, descamação, pelo opaco e ulcerações localizadas frequentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações (úlceras de decúbito). Com grande frequência observa-se, nas fases mais adiantadas da doença, esplenomegalia, hepatomegalia alopecia generalizada, ulcerações na pele, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, melena ou hematoquesia, edema das patas, vômito, além do aparecimento de áreas de hiperqueratose especialmente na ponta do focinho,

conforme caracterizado na Figura 1 (Alvar et al., 2004; Santos et al., 2006; Ferreira et al., 2007). Glomerulonefrite e alterações tubulares foram relatadas (Costa et al., 2003; Aresu et al., 2012). Estudos de alterações glomerulares mostraram o depósito de imunocomplexos como a causa responsável pelas lesões. Estudos de outros autores têm mostrado que a patogênese da glomerulonefrite causada por *L. infantum* tem envolvimento de células T e moléculas de adesão (Costa, 2000; 2010).

Verde et al (2009) em estudo com 55 pacientes humanos com LV observaram lesão nos túbulos proximais, com aumento das taxas de excreção de vários íons, entre eles o cálcio, além de hipocalcemia associada em 32% dos pacientes.



**FIGURA 1:** Fotografia de cães mostrando alguns dos sinais clínicos encontrados na LVC: Lesões esfoliativas (A e C); Linfadenomegalia (B); alopecia e seborreia seca (D); lesão ulcerativa (E); lesões ulcerativas de ponta de orelha (F). Fonte: Adriane Pimenta da Costa Val; Isabela Ferreira Gontijo de Amorim e Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do ICB.

No cão, na fase final da infecção podem ocorrer paresia dos membros pélvicos (paraparesia), caquexia, inanição e óbito (Alvar et al., 2004; Santos et al., 2006; Ferreira et al., 2007). Envolvimento osteoarticular em casos de LVC tem sido descritos em cães com claudicação, poliartrite e osteomielite associados com a doença sistêmica (Spreng, 1993; Costa et al., 2005; De Souza et al., 2005; Santos et al., 2006; Costa et al., 2006), evidenciando

rigidez, cifose, edema distal e dor à palpação das articulações e membros (Agut et al., 2003; Santos et al., 2006). Em alguns casos não existem outros sinais clínicos significativos de LVC (Buracco et al., 1997; McConckey et al., 2002). As alterações clínicas e anormalidades laboratoriais encontradas em cães com LVC são apresentadas no Quadro 1.

**QUADRO 1:** Manifestações clínicas e anormalidades laboratoriais encontradas na leishmaniose canina por *L. infantum*.

<b>Manifestações clínicas</b>	<b>Anormalidades laboratoriais</b>
<p><b><u>Gerais</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Linfadenomegalia generalizada</li> <li>○ Perda de peso/caquexia</li> <li>○ Apetite aumentado ou diminuído</li> <li>○ Letargia</li> <li>○ Palidez das membranas mucosas</li> <li>○ Esplenomegalia</li> <li>○ Poliúria e polidipsia</li> <li>○ Febre</li> <li>○ Vômitos</li> <li>○ Diarréia (inclusive colite crônica)</li> </ul> <p><b><u>Cutâneas</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Dermatite esfoliativa não pruriginosa com ou sem alopecia</li> <li>○ Dermatite erosiva-ulcerativa</li> <li>○ Dermatite nodular</li> <li>○ Dermatite papular</li> <li>○ Dermatite pustular</li> <li>○ Onicogrifose</li> </ul> <p><b><u>Oftálmicas</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Blefarites (exfoliativa, ulcerativa, ou nodular) e conjuntivite (nodular)</li> <li>○ Ceratoconjuntivite, comum ou seca</li> <li>○ Uveíte anterior/Endoftalmite</li> </ul> <p><b><u>Outros</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Lesões mucocutâneas e mucosas ou lesões nodulares (oral, genital e nasal)</li> <li>○ Epistaxe</li> <li>○ Claudicação (poliartrites erosivas ou não erosivas, osteomielites, polimiosites)</li> <li>○ Miosite atrófica mastigatória</li> <li>○ Desordens vasculares (vasculite sistêmica, tromboembolismo arterial)</li> <li>○ Desordens neurológicas</li> </ul>	<p><b><u>Proteínas séricas e eletroforetograma</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Hiperglobulinemia</li> <li>Beta e/ou gamaglobulinemia policlonal</li> <li>○ Hipoalbuminemia</li> <li>○ Diminuição da razão albumina/globulina</li> </ul> <p><b><u>Hemograma/Leucograma/Hemostasia</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Anemia não- regenerativa discreta a moderada</li> <li>○ Leucocitose ou leucopenia</li> <li>○ Trombocitopatia</li> <li>○ Trombocitopenia</li> <li>○ Comprometimento da hemostasia secundária e fibrinólise</li> </ul> <p><b><u>Perfil bioquímico/Urinalise</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Proteinúria discreta a grave</li> <li>○ Azotemia renal</li> <li>○ Aumento da atividade enzimática do fígado</li> </ul>

Fonte: Solano-Gallego et al., 2011.

### 2.1.2. Ciclo de vida do parasita e vias de transmissão

A *Leishmania* completa o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, o vetor flebotomíneo, que transmite a forma infectiva promastigota flagelada, e o mamífero, onde a amastigota intracelular se desenvolve e replica dentro, principalmente, de macrófagos (Figura 2). O flebotomíneo é o único artrópode adaptado para a transmissão biológica de *Leishmania* sp. (Solano-Gallego et al., 2011). A infecção do hospedeiro ocorre quando o flebotomíneo infectado inocula na pele, durante o repasto sanguíneo, as formas promastigotas, incluindo aquelas metacíclicas, que são infectantes. Ilesas aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Sacks e Kamhawi, 2001) essas podem ser fagocitadas diretamente ou após a infecção de neutrófilos, pelos macrófagos, que são recrutados rapidamente para o sítio de inoculação (Peters et al, 2008). Um dos fatores que interfere com a interação *Leishmania*-macrófago é a temperatura do hospedeiro. Berman e Neva (1981) relataram eliminação de 40% das formas amastigotas de *L. donovani* em macrófagos in vitro em temperatura de 39°C. Biegel et al. (1983) relataram restrição do crescimento da *L. mexicana* a partir de 37,5°C. Rioux et al (1985) estudaram o desenvolvimento do parasito nos flebotomíneos citando a temperatura de 30°C como letal para a *L. infantum*. Raina e Kaur (2006) relataram a temperatura de 37°C como indutora de apoptose em *L. donovani*.

Nos vacúolos parasitóforos dos macrófagos, as promastigotes diferenciam-se em amastigotas. Após o processo de divisão binária e ruptura dessas células, as amastigotas liberadas podem ser fagocitadas

por outros macrófagos ou serem ingeridas pelo inseto vetor (Killick-Kendrick, 1999; Solano-Gallego et al., 2011). As amastigotas ingeridas juntamente com o sangue do hospedeiro, se transformam em promastigotas. Estas passam por vários estágios morfológicos e bioquimicamente distintos de diferenciação, sendo capazes de resistir à ação das enzimas digestivas do trato digestório médio e de aderirem ao epitélio intestinal dos insetos vetores (Killick-Kendrick, 1990). Ao final do processo, as promastigotas diferenciam-se, em parte, em promastigotas metacíclicas infectantes, que migram para a porção anterior do trato digestório, e são inoculadas durante novo repasto sanguíneo.

Outros meios de transmissão da *Leishmania* sp. são citados: transmissão direta de cão para cão por meio de mordeduras ou ferimentos foi considerada como responsável pela transmissão da infecção entre foxhounds nos Estados Unidos da América diante da ausência aparente de vetores, no entanto, o fato não foi confirmado por evidência experimental (Duprey et al., 2006). A transmissão transplacentária da infecção em cães parece ser rara, mas possível (Rosypal et al, 2005; Boggiatto et al., 2011). Recentemente a transmissão venérea foi descrita em cães (Silva et al., 2009.). A transmissão por meio de transfusão de sangue ou produtos deste é de especial importância em regiões onde os doadores podem carrear a infecção (de Freitas et al., 2006; Tabar et al., 2008).

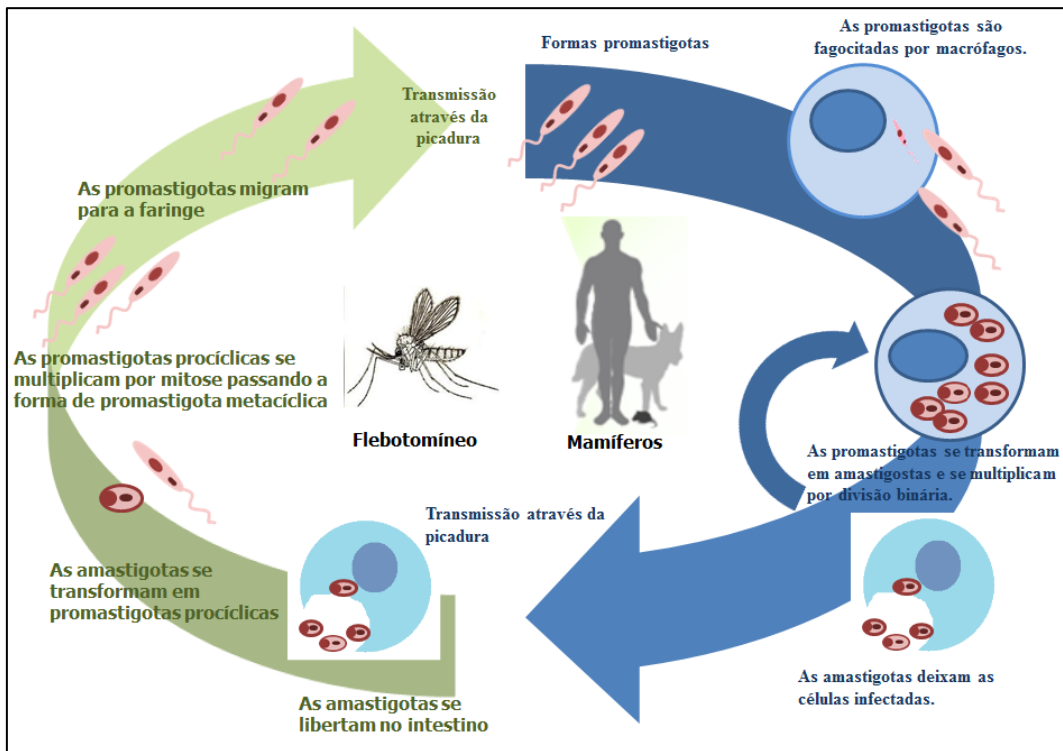


FIGURA 2: Ciclo biológico da *Leishmania* sp. Fonte: arquivo pessoal.

### 2.1.3. Técnicas Diagnósticas

O diagnóstico de Leishmaniose é complexo, uma vez que os sinais clínicos e as anormalidades clínico-patológicas são amplas e não específicas. Desta forma, testes mais específicos tornam-se necessários para confirmação do diagnóstico. Atualmente, os mais comumente utilizados são o diagnóstico parasitológico direto, testes sorológicos e o diagnóstico molecular. Técnicas de imuno-histoquímica, avaliação histológica de tecidos e isolamento em meio de cultura apropriado ou inoculação em animais de laboratório como o hamster também são utilizados, sendo os últimos, porém, praticamente restritos ao uso em pesquisas devido ao longo tempo necessário para a execução da técnica e seu alto custo (Srivastava et al, 2011).

O diagnóstico parasitológico apresenta especificidade de 100%, embora a sensibilidade do teste seja limitada quando utilizados fluidos e tecidos corporais

(Solano-Galego, 2001). As formas amastigotas podem ser visibilizadas em esfregaços e imprints de linfonodos, medula óssea e baço. Em preparações coradas com Giemsa, o citoplasma aparece azul claro com um núcleo relativamente grande em vermelho em mesmo plano do núcleo, e, um pouco mais à direita deste, encontra-se um corpo semelhante à uma haste em vermelho ou violeta, que corresponde ao cinetoplasto (Srivastava et al, 2011).

O diagnóstico sorológico é baseado na presença de resposta humoral específica (Herwaldt, 1999). Dentre eles, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) são os mais empregados na rotina. A RIFI, que geralmente utiliza a forma promastigota como antígeno, possui alta especificidade e sensibilidade para a detecção da leishmaniose canina clínica, mas pode apresentar sensibilidade reduzida para detectar a doença em cães clinicamente saudáveis, porém infectados (Mettler et al.,

2005). O teste ELISA possui especificidade e sensibilidade variados de acordo com os antígenos utilizados, que podem ser extratos solúveis de promastigotas e proteínas recombinantes ou purificadas (Miro' et al., 2008). Extratos de parasitas inteiros são sensíveis para a detecção de infecções clínicas ou subclínicas em cães, mas possuem menor especificidade (Mettler et al., 2005; Ferreira et al., 2007). Por outro lado, ELISA com peptídeos recombinantes apresentam 96-100% de especificidade, mas são menos sensíveis para a detecção de cães infectados clinicamente saudáveis, dependendo do antígeno empregado (Mettler et al., 2005; Porrozzi et al., 2007). Reações cruzadas são relatadas na literatura, envolvendo agentes tais como *Babesia canis* (Mancianti et al., 1996; Gomes e Cordeiro, 2004), *Erlischia* sp. (Gomes e Cordeiro, 2004) e *Tripanossoma cruzi* (Troncarelli, 2008).

A detecção de formas amastigotas de *Leishmania* por imuno-histoquímica em tecidos de cães fixados em formalina e embebidos em parafina foi descrita associada a avaliações histopatológicas. A técnica utiliza anticorpos monoclonais ou policlonais ou mesmo o próprio soro de cães naturalmente infectados (Tafari et al., 2001; Tafari et al., 2004).

