

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA SÉRICA E URINÁLISE
ASSOCIADAS ÀS ALTERAÇÕES DO LÍQUIDO SINOVIAL
DE CÃES EM DIFERENTES ESTÁDIOS DA
LEISHMANIOSE VISCERAL.**

MÁRIO CESAR RENNÓ DE ARAÚJO

**Belo Horizonte – MG
2016**

MÁRIO CESAR RENNÓ DE ARAÚJO

**HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA SÉRICA E URINÁLISE
ASSOCIADAS ÀS ALTERAÇÕES DO LÍQUIDO SINOVIAL
DE CÃES EM DIFERENTES ESTÁDIOS DA
LEISHMANIOSE VISCERAL.**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes

Co-orientador: Prof. Rubens Antônio Carneiro

**Belo Horizonte – MG
2016**

R416h Rennó de Araújo, Mário Cesar, 1977-
Hematologia, bioquímica sérica e urinálise associadas às alterações do líquido sinovial de cães em diferentes estádios da leishmaniose visceral / Mário Cesar Rennó de Araújo. – 2016. 84 p. : il.

Orientador: Paulo Ricardo de Oliveira Paes

Co-orientador: Rubens Antônio Carneiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Leishmaniose visceral – Teses. 3. Líquido sinovial – Teses. 4. Urina – Análise – Teses. 5. Bioquímica veterinária – Teses. 6. Hematologia veterinária – Teses. I. Paes, Paulo Ricardo de Oliveira. II. Carneiro, Rubens Antônio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.708 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

MÁRIO CESAR RENNÓ DE ARAÚJO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 23 de Março de 2016, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes
Presidente - Orientador



Prof. Sydnei Magno da Silva
Universidade Federal de Uberlândia - UFU



Prof^ª. Fabíola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Deus que todos os dias me dá condições de exercer com tanta dedicação os meus objetivos.

Aos meus mentores espirituais por me protegerem em todo momento.

Ao meu protetor maior São Francisco de Assis por permitir que eu seja seu instrumento aqui nesse plano.

Ao meu orientador e amigo Prof. Paulo Paes, por ter confiado em minha capacidade, pelos seus ensinamentos e pelos momentos de gargalhadas.

Ao meu co-orientador Prof. Rubens Carneiro, meu pai preto, presente, conselheiro, amigo, obrigado pelo apoio e puxões de orelha e por me fazer o profissional que sou hoje.

Aos meus pais Cesar Chaves e Rita de Cássia, meus maiores tesouros, minha irmã Sheila pela torcida, sem vocês nada seria possível.

À Nathália Santana, pela amizade, carinho, paciência e pela ajuda constante. Sempre me fazendo crescer e mostrando o quanto a excelência é fundamental em nossas vidas.

À minha SUPER equipe VetMaster, amigos que seguraram a barra na minha ausência e torceram muito por mim. Obrigado Pablo, Nívea, Dra. Ludmila, Dra. Anna Paula, Dra Daniele, Cesar, Franciele, Danúbia, Katerine, Dona Bê, Vanessa, Juliana, Laírcia, Bil, Marquinho, Isael e em especial ao Dr. Luiz Eduardo por ser meu braço direito e professor nas urinálises e ao biomédico Valdivino pelo excelente trabalho realizado com minhas análises.

Ao exímio profissional e grande amigo Manoel dos Santos pela ajuda com as análises laboratoriais, principalmente com o “tesouro” líquido sinovial.

À Dra. Gleidice Lavallo pela ajuda na escolha do tema e por ser um exemplo de profissional.

Aos meus pacientes que foram a razão de tudo. Por vocês não irei parar nunca.

À minha pequena Patela que nos momentos mais estressantes me fez relaxar com sua meiguice e a famosa bolinha. Ao Fluffy irmão mais novo e querido eterno e ao Bimbim meu grandão!

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para essa conquista, os meus sinceros agradecimentos!