O cultivo das cepas de *Leishmania* pode ser realizado utilizando-se um meio bifásico (meio Novy, McNeal e Nicolle) e outros meios monofásicos (Schneider's insect medium, M199 ou meio Grace, alfa-MEM) para conversão de formas amastigotas, localizadas nos tecidos, em promastigotas, para isolar e multiplicar os parasitos (Solano-Gallego et al., 2011). A concentração de amastigotas no tecido pode determinar o sucesso no cultivo do parasito (Navin, 1990). O material pode ser coletado inclusive de cadáveres, fato observado por Thomson e Sinton (1921), ao cultivar com sucesso o parasito a partir de medula óssea

de um cadáver humano coletada 14 horas pós morte.

A detecção de ácido desoxirribonucleico (DNA) específico do parasito em tecidos, por meio da técnica de PCR, permite um diagnóstico sensível e específico. Várias técnicas e várias sequências alvo utilizando DNA genômico ou do cinetoplasto (kDNA) foram desenvolvidas para LVC. Técnicas que utilizam kDNA parecem ser mais sensíveis para a detecção da infecção (Gomes et al., 2008; Maia e Campino, 2008; Miró et al., 2008). A PCR é realizada a partir de DNA extraído de tecidos, sangue, fluidos biológicos e espécimes histopatológicos, sendo medula óssea, linfonodo, baço e pele os que apresentam maior frequência de detecção da infecção (Solano-Gallego et al., 2007; Manna et al., 2008). Amostras de *swabs* conjuntivais também têm se mostrado sensíveis e específicas na detecção de *L. infantum* em cães soropositivos que apresentam doença clínica (Ferreira et al., 2008; Ferreira et al., 2013). Estão disponíveis três técnicas de PCR: a PCR convencional, nested-PCR e PCR em tempo real (Gomes et al., 2008; Maia e Campino, 2008; Miró et al., 2008). Esta última é uma técnica mais avançada que permite detectar cargas parasitárias muito baixas em comparação com a PCR convencional (Francino et al., 2006).

A atuação das prefeituras no Brasil preconiza a realização da sorologia utilizando-se métodos padronizados de ELISA e RIFI, segundo recomendação do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2012).

## 2.2 Enxertos ósseos

### 2.2.1 Função e classificação

A enxertia óssea é uma técnica de transplante de osso esponjoso ou cortical e tem sido utilizada na medicina veterinária durante muitos anos. Os enxertos ósseos

possuem diferentes funções, sendo elas de osteogênese, osteoindução, osteocondução e sustentação mecânica (Johnson e Hulse, 2002).

A osteogênese implica na formação de novo osso por indução a partir de células transplantadas do enxerto, que sobreviveram à transferência, se proliferam e formam novo osso. A capacidade de regeneração óssea é dependente da quantidade de células ósseas transplantadas e da viabilidade das mesmas. A osteoindução consiste na formação de tecido ósseo a partir do recrutamento e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas (fibroblastos) em osteoblastos. Essa diferenciação é mediada por vários fatores como proteína morfogênica óssea, fator de crescimento transformante  $\beta$ , citocinas, fator de necrose tumoral e prostaglandinas E2. Na osteocondução a formação óssea ocorre por meio de um processo de crescimento de capilares e células mesenquimais, seja dentro, ao redor ou através de enxerto, atuando como matriz para formação de novo osso. Diferentemente da osteoindução, esse processo ocorre somente em locais onde já existe tecido ósseo. Essas funções variam de acordo com o tipo de enxerto utilizado (Santos e Rahal, 2004; Pinto et al., 2007;).

Os enxertos são classificados segundo sua estrutura e origem. Pela estrutura morfológica, os enxertos ósseos podem ser divididos em: esponjoso - formado por osso trabecular, poroso e altamente celular, obtido da cavidade medular da região metafisária de ossos longos; cortical - constituído de osso compacto e denso; corticoesponjoso - composto de ambos os tipos, tais como costela ou asa do ílio (Weigel, 1993; Johnson, 1995). Há também os enxertos vascularizados que consistem na mobilização de um segmento ósseo com seu pedículo vascular, que é implantado por meio de técnicas de anastomose microvascular no defeito (Johnson, 1995; Perry, 1999). Quanto à origem, os enxertos

são classificados em: autógenos ou autólogos - quando o tecido transplantado é originário do próprio indivíduo; alógenos ou homólogos - quando originário de indivíduos da mesma espécie, embora geneticamente diferentes; xenógenos ou heterólogos - quando obtido de indivíduos de espécies diferentes; e isógenos ou singênicos - ocorre em indivíduos da mesma espécie e geneticamente idênticos (Santos e Rahal, 2004; Pinto et al., 2007).

O enxerto deve ser selecionado de acordo com sua função requerida. Enxertos esponjosos são ricos em células, mas são mecanicamente fracos. Eles possuem capacidade osteogênica, osteoindutiva e osteocondutiva, mas não fornecem suporte à carga. Ao contrário, o enxerto cortical fornece suporte mecânico, é osteocondutivo e estimula uma pequena resposta osteogênica (Weigel, 1993; Johnson e Hulse, 2002; Santos e Rahal, 2004). Os enxertos autógenos são os únicos entre os tipos de enxerto que fornecem células ósseas vivas imunocompatíveis, essenciais na osteogênese, responsáveis pela proliferação de células ósseas (osteoblastos) que então secretam o osteóide. Os enxertos homólogos e xenógenos, por serem geneticamente diferentes do hospedeiro, antes de sua utilização, precisam ser submetidos a algum tipo de tratamento que diminua sua antigenicidade (Santos e Rahal, 2004; Pinto et al., 2007).

### **2.2.2 Aloenxertos corticais**

O osso cortical pode ser transplantado a fresco imediatamente após sua coleta, ou pode ser armazenado em banco de ossos oferecendo assim, uma fonte constante para utilização (Johnson e Hulse, 2002; Piermattei et al., 2006).

Os aloenxertos são tratados geralmente por congelamento, liofilização, esterilização em autoclave ou por óxido de etileno, preservação química (glicerol) ou irradiação para eliminar ou reduzir a atividade celular

(Weigel, 1993; Fitch et al., 1997; Fossum, 2007).

O congelamento oferece algumas vantagens para preservação de implantes ósseos como facilidade de armazenamento, resposta antigênica diminuída, armazenamento por períodos longos e preservação das propriedades biomecânicas. Como desvantagem tem-se a necessidade de encontrar um doador adequado e os custos com assepsia (Kerwin et al., 1991; Friedlander et al., 1998; Yim et al., 2000). Devido à capacidade de alguns raros agentes infecciosos permanecerem viáveis a baixas temperaturas, os ossos congelados para utilização como aloenxertos devem ser removidos sob condições rigorosas de assepsia (Kerwin et al., 1991).

A liofilização é realizada por meio de congelamento do osso a  $-70^{\circ}\text{C}$  e sua posterior exposição ao vácuo até que a umidade residual seja inferior a 5%. Alguns estudos demonstraram que o processo de liofilização fragiliza o enxerto, tornando-o mais susceptível a fraturas por compressão. Apesar dessa técnica não inibir o processo de reparo, não evita a rejeição do enxerto (Boyce et al. 1999, Matter et al. 2001).

A glicerina a 98% mostrou-se eficiente na preservação óssea à temperatura ambiente, sendo de baixo custo e de fácil obtenção, além de apresentar características bactericidas e/ou bacteriostáticas (Alvarenga, 1992). Pigossi et al. (1971) verificaram ação bactericida da glicerina sobre bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Krauspenhar et al. (2003) testaram os efeitos in vitro da glicerina sobre tendões inoculados com bactérias gram negativas e gram positivas e verificaram 100% de eficácia, desde que as amostras permanecessem na glicerina por no mínimo 30 dias. Foi também observado que bactérias gram positivas são mais resistentes à ação do

conservante. Pinto Junior et al. (1996) relataram em estudo microbiológico de glicerina ausência de crescimento bacteriano e fúngico. Outros autores relataram crescimento microbiológico em tecidos conservados em glicerol, cuja coleta não se deu de forma asséptica (Gioso et al., 2002; Giovani et al., 2006). Em amostras assepticamente coletadas e conservadas em glicerol não houve desenvolvimento de microorganismos (Melo et al., 1998; Del Carlo et al., 1999). Embora menos resistentes que o osso fresco, os ossos conservados em glicerina não promoveram rejeição e mantiveram suas propriedades osteoindutivas e osteocondutivas (Cavassani, 2001; e Ziliotto et al., 2003) Sua principal desvantagem é a perda de suas propriedades biomecânicas podendo ocorrer fratura do implante no momento da colocação dos parafusos (Ziliotto et al., 2003; Sampaio et al., 2009).

O óxido de etileno e a esterilização em autoclave têm como vantagens a possibilidade de utilização de animais com doenças transmissíveis como doadores e da colheita não exigir assepsia, já que esse procedimento é letal para os agentes patogênicos. Além disso, técnicas de esterilização reduzem a quantidade de DNA do tecido, minimizando a possibilidade de rejeição por parte do receptor. Gefrides et al. (2010) realizaram um experimento com amostras de saliva em diferentes volumes para detecção de DNA após esterilização em autoclave à  $120^{\circ}\text{C}$  por 0, 60, 120 ou 180 minutos, e observaram que volumes menores e períodos maiores de esterilização reduzem substancialmente a quantidade de DNA detectável no material testado. Apesar dessas vantagens, ambos os métodos alteram as propriedades biomecânicas do implante, predispondo-o a falhas (Wagner, 1994; Hooe e Steinberg, 1996).

As principais complicações associadas a enxertos são: infecção, geralmente resultante de contaminação do enxerto ou do foco da

fratura, que leva à instabilidade e formação de sequestros ósseos, rejeição, falha no reparo da fratura e fratura do enxerto (Johnson e Hulse, 2002).

### **2.2.3. Morfofisiologia do tecido ósseo**

O tecido ósseo é formado por um conectivo especializado constituído por matriz orgânica e minerais e que apresenta três tipos celulares: osteoblasto osteócito e osteoclasto. A matriz óssea é formada por colágeno tipo I e matriz não colagênica (água, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, osteonectina, osteopontina, proteína morfogenética óssea osteocalcina, lipídeos, metaloproteinases, fosfatases, etc.) (Mears, 1979; Serakides, 2011). Apresenta dois tipos de configuração: trabecular ou esponjoso e osteônico ou compacto. O tecido trabecular é formado por trabéculas dispostas uma ao lado das outras, conectadas e circundadas por tecido conectivo vascular. O tecido ósseo osteônico é formado por trabéculas dispostas de forma concêntrica em torno de um canal contendo conjuntivo vascular (canal de Harvers), formando ósteons unidos entre si por lamelas intersticiais e constituem a cortical óssea. O tecido ósseo é formado pelos osteoblastos que sintetizam matriz orgânica não mineralizada (osteóide) nas superfícies ósseas pré-existentes, sobre matriz cartilaginosa ou sobre condensação de colágeno. Estão presentes sobre superfícies periosteais, endosteais e trabeculares (Serakides, 2011). À medida que produzem matriz e se tornam envoltos por ela, passam a ser denominados osteócitos. As principais ações do osteócito são manter a viabilidade do tecido ósseo e promover a reabsorção óssea por osteólise osteocítica (Burger et al., 1995; Qing e Bonewald, 2009; Serakides, 2011). Os osteoclastos são células multinucleadas responsáveis pelo processo de reabsorção óssea por osteoclasia, com retirada de minerais e degradação da matriz. Localizam-se na superfície das trabéculas e dos canais

de Harvers e no perióstio, alojados nas lacunas de Howship (Boyle, 2003).

### **2.2.4. Comportamento biomecânico do osso**

De acordo com Hulse e Hyman (1998), as quatro forças fisiológicas primárias que podem ser aferidas sobre o osso são: a compressão axial, a tensão axial, a flexão e a torção. Cada uma destas forças, isoladamente ou em conjunto, resulta em um padrão complexo de pressões e deformações internas no âmbito do osso. Fatores importantes na gênese de fraturas são: a magnitude, a duração e a direção destas forças atuando no osso (Burstein et al., 1972).

O osso cortical diafisário é um material composto basicamente por hidroxiapatita, uma cerâmica de alta resistência, que lhe confere rigidez, e por uma matriz composta principalmente por colágeno, uma proteína responsável por suas propriedades elásticas e plásticas. Sua estrutura não homogênea, a existência de trabeculados ósseos com arquitetura bem definida (alinhamento principal) e a interposição de fluidos conferem ao mesmo características de anisotropia e de viscoelasticidade (Mears, 1979).

Quando um osso é submetido a uma carga de compressão, sofre uma deformação, que ocorre em dois momentos: no primeiro, quando retirada a força deformadora, o osso retorna à sua forma inicial (deformação elástica); no segundo momento, se maior estresse ou esforço for aplicado ao material, seu poder de retornar à forma original será perdido (deformação plástica). O ponto que delimita a divisão entre a deformação elástica e a plástica é chamado de ponto de cessão ou limite de proporcionalidade (Harkess et al., 1993).

Os ensaios mecânicos têm a finalidade de determinar as propriedades estruturais de diferentes tipos de materiais. Basicamente, existem dois tipos de ensaios: os destrutivos



e os não destrutivos. O primeiro promove a ruptura ou inutilização do material, e nessa categoria estão incluídos os testes de tração, impacto, torção, compressão, flexão e fadiga. Nos ensaios não destrutivos estão incluídos os testes de ultrassom, raios-X e outros que podem determinar as propriedades físicas ou mecânicas do material analisado (Souza, 1974). O tipo de ensaio biomecânico empregado depende do tipo de material testado, da finalidade a que se destina, do tipo de esforços a que será submetido e das propriedades mecânicas a serem medidas. Para a análise de enxertos ósseos o principal teste a ser realizado é o de compressão axial (Castania, 2002).

Baseando-se no fato de que a maioria dos métodos de conservação exercem efeito deletério sobre a resistência óssea (Del Carlo et al., 1999), vários testes biomecânicos têm sido realizados em ossos visando analisar suas características estruturais e para melhor entender as forças e os movimentos que o esqueleto apendicular deve resistir (Cornu et al., 2003; Ball et al., 2004).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção dos animais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) sob o protocolo 266/11 (Anexo 1).

Foram utilizados para o desenvolvimento deste estudo 54 cadáveres de cães sem seleção para raça ou sexo. Os animais foram divididos em dois grupos, sendo o grupo I constituído por 43 cadáveres de animais que vieram à óbito ou foram eutanasiados devido à infecção por *Leishmania* sp., e o grupo II, constituído por 11 animais cujo óbito se deveu a motivos diferentes da infecção pelo parasito. Os integrantes do grupo I apresentaram obrigatoriamente sorologia positiva para Leishmaniose, sendo utilizados os testes de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA). O exame

sorológico foi proveniente de laboratórios particulares, do laboratório de leishmanioses do Departamento de Epidemiologia da Escola de Veterinária da UFMG ou de Centros de Controle de Zoonoses das prefeituras municipais. Amostras de medula óssea coletadas dos animais do grupo II foram submetidas ao teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificação da ausência de *Leishmania* sp., juntamente com avaliação de esfregaços por extensão e por aposição em lâminas, realizados com medula óssea e linfonodos, respectivamente. Além disso, foram coletados fragmentos de fígado, baço, linfonodo, rim e pele dos animais deste grupo para realização de imuno-histoquímica para *Leishmania* sp., confirmando a ausência de infecção prévia nos animais. Todos os cadáveres utilizados foram oriundos de cães que vieram a óbito ou foram eutanasiados no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### 3.2. Coleta do material

##### 3.2.1 Grupo I: Animais naturalmente infectados com *Leishmania* sp.

A coleta das amostras nos animais deste grupo foi realizada com instrumentos esterilizados, após tricotomia e degermação prévia do membro pélvico direito e isolamento da região com panos estéreis, por indivíduo adequadamente paramentado na sala de técnica operatória de pequenos animais do Hospital Veterinário da UFMG.

A abordagem ao fêmur procedeu-se com incisão de pele crânio-lateral desde a articulação coxo-femural até a tíbia proximal. Posteriormente foi realizada uma incisão na fáscia lata com subsequente afastamento dos músculos bíceps femoral e vasto lateral, e exposição do fêmur. A musculatura ao redor do osso foi seccionada em suas inserções com bisturi, liberando toda a diáfise. Em seguida, músculos e ligamentos extra e intra-articulares foram seccionados, nas articulações fêmuro-tíbio-

patelar e coxo-femoral, com ressecção de todo o osso (Figura 3a e 3b). Uma vez removido, o osso foi seccionado com auxílio de uma serra sagital na região metafisária proximal, retirando-se a cabeça e colo femorais. A medula foi removida do canal medular com o emprego de um pino intramedular ou pinça anatômica e coletada

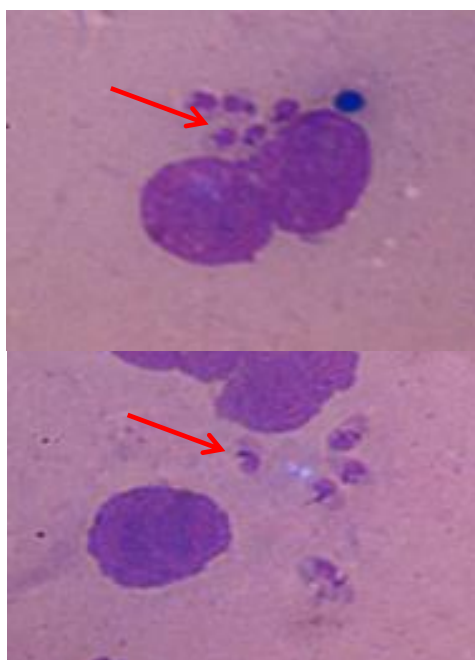
em dois tubos *ependorf*® de 2 mL. A amostra destinada à cultura foi apenas refrigerada e a amostra para PCR, congelada (Figura 3c e 3d). Parte da medula foi utilizada para a confecção de esfregaços corados com Panótico Rápido (Laborclin Brasil) para exame parasitológico direto (Figura 4).



**FIGURA 3:** Procedimento de coleta do fêmur de animais infectados com *Leishmania* sp. A: Exposição do fêmur. B: Fêmur removido. C: Secção de cabeça e colo femorais com serra sagital. D: Armazenamento da medula em tubo *ependorf*®. E: Fragmentação da diáfise femoral com pinça goiva. F: Fragmentos da diáfise após lavagem com soro fisiológico a 0,9%.

O osso cortical diafisário foi dividido em duas partes, sendo a primeira fragmentada em diversas pequenas partículas de cerca de 0,3 a 0,5 cm com uma pinça goiva. Os fragmentos foram agrupados e lavados com solução salina a 0,9% até a completa remoção da medula e tecidos moles adjacentes. Os fragmentos foram divididos em dois tubos *eppendorf*® de 2,0 mL e em um tubo *falcon*® de 50 mL contendo glicerol PA a 85%. Um tubo *eppendorf*® contendo material coletado foi refrigerado para posterior cultivo do material, e o outro foi autoclavado antes da colocação de seu conteúdo em meio de cultura (Figura 3e e 3f).

Em 11 cadáveres, dos 43 do grupo I, a outra parte da diáfise foi utilizada para a coleta de 22 fragmentos circulares de aproximadamente 0,7 a 1,2 cm de comprimento da diáfise femoral (de acordo com o porte do animal), sendo que 11 fragmentos foram conservados em frasco contendo formol a 10% para avaliação morfométrica e o restante foi congelado e reservado para avaliação mecânica.



**FIGURA 4:** Formas amastigotas de *Leishmania* sp. (setas vermelhas) em macrófagos. Esfregaço de medula óssea, corado pelo Panótico Rápido (Laborclin Brasil®).

### 3.2.2. Grupo II: Animais não infectados por *Leishmania* sp.

Os 11 animais selecionados para compor o grupo negativo vieram a óbito por motivos diversos e diferentes de leishmaniose, sendo as alterações macroscópicas encontradas durante a necropsia não características desta doença.

Na sala de necropsias do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV), foram coletadas 22 amostras provenientes da diáfise do fêmur de membros pélvicos direitos destes cadáveres. A coleta das amostras se procedeu da mesma forma que no grupo I. Os 11 fragmentos destinados à avaliação mecânica foram armazenados em frasco seco e congelados, enquanto os outros fragmentos foram conservados em frasco contendo formol a 10% tamponado para posterior avaliação histológica.

A partir de material da medula óssea e de linfonodos foram realizados esfregaços por extensão e por aposição em lâminas de vidro, posteriormente coradas com panótico rápido (Laborclin Brasil). Parte do material coletado da medula óssea foi utilizado para a PCR.

Durante o procedimento de necropsia, realizado pela equipe do Laboratório de Anatomia Patológica do DCCV, foram coletados fragmentos de fígado, baço, rim, linfonodos e pele da ponta da orelha dos animais, e armazenados em formol a 10% tamponado. O material foi encaminhado ao Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG para realização de imunohistoquímica, segundo técnica de Tafuri et al., 2004.

### 3.3. Cultura da medula óssea e dos fragmentos de fêmur antes de processamento

No Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do Instituto

de Ciências Biológicas (ICB), as amostras de osso cortical e medular provenientes dos animais do grupo I foram cultivadas separadamente. Aproximadamente 0,3 mL de medula foi acrescido ao meio de cultura. Os fragmentos de osso cortical foram incluídos no meio em quantidade de aproximadamente 30 mg. O processo foi realizado dentro de capela de fluxo laminar (VECO) em tubos de vidro esterilizados contendo meio de cultura bifásico NNN - Novy, McNeal e Nicolle (Nicolle, 1908 citado por De Freitas et al., 2006) enriquecido com meio MEM (Minimum Essential Medium, Gibco, Estados Unidos). As amostras foram mantidas à 23° C + ou - 1° C em estufa biológica (FANEM, Brasil). A cada 10 dias as culturas eram examinadas para avaliação da presença e multiplicação de formas promastigotas de *Leishmania* sp., sendo realizados até dois repiques, incluindo-se uma alíquota do primeiro tubo em outro com novo meio de cultura. As amostras que obtiveram crescimento das formas promastigotas foram criopreservadas em nitrogênio líquido.

#### 3.4. Cultura dos fragmentos de fêmur após os processamentos

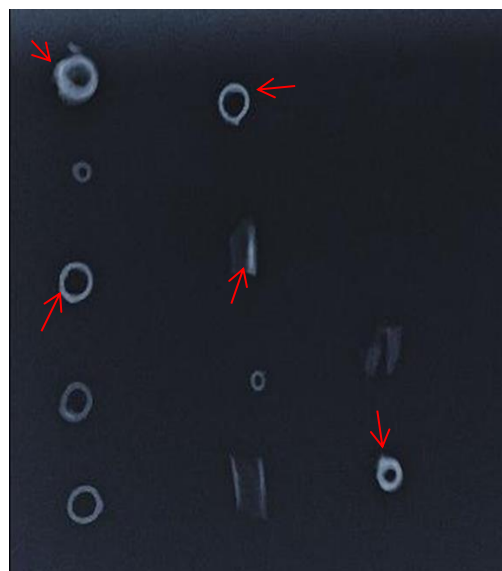
Os ossos destinados ao armazenamento em glicerol PA a 85% permaneceram no tubo *falcon*® estéril de 50 ml com este conteúdo por 30 dias. O tratamento por esterilização em autoclave foi realizado utilizando-se temperatura de 120°C durante 30 minutos, permanecendo os tubos *ependorf*®, que continham as amostras, com as tampas discretamente abertas, porém cobertas com papel alumínio. Após serem submetidas aos tratamentos, as amostras foram inoculadas em meio de cultura para *Leishmania* sp. da mesma forma descrita para as amostras não tratadas.

#### 3.5. Avaliação histológica

No laboratório de Anatomia Patológica do DCCV, as onze amostras de osso de animais infectados e onze de animais não infectados

foram transferidas para um frasco com solução descalcificadora a base de ácido fórmico a 50%. A solução foi trocada por uma nova a cada 48 horas até as amostras adquirirem textura para corte e imagem radiográfica compatível com a descalcificação (Figura 5). Uma vez descalcificadas, as amostras foram lavadas em água corrente durante 24 horas e em seguida processadas no histotécnico (Leica TP1020®) e incluídas em blocos de parafina. Foram realizados cortes de quatro micrômetros para confecção das lâminas que foram submetidas à técnica de coloração com hematoxilina-eosina para avaliação histológica em microscópio óptico.

A avaliação deu-se por contagem diferencial dos componentes da cortical óssea em graticula de 121 pontos, utilizando-se a objetiva de 20x, em sete campos distintos de cada lâmina. Foram contabilizados osteócitos, canalículos ósseos, matriz óssea e artefatos de técnica. Os artefatos, quando existiam, foram excluídos do total de 121 interseções para o cálculo das porcentagens reais das estruturas avaliadas, que foi realizado por meio de regra de três.



**FIGURA 5:** Radiografia das amostras de osso após 20 dias em solução descalcificadora. As setas apontam regiões ainda calcificadas.



### 3.6. Teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

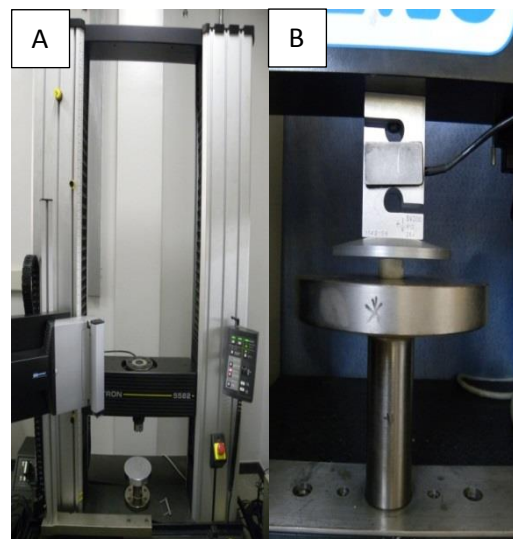
A técnica de PCR convencional foi realizada nas amostras de medula dos cães não infectados e de cães infectados utilizando-se um kit de extração (Invitrogen) e protocolo sugerido pelo fabricante. Após extração do DNA, as amostras foram amplificadas e aplicadas em gel de poliacrilamida que foi submetido à eletroforese. Para identificação de DNA de *Leishmania* sp., utilizaram-se os primers LV-P1 e LV-P2, segundo técnica descrita por Piarroux et al. (1993). O iniciador descrito por este autor é formado por um par de oligonucleotídeos que amplifica um fragmento de 100pb da região conservada do kDNA do minicírculo do complexo *Leishmania donovani*: LV-P1 [5'-ACGAGGTCAGCTCCACTCC-3'] e LV-P2 [5' CTGCAACGCCTGTGTCTACG-3']. O teste foi realizado no Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do ICB, sendo os parasitos isolados identificados como *Leishmania infantum*.

### 3.7. Ensaio de compressão mecânica

As amostras de osso coletadas para a realização do ensaio mecânico foram armazenadas em congelador (-18°C) pelo período de até nove meses. Foram descongeladas à temperatura ambiente e reidratadas em solução salina a 0.9% duas horas antes da realização dos testes. As amostras tiveram suas extremidades lixadas com lixa de parede umedecida em água para que ficassem lisas e permitissem contato uniforme com as placas do aparelho de compressão, no qual eram posicionadas em seu eixo longitudinal (Figura 6b). Foi utilizado o equipamento de ensaios universal Instron modelo 5582 (Figuras 6a e 6b), com célula de carga de 100KN. A velocidade do ensaio foi de 0,01mm/s.

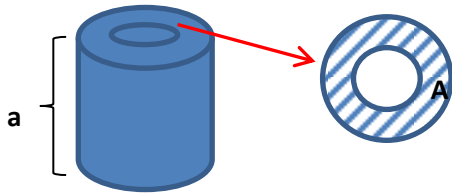
Com o auxílio de um paquímetro foram medidos os diâmetros externo e interno (ambos nos sentidos crânio-caudal e médio-

lateral) da superfície das amostras e o comprimento das mesmas. O valor médio do diâmetro foi considerado para a realização do cálculo da área da superfície de cada amostra e da tensão máxima exercida pelo aparelho no momento de máxima deformação do osso.



**FIGURA 6:** A: equipamento de ensaios universal Instron modelo 5582; B: amostra de osso cortical posicionada em seu eixo longitudinal no equipamento para o início do ensaio. Fonte: arquivo pessoal.

Para minimizar o efeito da variação entre raças e tamanhos sobre o resultado do teste, as amostras de cada grupo foram selecionadas de maneira que os comprimentos dos fragmentos ósseos variassem de forma similar entre grupos. Para corrigir as diferenças entre as áreas das amostras, foi utilizada a fórmula  $t=F/A$  para o cálculo da tensão máxima, sendo  $t$ = tensão;  $F$ = força ou carga máxima de compressão; e  $A$ = área da superfície da amostra (área hachurada na Figura 7). A medula óssea foi retirada para permitir maior uniformidade da amostra em termos de composição da mesma, uma vez que medula e cortical ósseas apresentam componentes diferentes e, portanto, resistências diferentes.



**FIGURA 7:** Área e altura da amostra de osso para cálculo da tensão máxima. a: altura e A : área.

O módulo de elasticidade foi calculado baseando-se na escolha de dois pontos no gráfico obtido a partir da deformação causada nas amostras de acordo com cada tensão aplicada. Estes pontos faziam parte do regime elástico, que é graficamente retilíneo, em todas as amostras, sendo uma tangente traçada adjacente à cada curva de compressão formada para a seleção de seu trecho retilíneo. O valor do módulo de elasticidade é o quociente entre a diferença entre os valores de tensão e a diferença entre os valores de deformação, nos dois pontos selecionados no gráfico, conforme a fórmula  $\Delta\sigma/\Delta\varepsilon=(\sigma_B-\sigma_A)/(\varepsilon_B-\varepsilon_A)$ , sendo  $\sigma$  = tensão (Mpa) e  $\varepsilon$  = deformação (%).

### 3.8. Análise estatística dos dados

A escolha dos testes estatísticos para cada ítem estudado neste trabalho foi feita de acordo com Sampaio (2002). A eficácia dos dois tratamentos aplicados ao osso cortical (armazenamento em glicerol e esterilização por autoclave) foi realizada por meio da aplicação do teste de McNemar, comparando-se o grupo controle com cada um dos tratamentos separadamente. Já a comparação entre o número de amostras de medula e cortical positivas na cultura foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Fischer. A comparação dos dados obtidos na avaliação histológica se deu por meio de ANOVA com subsequente aplicação do teste Fischer para cada uma das estruturas (osteócito, matriz e canalículo ósseos) consideradas separadamente, entre o grupo controle (cães sem infecção) e o grupo infectado por *L. infantum*. O mesmo teste foi aplicado na comparação da tensão máxima e do módulo de elasticidade obtidos no teste de compressão mecânica dos ossos entre cães

infectados (positivos) e não infectados (negativos). Foi realizada análise do coeficiente de correlação de Spearman entre os testes diagnósticos (parasitológico direto, PCR convencional e cultura utilizando-se osso cortical e medular).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Confirmação do grupo de animais não infectados

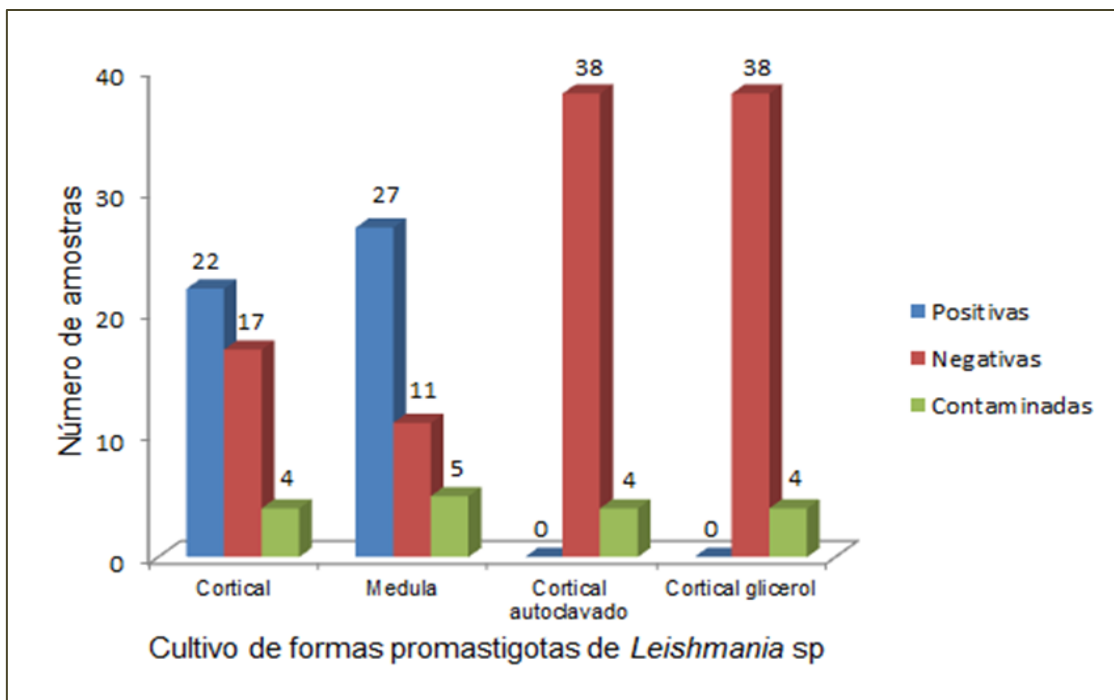
Os esfregaços de medula óssea e linfonodos não demonstraram formas amastigotas do parasito em nenhum dos animais selecionados. Além disso, nenhum deles apresentou marcações de *Leishmania* sp. à imuno-histoquímica em todos os tecidos avaliados, à exceção da amostra selecionada do laboratório para controle positivo. Em conformidade com a literatura (Tafuri et al., 2004) a técnica apresentou-se eficaz na detecção dos parasitos. A PCR também não apresentou banda específica para o parasito nos cães supostamente livres da doença, enquanto o controle positivo formou uma banda nítida. Assim, todos os animais do grupo não infectado foram incluídos no trabalho.

### 4.2 Avaliação do crescimento de *Leishmania* sp. em meio de cultura

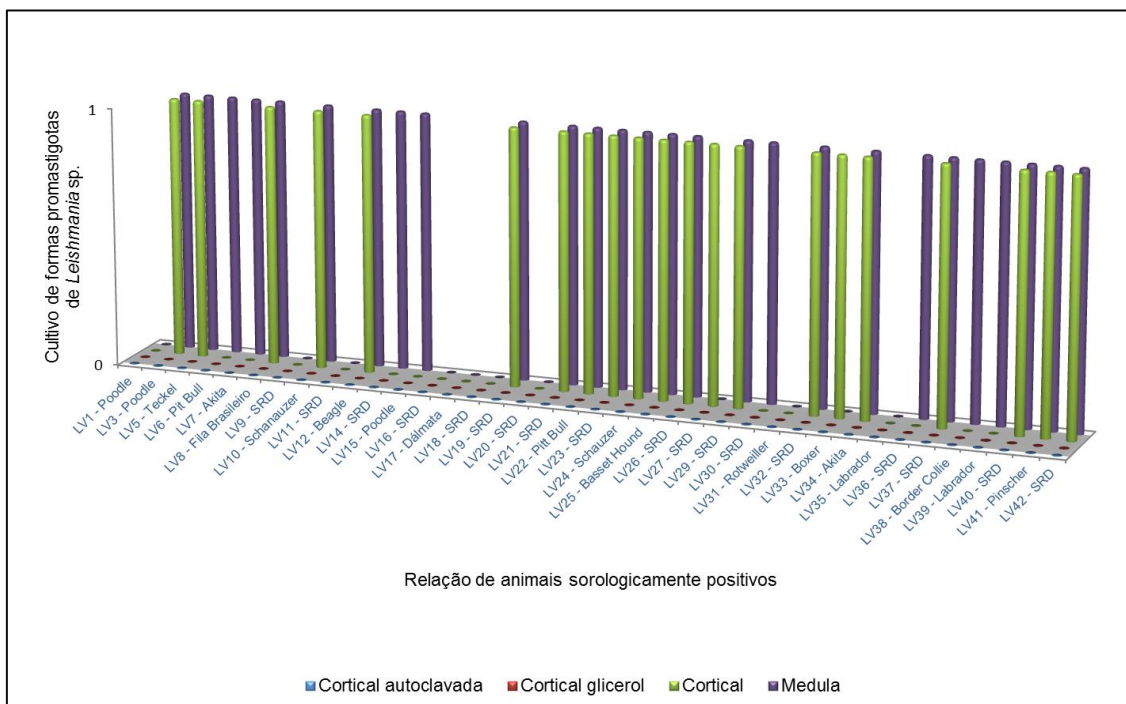
A Figura 8 apresenta dados gerais sobre o crescimento dos parasitos em meio de cultura antes e após cada processamento do osso, e a Figura 9 mostra o resultado referente a cada animal. Houve crescimento de *Leishmania* sp. em culturas de 27 amostras de medula óssea e 22 de osso cortical, não havendo diferença significativa de isolamento do parasito entre esses tecidos ( $p>0.05$ ). Uma hipótese para o ocorrido é que a *L. infantum*, um parasita do sistema monocítico-fagocitário (Alvar et al, 2004), invade osteoclastos, que fazem parte deste sistema (Boyle, 2003) para sua multiplicação, mantendo o tecido infectado. Além disso, a proximidade da cortical com a medula óssea, um dos tecidos mais

acometidos em animais com leishmaniose visceral (Tafari et al., 2001; Solano-Gallego et al, 2007; Manna et al., 2008), poderia promover a extensão da infecção para este

tecido. A Figura 10 mostra formas promastigotas cultivadas a partir da cortical óssea, formando as chamadas rosetas.



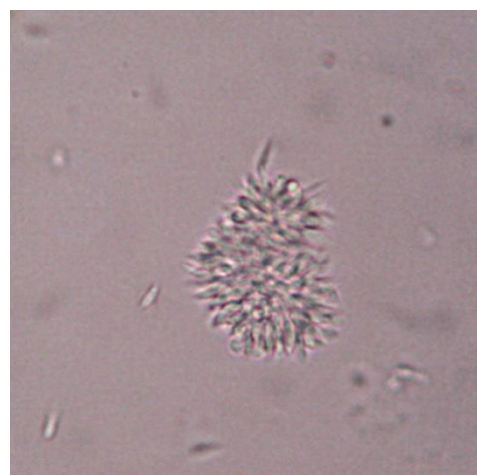
**FIGURA 8:** Número de amostras positivas, negativas e contaminadas no cultivo de osso cortical e medula óssea sem tratamento e submetidos a esterilização em autoclave e armazenamento em glicerol de cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. n= 43.



**FIGURA 9:** Relação de animais sorologicamente positivos para *Leishmania* sp, envolvidos no experimento, e crescimento dos parasitos em meio de cultura antes e após cada processamento do osso. No eixo das ordenadas 0= ausência de crescimento e 1= crescimento de formas amastigotas.

Dentre os treze animais cujas amostras não apresentaram crescimento do parasito em meio de cultura, quatro apresentaram-se contaminadas com bactérias ou fungos, prejudicando o possível crescimento de *Leishmania* sp. Outras duas evidenciaram outro parasito (*Ehrlichia canis*) no esfregaço de medula óssea, fato que justificaria a positividade no exame sorológico por meio de reação cruzada, sem que o animal estivesse realmente infectado por *Leishmania* sp. Reação cruzada entre leishmaniose visceral e infecção por *Babesia canis* pelo teste de dot-ELISA foi observada em um cão por Mancianti et al. (1996), e em cães infectados por *B. canis* e *Ehrlichia* sp pelos testes RIFI e ELISA (Gomes e Cordeiro, 2004; Ferreira et al., 2007). Troncarelli et al. (2008), por sua vez, relataram reação cruzada no teste RIFI entre *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*, devido a proximidade filogenética destes agentes. Para os sete animais restantes suspeita-se

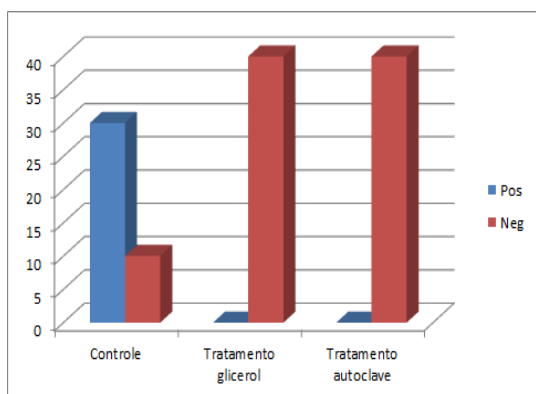
que também houve resultado sorológico falso positivo (para aqueles com esfregaço de medula óssea negativo) ou que a carga parasitária no tecido não foi suficiente para permitir o crescimento em meio de cultura (Navin, 1990).



**FIGURA: 10:** Formas promastigotas de *Leishmania infantum* cultivadas a partir de amostra de osso cortical. No centro, os parasitos se reúnem formando rosetas.



Não houve crescimento de *Leishmania* sp. após o armazenamento em glicerol por 30 dias em nenhuma das amostras, inclusive naquelas positivas previamente à conservação/tratamento. A avaliação estatística mostrou diferença ( $p < 0,0001$ ) entre o grupo sem tratamento e o grupo glicerol (Figura 11), permitindo afirmar que o armazenamento no glicerol durante o período referido foi uma técnica eficaz para a destruição do parasito. Isto sugere que enxertos ósseos após este processamento não transmitem a infecção por *L. infantum* para o receptor do transplante.



**FIGURA: 11:** Número de amostras positivas (Pos) e negativas (Neg) na cultura de *Leishmania* antes (Controle) e após os tratamentos dos ossos (esterilização em autoclave ou armazenamento em glicerol).

Efeitos bactericidas ou bacteriostáticos do glicerol são citados na literatura (Pigossi et al., 1971; Pinto Junior et al., 1996; Melo et al., 1998; Del Carlo et al., 1999; Krauspenhar et al., 2003). Essa capacidade antimicrobiana se deve ao fato de que a glicerina a 98% é um agente fixador e desidratante de atuação rápida, agindo como um poderoso antisséptico (Alvarenga, 1992). O mesmo poderia justificar a eficácia do produto na eliminação de *Leishmania* sp.

No presente estudo, apesar da coleta asséptica das amostras, algumas culturas contendo tecidos conservados em glicerol apresentaram crescimento bacteriano discreto. Desta forma, pode-se inferir que

existe uma limitação na capacidade bactericida do produto, ou seja, nem todos os tipos de bactérias são afetadas pelo glicerol, mesmo após 30 dias de armazenamento. O glicerol teria uma atividade bacteriostática, conforme demonstrado também em estudos de Melo et al. (1998), Del Carlo et al. (1999), Gioso et al. (2002), Ziliotto et al. (2003) e Giovani et al., (2006), e não bactericida, como citaram outros autores (Pigossi et al., 1971; Pinto-Junior et al., 1996; Krauspenhar et al., 2003).

Devido à presença de agentes que dificultam a extração de DNA no osso cortical, como o cálcio, a técnica de PCR após o armazenamento em glicerol não foi realizada, uma vez que a metodologia exige kits/produtos específicos. É importante avaliar futuramente a presença de DNA do parasito no osso cortical após o armazenamento em glicerol, tendo em vista a possibilidade de redução da rejeição do enxerto.

Com relação às amostras esterilizadas em autoclave, nenhuma mostrou crescimento de *Leishmania* sp. Comparando-se o grupo controle (não tratado) com o grupo esterilizado, houve diferença estatística ( $p < 0,0001$ ), permitindo afirmar que o método testado é eficaz para impedir que a infecção seja transmitida a um animal receptor de enxerto ósseo (Figura 11). A literatura já aborda a eficácia da esterilização por autoclave contra microorganismos, principalmente bacterianos (Hooe e Steinberg, 1996). Além disso, temperatura utilizada para a esterilização é muito superior à citada por outros autores como letal ao parasito (Berman e Neva, 1981; Biegel et al., 1983; Rioux et al., 1985; Raina e Kaur, 2006).

A PCR do osso cortical após esterilização em autoclave para detecção de DNA de *L. infantum* não foi realizada pelos mesmos motivos já mencionados para as amostras

armazenadas em glicerol. A literatura, porém, cita a redução da quantidade de DNA quando se emprega este tipo de esterilização. Gefrides et al. (2010) após esterilização de materiais contendo saliva em autoclave por diferentes tempos concluíram que o número de alelos detectáveis diminuiu proporcionalmente ao aumento do tempo de esterilização, sendo que, com 60 minutos, mais de 75% do perfil já havia sido eliminado. Apesar disso, vacinas feitas com diversas espécies de *Leishmania* autoclavada foram testadas para produção de resposta imunológica eficaz contra o parasito e obtiveram êxito, comprovando a existência de uma capacidade antigênica (Sharifi et al, 1998; Srivastava et al, 2003; Gramiccia e Gradoni, 2005; Nagill et al, 2009). Desta forma, são necessários estudos mais detalhados sobre a eliminação do DNA de *Leishmania* sp. após a esterilização do enxerto por períodos, temperatura e pressão diferentes, bem como uma análise mecânica da resistência do material para cada sequência de tempo escolhida, visando a verificação da integridade do osso em cada caso e a resposta inflamatória produzida pelo enxerto no receptor. Também deve-se avaliar se ocorre manutenção das propriedades osteogênica, osteoindutora e osteocondutora, descritas por Weigel (1993), Johnson (1995), Perry (1999), Johnson e Hulse (2002), Santos e Rahal (2004), e Pinto et al (2007), muito importantes para o sucesso do enxerto. Desta forma, torna-se possível selecionar a melhor associação entre a porcentagem de DNA eliminado, manutenção das propriedades osteocondutora, osteoindutora e osteogênica, e a resistência mecânica do material para enxerto.

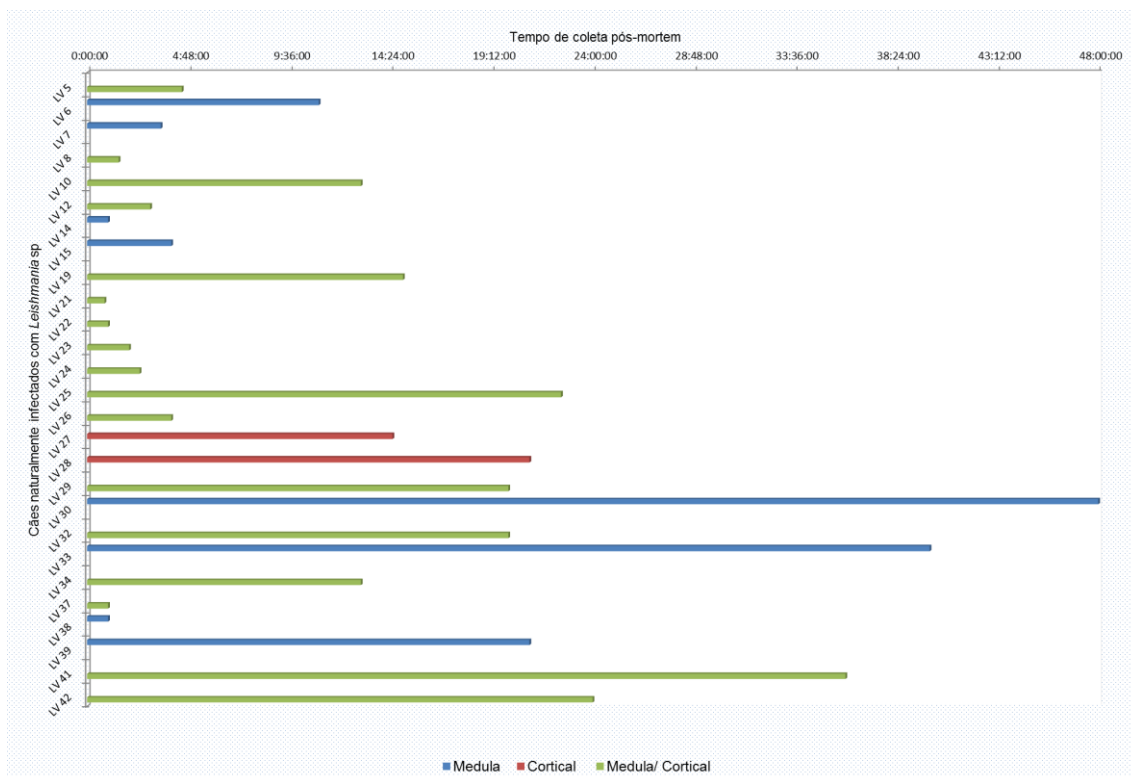
Uma vez que ambos os tipos de processamento do osso obtiveram sucesso na eliminação do parasito em questão, a escolha da melhor técnica para a conservação do osso dependerá de outros fatores, tais como: a resistência mecânica oferecida pelo

material, o tipo de coleta no doador (forma asséptica ou não), a capacidade do material para osteogênese, osteoindução e osteocondução e o custo da técnica. Neste trabalho, optou-se por estudar as técnicas de armazenamento em glicerol e esterilização em autoclave devido ao seu baixo custo e a facilidade de execução associados à qualidade que proporcionam ao enxerto. É importante ressaltar que ambas apresentam limitações, como a redução da resistência mecânica nos tecidos autoclavados e a redução da capacidade osteogênica em ambas as técnicas. Desta forma, outras técnicas de processamento do osso também devem ser estudadas futuramente quanto à capacidade de eliminação da *Leishmania* sp., tendo em vista que cada uma apresenta suas vantagens e limitações que devem ser analisadas para a escolha da melhor técnica a ser aplicada em cada caso, como citado na literatura (Pigossi et al., 1971; Kerwin et al., 1991; Weigel, 1993; Wagner, 1994; Pinto-Junior et al., 1996; Hooe e Steinberg, 1996; Fitch et al., 1997; Friedlander et al., 1998; Boyce et al. 1999; Del Carlo et al., 1999; Yim et al., 2000; Matter et al. 2001; Cavassani, 2001; Gioso et al., 2002; Castania, 2002; Johnson e Hulse, 2002; Cornu et al., 2003; krauspenhar et al., 2003; Ziliotto et al., 2003; Ball et al., 2004; Piermattei et al., 2006; Giovani et al., 2006; Fossum, 2007; Sampaio et al., 2009).

Um fato interessante foi o isolamento de *L. infantum* mesmo de amostras coletadas em cadáveres com 48 horas pós-mortem e mantidos em câmara refrigerada. Thomson e Sinton, (1921) verificaram crescimento de *L. infantum* em meio NNN, o mesmo utilizado neste trabalho, com amostra de medula óssea proveniente de um cadáver com 14 horas pós-mortem, afirmando a resistência elevada do parasito em tecidos internos, que oferecem maior proteção, sem especificar os mecanismos para o ocorrido. A Figura 12 identifica as amostras que cresceram nas culturas de cada animal e o período entre o óbito do paciente e a coleta do material.

Não foram coletadas amostras de animais cujo período pós-mortem era superior a 48 horas para prevenir riscos de contaminação devido ao processo de decomposição dos cadáveres, fato este que poderia prejudicar o crescimento das promastigotas nas amostras sem tratamento. Uma avaliação mais

detalhada do crescimento do parasito em cadáveres com mais de 48 horas pós-mortem é necessária para maiores informações referentes aos mecanismos de resistência da *Leishmania* sp.



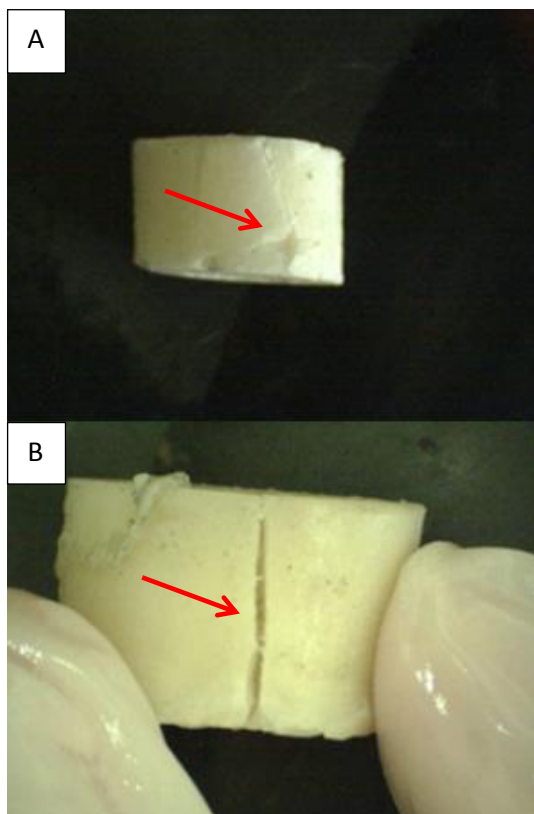
**FIGURA 12:** Relação das amostras de cada animal positivas na cultura e o período entre o óbito do paciente e a coleta do material.

### 4.3 Ensaio mecânico de compressão

Para a inclusão das amostras nos resultados foram utilizadas seis das 11 colhidas para os testes mecânicos, devido à seleção dos animais, que deveriam ter idade superior a dois anos e não serem castrados, e devido à perda de amostras durante a padronização dos testes mecânicos.

amostra sob diferentes cargas até que o osso se rompesse, sendo a carga aplicada neste momento considerada a máxima, e foi a utilizada para o cálculo das tensões de deformação. As Figuras 13a e 13b apresentam exemplos das amostras após sua ruptura, no momento em que o teste era interrompido.

O teste mecânico utilizado permitiu a obtenção de vários pontos de deformação da



**FIGURA 13:** A e B: Exemplos das amostras após sua ruptura (setas), no momento em que o teste era interrompido.

Os valores encontrados para a tensão de deformação máxima de cada amostra estão listados na Tabela 1 e as curvas produzidas durante o teste estão caracterizadas nas

Figuras 14 e 15. Não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os grupos de animais infectados e não infectados, ou seja, os grupos apresentam resistência mecânica similar à compressão do osso. Também não houve diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ) no módulo de elasticidade obtido para os animais de cada grupo.

Pouco foi estudado sobre as alterações na cortical óssea causadas pela leishmaniose. Os trabalhos que relatam alterações corticais mencionam principalmente casos de osteomielites com características líticas na cortical e infiltrado inflamatório (Sprengh, 1993; Buracco et al., 1997; McConkey et al., 2002; Agut et al., 2003; Costa et al., 2005; De Souza et al., 2005; Costa et al., 2006; Santos et al., 2006). Essas alterações, no entanto, são macroscópica e radiograficamente visíveis neste estágio, e tal osso não seria incluído em um banco de ossos. Desta forma, são necessários mais estudos mecânicos e histológicos da cortical óssea, inclusive quanto à composição de hidroxiapatita e colágeno, responsáveis, respectivamente, pela rigidez e elasticidade do tecido ósseo (Mears, 1979; Harkess, 1993; Serakides, 2011) para verificar se uma amostra aparentemente sadia não apresenta lesões e/ou alterações microscópicas na composição que comprometeriam as funções mecânicas do enxerto.

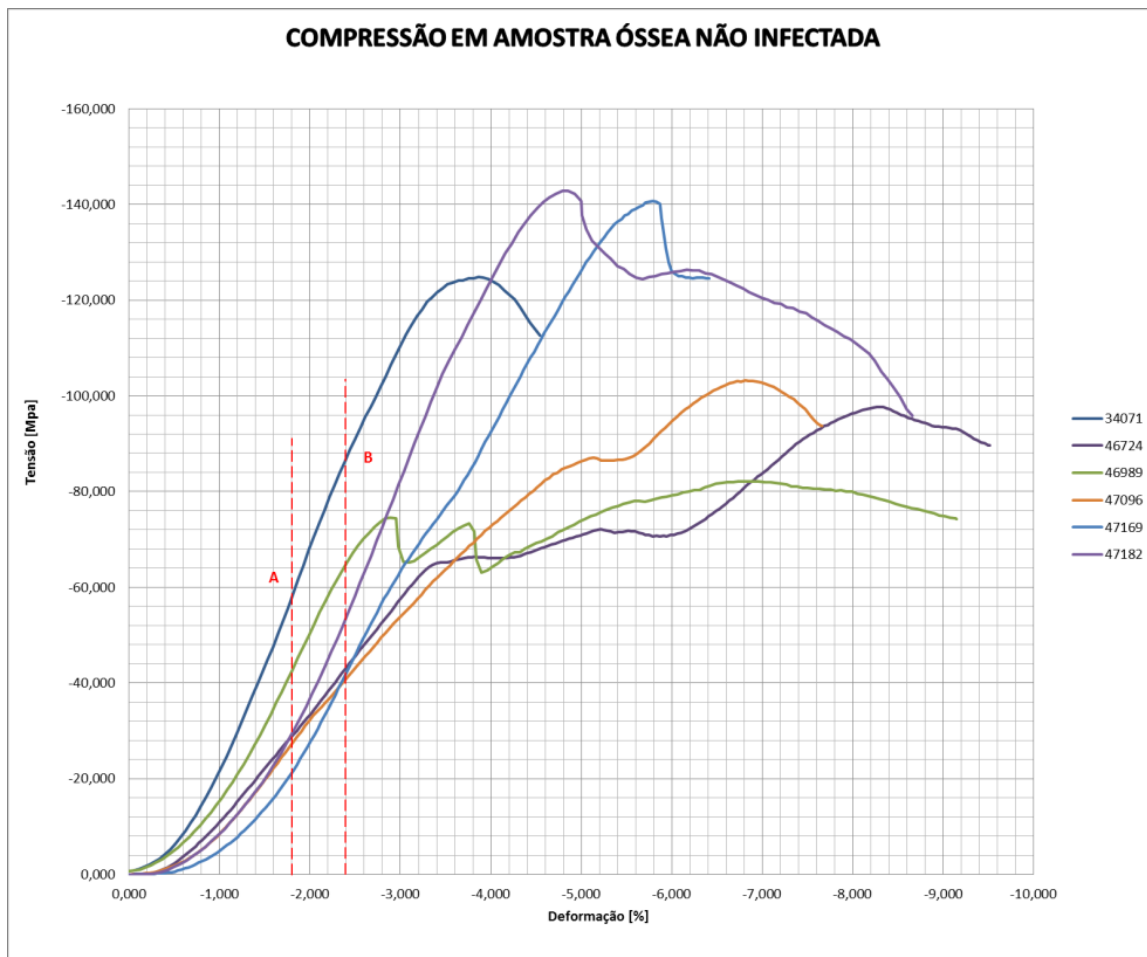
**TABELA 1:** Valores de tensão máxima e módulo de elasticidade obtidos para as amostras de cães infectados e não infectados por *Leishmania* sp.

Amostras Positivas	Tensão máxima (N/mm <sup>2</sup> )	Módulo de elasticidade (MPa)	Amostras Negativas	Tensão máxima (N/mm <sup>2</sup> )	Módulo de elasticidade (MPa)
LV1	120,961	29,29607	N34071 8	124,792	47,8734
LV3	119,591	14,38852	N46724 7	97,6526	23,9508
LV10	88,1181	15,40299	N46989 9	82,1719	37,21321
LV12	74,9948	12,28745	N47096 10	103,203	24,79996
LV14	74,5784	22,53636	N47169 5	92,9168	34,99436
LV18	132,23	47,182	N47182 6	142,816	31,0354
<b>Média</b>	<b>101,74</b>	<b>23,51</b>		<b>107,26</b>	<b>33,31</b>
<b>DV</b>	<b>25,72</b>	<b>13,19</b>		<b>22,43</b>	<b>8,89</b>
<b>CV (%)</b>	<b>25</b>	<b>56</b>		<b>21</b>	<b>27</b>

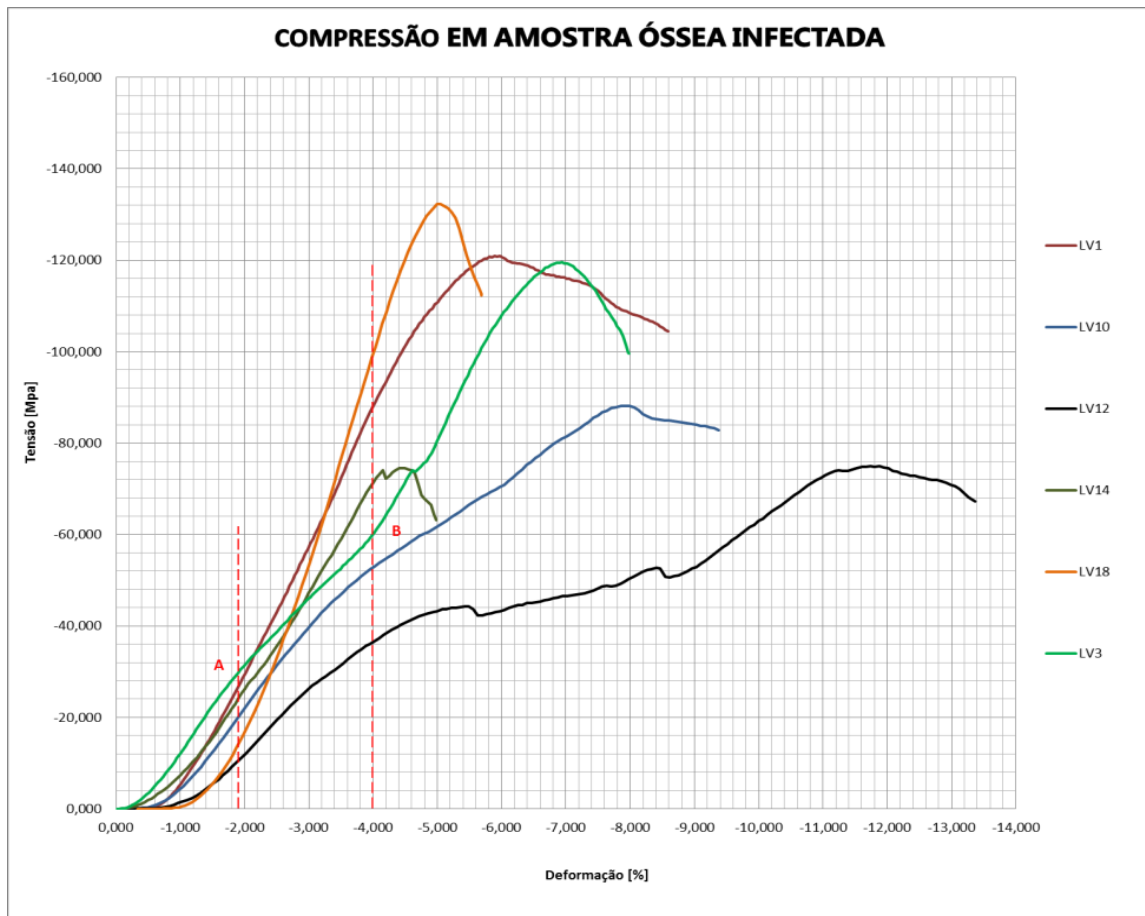
Legenda: LV: Leishmaniose Visceral; N: Negativos para leishmaniose; DV: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Outras técnicas para avaliação de resistência do tecido (Souza, 1974) e outras forças de atuação no osso citadas na literatura (Burstein, 1972; Hulse e Hyman, 1998)

também devem ser estudadas em amostras de animais infectados para confirmar a normalidade da resistência mecânica, encontrada neste estudo.



**FIGURA 14:** Tensão (MPa) versus deformação(%) das amostras de osso não infectadas. A faixa encontrada entre os traçados A e B foi utilizada para o cálculo do módulo de elasticidade.



**FIGURA 15:** Tensão (MPa) versus deformação(%) das amostras de osso infectadas com *Leishmania infantum*. A faixa encontrada entre os traçados A e B foi utilizada para o cálculo do módulo de elasticidade .

#### 4.4 Avaliação morfométrica

Para a inclusão das amostras nos resultados foram utilizadas oito das 11 amostras colhidas para morfometria devido à seleção dos animais, que deveriam ter idade superior a dois anos e não serem castrados.

Na avaliação histológica não foram observadas alterações patológicas como áreas líticas, necróticas, células atípicas, etc., em nenhum dos grupos estudados.

A contagem diferencial, em porcentagem, de canalículos, osteócitos e matriz óssea nos animais dos grupos infectados e não infectados estão na Tabela 2. A média de canalículos foi de 3,84% e 3,16%,

respectivamente, nos grupos de animais infectados e não infectados, sendo que, na análise estatística dos dados, não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O coeficiente de variação (CV) para o grupo de animais não infectados foi de 26,16% e o dos animais infectados de 56,6%. Este último determina uma variação grande de dados no grupo, sendo, portanto, necessário uma amostragem maior em estudos futuros para confiabilidade desta resposta.

A média da porcentagem de matriz óssea foi de 88,53% e 90,71% nos grupos positivos e negativos para Leishmaniose, respectivamente, com CVs de 2,4% e 2,3%, também não havendo diferença significativa

entre os grupos ( $p > 0,05$ ). A variação dos dados dentro de cada grupo foi consideravelmente baixa e, portanto, a resposta encontrada é de significativa credibilidade.

A porcentagem média de osteócitos encontrada nos grupos de animais infectados foi de 8,09%, e de 6,18% no grupo não

infectado, com CVs de 15,89% e 14,66%, ou seja, dentro do limite de até 30%, considerado razoável para experimentação animal. Neste caso, observou-se diferença significativa ( $p < 0,02$ ) entre os dados dos grupos, sem que houvesse variação significativa dos dados entre as amostras de cada grupo (Figura 16).

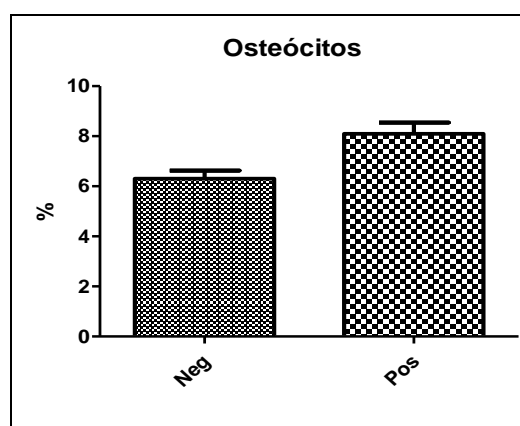
**TABELA 2:** Contagem diferencial de canalículos, osteócitos e matriz óssea nos animais dos grupos infectados e não infectados.

	Amostras de animais infectados			Amostras de animais não infectados			
	Canalículos (%)	Matriz (%)	Osteócitos (%)	Canalículos (%)	Matriz (%)	Osteócitos (%)	
<b>LV1</b>	2,01	91,72	6,39	<b>N1</b>	2,24	90,67	7,37
<b>LV2</b>	2,50	88,59	8,91	<b>N3</b>	2,97	91,27	5,75
<b>LV3</b>	3,67	87,69	8,64	<b>N4</b>	4,72	89,96	5,31
<b>LV4</b>	6,86	84,98	8,16	<b>N5</b>	2,38	92,16	5,46
<b>LV6</b>	4,25	89,14	6,61	<b>N7</b>	2,60	89,84	7,56
<b>LV7</b>	7,37	86,58	9,74	<b>N9</b>	3,07	89,73	7,20
<b>LV8</b>	2,00	88,66	9,33	<b>N10</b>	3,79	91,48	4,73
<b>LV18</b>	2,13	90,89	6,97	<b>N11</b>	3,56	90,63	6,09
<b>Média</b>	<b>3,85</b>	<b>88,53</b>	<b>8,09</b>		<b>3,16</b>	<b>90,71</b>	<b>6,18</b>
<b>DP</b>	<b>2,18</b>	<b>2,18</b>	<b>1,29</b>		<b>0,83</b>	<b>0,87</b>	<b>1,06</b>
<b>CV (%)</b>	<b>56,6</b>	<b>2,4</b>	<b>15,89</b>		<b>26,16</b>	<b>2,3</b>	<b>14,66</b>

LV: Leishmaniose Visceral; N: negativos para leishmaniose visceral; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

De acordo com a literatura consultada, os osteócitos possuem como funções a reabsorção óssea por meio de osteólise osteocítica e a estimulação de osteoblastos para produzir matriz óssea, promovendo, desta forma, a manutenção da homeostasia sérica do cálcio (Burger et al., 1995; Qing e Bonewald, 2009; Serakides, R. 2011). O aumento do número destas células em cães com Leishmaniose visceral pode estar associado a um aumento no processo de reabsorção óssea para disponibilizar o cálcio no sangue ou a um aumento de deposição de cálcio no osso. Uma avaliação morfométrica que considere a diferenciação entre osteócitos em atividade de osteólise osteocítica e osteócitos inativos, em processo de apoptose, é necessária para compreender algumas consequências que a doença pode provocar no tecido ósseo. Na avaliação qualitativa das lâminas, verificou-se maior quantidade de osteócitos em atividade de osteólise osteocítica naquelas

referentes aos cães com Leishmaniose. Isto poderia sugerir uma maior fragilidade de osso desses animais, o que não foi confirmado pelo teste de compressão mecânica.



**FIGURA 16:** Percentagem (%) de osteócitos na cortical óssea de animais negativos e positivos para Leishmaniose visceral. Legenda: Neg: Negativos; Pos.: positivos.

#### 4.5 Comparação entre os testes diagnósticos

Os resultados dos testes realizados para diagnóstico da Leishmaniose Visceral (PCR,

parasitológico direto em medula óssea, cultura de medula óssea e cultura de cortical óssea) encontram-se na Tabela 3.

**TABELA 3:** Relação de animais e resultados dos exames diagnósticos realizados.

IDENTIFICAÇÃO	PCR	ESFREGAÇO DE MEDULA	CULTURA DE MEDULA	CULTURA DE CORTICAL
LV1	XXXXXXXXXX	POS	NEG	NEG
LV2	XXXXXXXXXX	POS	CONT.	CONT.
LV3	XXXXXXXXXX	POS	POS	POS
LV4	NEG	POS	CONT.	CONT.
LV5	POS	POS	POS	POS
LV6	NEG	NEG	POS	NEG
LV7	NEG	NEG	POS	NEG
LV8	POS	POS	POS	POS
LV9	XXXXXXXXXX	POS	NEG	NEG
LV10	XXXXXXXXXX	POS	POS	POS
LV11	XXXXXXXXXX	NEG	NEG	NEG
LV12	POS	POS	POS	POS
LV13	POS	POS	CONT.	CONT.
LV14	POS	POS	POS	NEG
LV15	POS	POS	POS	NEG
LV16	POS	POS	NEG	NEG
LV17	NEG	NEG	NEG	NEG
LV18	POS	POS	NEG	NEG
LV19	POS	POS	POS	POS
LV20	NEG	POS	NEG	NEG
LV21	POS	POS	POS	POS
LV22	POS	POS	POS	POS
LV23	POS	POS	POS	POS
LV24	XXXXXXXXXX	POS	POS	POS
LV25	POS	POS	POS	POS
LV26	POS	POS	POS	POS
LV27	XXXXXXXXXX	NEG	NEG	POS
LV28	XXXXXXXXXX	POS	CONT.	POS
LV29	POS	POS	POS	POS
LV30	POS	POS	POS	NEG
LV31	XXXXXXXXXX	NEG	NEG	NEG
LV32	POS	POS	POS	POS
LV33	POS	NEG	NEG	POS
LV34	POS	POS	POS	POS
LV35	POS	NEG	NEG	NEG
LV36	POS	NEG	POS	NEG
LV37	POS	POS	POS	POS
LV38	POS	NEG	POS	NEG
LV39	POS	NEG	POS	NEG
LV40	XXXXXXXXXX	NEG	POS	POS
LV41	XXXXXXXXXX	POS	POS	POS
LV42	XXXXXXXXXX	POS	POS	POS
LV43	XXXXXXXXXX	POS	CONT.	CONT.

Legenda: XXX: teste não realizado; POS.: positivo; NEG.: negativo; CONT.: amostra contaminada.



Conforme relatado na literatura (WHO, 2010; Srivastava et al, 2011), o exame parasitológico direto, apesar de apresentar 100% de especificidade, possui sensibilidade limitada, o que também foi observado neste estudo, tendo em vista que em nove amostras de animais considerados positivos nos outros testes (sorologia, cultura de medula/cortical ósseas e PCR) não foram observadas formas amastigotas do parasito nos esfregaços de medula óssea. Da mesma forma, animais positivos no esfregaço foram considerados negativos em outros testes.

As porcentagens das correlações encontradas entre os testes realizados foram pequenas, sendo a maior correlação entre a cultura de medula e a cultura de osso cortical, com 47%. Este fato pode significar a importância da carga parasitária no animal, do tempo de infecção e apresentação de sinais clínicos, conforme já sugerido por Mettler et al (2005) e Porrozzzi et al., (2007) durante a realização de testes sorológicos, da distribuição do parasito nos tecidos e da forma como a infecção se procedeu no hospedeiro (transmissão transplacentária, venérea, transplante de órgãos ou transfusão sanguínea, via repasto sanguíneo pelo flebotômico ou contato direto com secreções corporais contendo o parasito - de acordo com a literatura consultada: Killick-Kendrick, 1999; Rosypal et al, 2005; Duprey et al., 2006; de Freitas et al., 2006; Tabar et al., 2008; Sharma and Singh, 2008; Solano-Gallego et al., 2009; Silva et al., 2009; WHO, 2010; Boggiatto et al., 2011; Solano-Gallego et al, 2011). Além disso, as variedades de técnicas existentes para cada tipo de teste também devem ser consideradas, tendo em vista as alterações que causam na sensibilidade e especificidade do mesmo, fato este já descrito para os testes sorológicos por Killick-Kendrick, 1990, Herwaldt (1999), Mettler et al. (2005), Ferreira et al. (2007), Porrozzzi et al. (2007) e Miró et al. (2008); e para a PCR por Solano-Gallego et al. (2007), Francino et al. (2006); Gomes et al. (2008), Maia e Campino

(2008), Miró et al. (2008), Manna et al. (2008) e Ferreira et al. (2008).

## 5. CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizada essa pesquisa e diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O tratamento das amostras de osso tanto por esterilização em autoclave quanto por armazenamento em glicerol por 30 dias são eficientes para eliminar *Leishmania infantum* do tecido;
- A resistência mecânica à compressão do osso macroscopicamente sem alterações/sadio não é afetada pela doença;
- Há um maior número de osteócitos no tecido de cães infectados em relação aos não infectados, e são necessárias mais avaliações para verificar os processos envolvidos e outras alterações que podem se desenvolver, para melhor avaliação da qualidade do tecido.
- Uma vez que não há correlação entre os testes realizados para diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp., é necessária a combinação de testes para excluir a possibilidade de infecção pelo parasito no cão. Desta forma, estudos sobre novas possibilidades diagnósticas, que determinem maiores especificidade e sensibilidade para a detecção do parasito, são indispensáveis para obter um resultado confiável.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- A realização do teste de PCR das amostras de cortical após os processamentos para a verificação de DNA de *Leishmania* sp. nos tecidos;
- Nova avaliação morfológica para comparar a percentagem de osteócitos em atividade de osteólise osteocítica em cães infectados e não infectados pelo parasito.

- Realização do estudo in vivo, transplantando-se o osso proveniente de cães infectados, após o processamento do material em autoclave ou glicerol, no tecido subcutâneo de camundongos livres de infecção, com posterior análise deste tecido para infecção pelo parasito.
- Estudos sobre maiores períodos de conservação da *Leishmania* sp. no cadáver e os mecanismos envolvidos nesta resistência do parasito.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUT, A.; CORZO, N.; MURCIANO, J. et al. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with Leishmaniasis. *Vet. Rec.*, v. 153, p. 648-652, 2003.
- ALVAR, J.; VE´LEZ, I. D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One.*, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R. et al. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v. 57, p. 1-88. 2004.
- ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R. *Tópicos em cirurgia de cães e gatos*. Jaboticabal: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia - Universidade Estadual Paulista de Botucatu, 1992. p.33-39.
- ARESU, L.; BENALI, S.; FERRO, S. et al. Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from *Leishmania*-seropositive dogs. *Vet. Pathol.*, Set. 6, 2012.
- BALL, S. T.; AMIEL, D.; WILLIAMS, S. K. et al. The effects of storage on fresh human osteochondral allografts. *Clin. Orthop. Relat. Res.* v. 418, p. 246-52, 2004.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends. Parasitol.* v. 24, p. 324-330, 2008.
- BHARGAVA, P.; SINGH, R. Developments in Diagnosis and Antileishmanial Drugs. *Interd. Persp. Inf. Dis.* v. 2012, p. 1-13, 2012.
- BERMAN, J. D.; NEVA, F. A. Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigotes within human monocyte-derived macrophages in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 30, n. 2, p. 318-21, 1981.
- BIEGEL, D.; TOPPER, G.; RABINOVITCH, M. *Leishmania mexicana*: temperature sensitivity of isolated amastigotes and of amastigotes infecting macrophages in culture. *Exp. Parasitol.* v. 56, n. 3, p. 289-97, 1983.
- BOGGIATTO, P. M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; METZ, K. et al. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *Plos Negl. Trop. Dis.* v. 5, p. 4, 2011.
- BOYCE, T.; EDWARDS, J.; SCARBOROUGH, N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop. Clin. North Am.*, v. 30, p. 571-581, 1999.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. et al. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* v., 423, p. 337-342, 2003.
- BURACCO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, R. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. *J. Small Anim. Pract.*, v. 38, n. 1, p. 29-30, 1997.
- BURGER, E. H.; KLEIN-NULEND, J.; VAN DER PLAS, A. et al. Function of

- osteocytes in bone - their role in mechanotransduction. *J. Nutr. Jul.*, v. 125 (7 Suppl), p. 2020S-2023S, 1995.
- BURSTEIN, A. H.; CURREY, J.; FRANKEL, V. H. et al. Bone strength. The effect of screw holes. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v. 54, n. 6, p. 1143-56, 1972.
- CASTANIA, V. A. *Enxerto córtico-esponjoso homogêneo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno, em cães: análise mecânica e estudo da integração por meio de radiografias*. 2002. 54p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação Inter unidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Bioengenharia/USP, São Carlos/SP.
- CAVASSANI, M. M.; MORAES J. R. E.; FILHO, J. G. P. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%: estudo experimental em ratos. *Ciência Rural.*, v. 31, p. 445-448, 2001.
- CORNU, O.; BAVADEKAR, A.; GODTS, B. et al. Impaction bone grafting with freeze-dried irradiated bone. Part II. Changes in stiffness and compactness of morselized grafts: experiments in cadavers. *Acta Orthop. Scand.*, v. 74, n. 5, p. 553-8, 2003.
- COSTA, A. A.; ABREU, A. L.; GOMES, C. M. et al. Experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Leishmania (L) amazonensis*. *Acta Trop.*, v. 98, n. 2, p. 125-9, 2006.
- COSTA, A. A.; SALDANHA, A. C.; LEITE, B. M. et al. Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Acta Trop.*, v. 96, n. 1, p. 9-15, 2005.
- COSTA, F. A. L.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C. B. et al. Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis. *Vet. Pathol.*, v. 40, p. 677-684, 2003.
- COSTA, F. A.; GUERRA, J. L.; SILVA, S. M. et al. CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res. Dec.*, v. 33, n. 12, p. 1455-8, 2000.
- COSTA, F. A.; PRIANTI, M. G.; SILVA, T. C. et al. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. *BMC Infect. Dis.*, v. 10, p. 1-12, 2010.
- COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A., et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v. 128, p. 149-155, 2005.
- COUTINHO, M. T.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet. Parasitol.*, v. 147, p. 320-325, 2007.
- DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; DA COSTA-VAL, A. P. et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet. Parasitol.*, v. 137, p. 159-167, 2006.
- DE SOUZA, A. I.; JULIANO, R. S.; GOMES, T. S. et al. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Vet. Parasitol.*, v. 129, n. 1-2, p. 51-54, 2005.
- DEANE, L.; DEANE, M. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital.*, v. 47, p. 75-87. 1955.
- DEL CARLO, R. J.; GALVÃO, S. R.; VILORIA, M. I. V. et al. Aloenxertos ósseos caninos diferentemente preservados. *Rev. Bras. Cirur. Vet.*, v. 6, p. 11-16, 1999.

- DUPREY, Z. H.; STEURER, F. J.; ROONEY, J. A. et al. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 12, n. 3, p. 440-6, 2006.
- FERREIRA, E. C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.*, v. 146, p. 235–241, 2007.
- FERREIRA, S, A.; ITUASSU, L.T.; MELO, M.N. et al. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 152, p. 257–263, 2008.
- FERREIRA, S. A.; ALMEIDA, G. G.; SILVA, S. O. et al. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Neg Trop Dis.*, v. 7, n. 4, p. e2150, 2013.
- FITCH, R.; KERWIN, S.; NEWMAN-GAGE, H. et al. Bone autografts and allografts in dogs. *Comp. Cont. Educ.*, v. 19, n. 5, p. 558-574, 1997.
- FITZPATRICK, N.; SMITH, T. J.; O'RIORDAN, J. et al. Treatment of incomplete ossification of the humeral condyle with autogenous bone grafting techniques. *Vet. Surg.*, v. 38, p. 173–184, 2009.
- FOSSUM, T. W. *Small Animal Surgery*. 3.ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. 1610p.
- FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E., et al. Advantages of realtime PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v. 137, p. 214–221, 2006.
- FRIEDLANDER, G. E.; STRONG, D. M.; MANKIN, H. J. Immunology of bone allografts: current knowledge. In: PHILLIPS, G. O., STRONG, D. M., VERSEN, R., NATHER A. *Advances in Tissue Banking*. London: World Scientific; 1998. p. 135-6.
- GEFRIDES, L. A.; POWELL, M. C.; DONLEY, M. A. et al. UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables. *Forensic Sci. Int. Genet.*, v. 4, n. 2, p. 89-94, 2010.
- GIOSO, M. A.; BENITES, N. R.; KÄMPF, G. Análise microbiológica de ossos de cães conservados por longo período de tempo na glicerina a 98% à temperatura ambiente, objetivando a enxertia óssea. *Acta Cir. Bras.*, v. 17, n. 4, 2002.
- GIOVANI, A. M. M.; CROCI, A. T.; OLIVEIRA, C. R. G., et al. Comparative study of cryopreserved bone tissue and tissue preserved in a 98% glycerol solution. *Clinics.*, v. 16, p. 565-570, 2006.
- GOMES, A. P. S.; CORDEIRO, R. L. R. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. *Ver. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 23, Supl. 1, p. 238, 2004.
- GOMES, Y. M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R. A. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet. J.*, n. 175, p. 45–52, 2008.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 7, p. 338–349, 2004.
- GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet. Parasitol.*, v. 181, n. 1, p. 23-30, 2011.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and

- approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, p. 1169–1180, 2005.
- HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.*, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.
- HARKESS, J. W. Princípios das fraturas e luxações. In: *Fraturas em adultos*. São Paulo: Manole. 1993. cap. 1, p. 1-178.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet.*, v. 354, p. 1191–9, 1999.
- HOOE, W.; STEINBERG, B. Management of contaminated bone grafts: an experimental in vitro study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 82, n. 1, p. 34-37, 1996.
- HULSE, D.; HYMAN, B. Biologia e mecânica das fraturas. In SLATTER, D. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. São Paulo: Manole, 1998. v. 2, cap. 120, p. 1893-1984.
- JOHNSON, A. L.; EURELL, J. A. C.; SCHAEFFER, D. J. Evaluation of canine cortical bone graft remodeling. *Vet. Surg.*, v. 21, n. 4, p. 293-298, 1992.
- JOHNSON, A.L. Bone grafting. In: OLMSTEAD, M.L. *Small animal orthopedics*. St. Louis: Mosby, 1995. p.146-151.
- JOHNSON, A.L.; HULSE, D.A. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management. In: FOSSUM, T.W. *Small animal surgery*. 2.ed. St. Louis : Mosby, 2002. Cap.33, p.848- 853.
- KERWIN, S. C.; LEWIS, D. D.; ELKINS, A. D. Bone grafting and banking. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v. 13, n. 10, p. 1558-1566, 1991.
- KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 65, n. 1, p. 37-42, 1990.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.*, v. 17, p. 279–289, 1999.
- KRAUSPENHAR, L. C. *Viabilidade bacteriana na glicerina a 98% e em implantes de tendão calcâneo comum em cães*. 2003. 62f. Dissertação de Mestrado em medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- MAIA, C., CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.*, v. 158, p. 274–287, 2008.
- MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet. Parasitol.*, v. 65, n. 1, p. 1-9, 1996.
- MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F. et al. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.*, v. 177, p. 279–282, 2008.
- MAROLI, M.; ROSSI, L.; BALDELLI, R. et al. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health.*, v. 13, p. 256–264, 2008.
- MATTER, H. P.; GARREL, T. V.; BILDERBEEK, U. et al. Biomechanical examinations of cancellous bone concerning the influence of duration and temperature of cryopreservation. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 55, n. 1, p. 40-4. 2001.

- MCCONCKEY, E. S. Leishmanial polyarthritis in a dog. *Can Vet J.*, v. 43, p. 607-609, 2002.
- MEARS, D. C. The tissues of the musculoskeletal system. In: *Materials and orthopaedic surgery*. Baltimore: Williams & Willkings, 1979. p. 762.
- MELO, E. G. et al. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tibia de cão. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 50, n. 4, p. 385-94, 1998.
- METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 5515-5519, 2005.
- MILLIS, D. L.; MARTINEZ, S. A. Bone grafts. In: SLATTER, D. *Textbook of Small Animal Surgery*. 3.ed. Philadelphia, PA: Saunders. 2003. Vol 2, cap.133, p.1875-1890.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Visceral. Situação epidemiológica. 2012. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1561](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561). Acesso em 20-11-2012.
- MIRO´, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G., et al. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends. Parasitol.*, v. 24, p. 371-377, 2008.
- MORELLO, E.; BURACCO, P.; MARTANO, M. et al. Bone allografts and adjuvante cisplatin for the treatment of canine appendicular osteosarcoma in 18 dogs. *J. Small Animal Pract.*, v. 42, p. 61-66, 2001.
- MURRAY, H. W., BERMAN, J. D., DAVIES, C. R., SARAVIA, N. G., Advances in leishmaniasis. *Lancet.*, v. 366, p. 1561-1577, 2005.
- NAGILL, R.; MAHAJAN, R.; SHARMA, M. et al. Induction of cellular and humoral responses by autoclaved and heat-killed antigen of *Leishmania donovani* in experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol. Int.*, v. 58, n. 4, p. 359-66, 2009.
- NAVIN, T. R.; ARANA, F. E.; DE MÉRIDA, A. M. et al. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 42, n. 1, p. 36-42, 1990.
- PERRY, C. R. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop.*, v. 360, p. 71-86, 1999.
- PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.*, v. 15, n. 321(5891), p. 970-974, 2008.
- PIARROUX, R.; AZAIEZ, R.; LOSSI, A. M. et al. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 49, n. 3, p. 364-369, 1993.
- PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L.; DECAMP, C. E. *Small Animal Orthopedics and fracture Repair*. 4.ed. St Louis: Saunders, 2006. 818p.
- PIGOSSI, N.; RAIA, A.; LEX, A. et al. Experimental and clinical study on the use as a transplant of homogenous dura mater preserved in glycerin at room temperature. *AMB Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 17, n. 8, p. 263-77, 1971.

- PINTO, J. G. S.; CIPANDI, M. T. O.; AGUIAR, T. C. et al. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. *R.F.O.*, v. 12, n. 3, p. 79-84, 2007.
- PINTO JÚNIOR, H. S. et al. Enxertos ósseos homólogos preservados em glicerina a 98%. Técnica de enxertia e avaliação clínico-cirúrgica. *A Hora Vet.*, n. 92, p. 72-6, 1996.
- PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M. V.; TEVA, A. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 14, p. 544–548, 2007.
- PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Vigilância Epidemiológica da Leishmaniose Visceral em BH. 2012. Disponível em: [http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=16045&lang=pt\\_BR&pg=5571&taxp=0&](http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=16045&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&). Acesso em: 20-11-2012.
- QING, H.; BONEWALD, L. F. Osteocyte remodeling of the perilacunar and pericanalicular matrix. *Int. J. Oral Sci.*, v. 1, n. 2, p. 59-65, 2009.
- RAINA, P.; KAUR, S. Chronic heat-shock treatment driven differentiation induces apoptosis in *Leishmania donovani*. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 289, n. 1-2, p. 83-90, 2006.
- RIOUX, J. A.; ABOULKER, J. P.; LANOTTE, G. et al. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 21. Influence of temperature on the development of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Experimental study. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 60, n. 3, p. 221-9, 1985.
- ROE, S. C.; PIJANOWSKI, G. J.; JOHNSON, A. L. Biomechanical properties of canine cortical bone allografts: effects of preparation and storage. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, n. 6, p. 873-877, 1988.
- ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J. Parasitol.*, v. 91, p. 970– 972, 2005.
- SACKS, D. L.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, p. 453-83, 2001.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.
- SAMPAIO, R. L.; LACERDA, M. S.; OLIVEIRA, P. C. R. et al. Variação da força de resistência à micro-tração de fragmentos de ossos corticais preservados em diversos meios e a fresco: estudo experimental em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n. 4, p. 345-352, 2009.
- SANTOS, F. C.; RAHAL, S. C. Enxerto ósseo esponjoso autólogo em pequenos animais. *Ciência Rural.*, v. 34, n. 6, 2004.
- SANTOS, M.; MARCOS, R.; ASSUNÇÃO, M. et al. Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Vet. Parasitol.*, v. 141, p.340–344, 2006.
- SERAKIDES, R. Ossos e Articulações. In: SANTOS, R. L. e ALESSI, A. C. *Patologia Veterinária*. São Paulo, SP: Roca. 2011. Cap. 11, p. 647-696.
- SHARIFI, I.; FEKRI, A. R.; AFLATONIAN, M. R. et al. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet.*, v. 23, p. 1540-3, 1998.

- SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J. Vector Borne Dis.*, v. 45, p. 255–272, 2008.
- SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Canine leishmaniosis - a challenging zoonosis. *Eur. J. Comp. Anim. Pract.*, v. 18, p. 232–241, 2008.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G., KOUTINA, A. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors.*, v. 4, p. 86, 2011.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniosis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 560–563, 2001.
- SOLANO-GALLEGO, L.; RODRIGUEZ-CORTES, A.; TROTTA, M., et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v. 147, p. 315–319, 2007.
- SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v. 28, 165(1-2), p. 1-18. 2009.
- SOUZA, S. A. *Ensaio mecânicos de materiais metálicos*. São Paulo: Edgar Blucher, 1974. 235p.
- SPRENG, D. et al. Leishmanial polyarthritis in two dogs. *J. Small Anim. Pract.*, v. 34; p. 559-563, 1993.
- SRIVASTAVA, J. K.; MISRA, A.; SHARMA, P. et al. Prophylactic potential of autoclaved *Leishmania donovani* with BCG against experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol.*, v. 127, p.107-14, 2003.
- SRIVASTAVA, P., DAYAMA, A., MEHROTRA, S. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 105, p. 1–6, 2011.
- TABAR, M. D., ROURA, X., FRANCINO, O., ALTET, L., RUIZ DE GOPEGUI, R., Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *J. Small Anim. Pract.*, v. 49, p. 325–328, 2008.
- TAFURI, W. L., SANTOS, R. L., ARANTES, R. M. E. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods.*, v. 292, p. 17– 23, 2004.
- TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 96, p. 203–212, 2001.
- THOMSON, J. G.; SINTON, J. A. *Leishmania donovani*, in Cultures, recovered from Spleen during Life and from the Bone Marrow of the Cadaver. *Proc. R. Soc. Med.*, v. 14, Sect Trop Dis Parasitol, p. 21–23, 1921.
- TORRES, B. T.; CHAMBERS, J. N.; BUDSBERG, S. C. Successful cementless cup reimplantation using cortical bone graft augmentation after an acetabular fracture and cup displacement. *Vet. Surg.*, v. 38, p. 87–91, 2009.
- TRONCARELLI, M. Z.; MACHADO, J. G.; CAMARGO, L. B. et al. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase canina,



pela técnica de imunofluorescência indireta. *Vet. Zoot.*, v. 15, n. 1, p. 40–47, 2008.

VERDE, F. A. L.; VERDE, F. A. L.; DAHER, E. F. et al. Renal tubular dysfunction in human visceral leishmaniasis (kala-azar). *Clin. Nephrol.*, v. 71, p. 492–500, 2009.

WAGNER, S. D. et al. Failure of ethylene oxide-sterilized cortical allografts in two dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 30, n. 2, p. 181-189, 1994.

WEIGEL, J. P. Bone grafting. In: BOJRAB, M.J.; SMEAK, D.D.; BLOOMBERG, M.S. *Disease mechanisms in small animal surgery*. 2.ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1993. Cap.98, p.678-684.

WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010. Control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949, Geneva Switzerland, 186p.

YIM, C. J.; CARLSON, E. R. Mandibular reconstruction using bone allografts. In: PHILLIPS, G. O., STRONG, D. M., VERSEN, R. VON, NATHER, A., HEIKKILA, J. T. *Advances in Tissue Banking*. London: World Scientific; 2000. p. 109-13.

ZILIOOTTO, L.; FANTINATTI, A. P.; DALECK, C. R. et al. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico: estudo experimental em cães. *Acta Cir. Bras.*, v. 18, n. 2, p. 107-115, 2003.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 266/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da presença de Leishmania SPP. em ossos autoclavados e conservados em Glicerol para enxertia cortical**", que tem como responsável(is) **Cleuza Maria de Faria Rezende**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **14/ 03/2012**.


Este certificado expira-se em **14/ 03/ 2017**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 266/2011**, related to the project entitled "**Evaluation of Leishmania SPP. in autoclaved and glicerol preserved bones for cortical grafts**", under the supervisors of **Cleuza Maria de Faria Rezende**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 14, 2012**.

This certificate expires in **March 14, 2017**.

Belo Horizonte, 16 de Março de 2012.

  
**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)