LISTA DE ABREVIACÕES

ADI- Anemia da doença inflamatória
ALT- Alanina amino transferase
AST- Aspartato amino transferase
CCZ- Centro de controle de zoonoses
CHCM- Concentração de hemoglobina corpuscular média
CIC- Imunocomplexos circulantes
CID- Coagulação intravascular disseminada
cPCR- Reação cadeia de polimerase
DNA- Ácido Desoxirribonucléico
EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA- Enzyme Linked Immunossorbent Assay
FA- Fosfatase alcalina
GP63- Glicoproteína 63
HA- Ácido ialurônico
HCM- Hemoglobina corpuscular média
ICR- Insuficiência renal crônica
Ig- Imunoglobulina
LS- Líquido sinovial
LT- Leishmaniose tegumentar
LV- Leishmaniose visceral
LVC- Leishmaniose visceral canina
LVH- Leishmaniose visceral humana
OMS- Organização Mundial de Saúde
PBH- Prefeitura de Belo Horizonte
qPCR- Reação cadeia de polimerase quantitativa
RIFI- Reação de imunofluorescência indireta
RMBH- Regional Metropolitana de Belo Horizonte
rPCU- Relação proteína/creatinina urinária
SMF- Sistema mononuclear fagocitário
VCM- Volume corpuscular médio
VG- Volume globular
VM- Velho mundo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE GRÁFICOS	9
LISTA DE QUADROS	10
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Histórico da enfermidade	17
3.2. Etiologia	21
3.3. Vetor	22
3.4. Hospedeiro e reservatórios	23
3.5. Ciclo biológico e transmissão	24
3.6. Patogenia	24
3.7. Sinais clínicos	25
3.8. Diagnóstico	29
3.8.1. Análise laboratorial	29
3.8.2. Técnicas sorológicas	30
3.8.3. Técnicas biomoleculares	31
3.8.4. Técnicas parasitológicas	32
3.8.4.1 Análise do líquido sinovial (LS)	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Animais	33
4.2. Locais de execução	33
4.3. Triagem dos animais	33
4.4. Avaliação clínica	33
4.5. Coleta e processamento de amostras	34
4.5.1. Análise hematológica	34
4.5.2. Teste de para detecção de anticorpos anti - <i>Erlichia canis</i>	35
4.5.3. Análise bioquímica	35
4.5.4. Urinálise	35
4.5.5. Líquido sinovial	36
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.1. Avaliação física dos cães	38
6.2. Análise do líquido sinovial (LS)	39
6.2.1. Exame físico-químico	39
6.2.2. Cor e viscosidade	39
6.2.3. Proteínas e pH no LS	40
6.2.4. Análise citológica do líquido sinovial	42
6.2.5. Pesquisa direta do parasito	44
6.2.6. Teste de qualidade e precipitação de mucina (TQPM).....	46
6.3. Análise hematológica	49

6.3.1. Eritrograma e plaquetograma	49
6.3.2. Leucograma	52
6.4. Bioquímica sérica	54
6.4.1. Perfil hepático e proteinograma	54
6.4.2. Perfil renal	58
6.4.3. Urinálise	60
6.4.3.1. Densidade e pH	60
6.4.3.2. Hematúria e leucocitúria	62
6.4.3.3. Proteinúria	63
6.4.3.4. Cilindrúria	64
7. CONCLUSÕES	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
9. ANEXOS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa da densidade de casos de leishmaniose visceral por km ² , no Brasil em 2012.	18
Figura 2	Letalidade por leishmaniose visceral no Brasil no período de 2003 a 2012.	19
Figura 3	Casos de leishmaniose visceral- Brasil, 1980-2013.	20
Figura 4	Série histórica da LVH no município de Belo Horizonte, de 1994 a 2014	20
Figura 5	Percentual de positividade da LVC em BH, período de 1996 a 2014.	21
Figura 6	Abordagem diagnóstica em cães com suspeita clínica de leishmaniose.	29
Figura 7	Análise parasitológica do líquido sinovial dos animais positivos para LVC estágio II (G2) e estágio III (G3) para identificação de <i>Leishmania</i> sp. (método panótico rápido). Obj. 100x. Formas amastigotas presentes no citoplasma de (A) macrófagos e (B) neutrófilos (setas). Em (C) as amastigotas encontram-se livres no LS.	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação gráfica contendo as médias de proteínas (g/dL) no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	41
Gráfico 2	Representação gráfica contendo as médias de pH no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3). (Fonte: Fernandes <i>et al.</i> , 2009).	42
Gráfico 3	Representação gráfica contendo as médias em % das principais células presentes no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	43
Gráfico 4	Representação gráfica contendo o número de cães que apresentaram <i>Leishmania</i> sp. no líquido sinovial dos grupos de animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	45
Gráfico 5	Representação gráfica do número de cães e tipos de coágulos de mucina encontrados nos cães com a presença e ausência do parasito no LS.	47
Gráfico 6	Correspondência entre grupos e categorias de qualidade da mucina do líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	48
Gráfico 7	Representação gráfica da média e do desvio padrão do número de eritrócitos de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	50

Gráfico 8	Representação gráfica da média e do desvio padrão do número de leucócitos de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).. A área verde representa o intervalo de referência para leucócitos em cães.	53
Gráfico 9	Média das enzimas séricas avaliadoras da função hepática de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	55
Gráfico 10	Comparação das médias e desvio padrão de proteínas totais, albumina e globulina de dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	55
Gráfico 11	Comparação das médias e desvio padrão da uréia de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3)	60
Gráfico 12	Comparação das médias e desvio padrão da creatinina de cães dos grupos controle (G1), animais estágio II (G2) e animais estágio III (G3).	60
Gráfico 13	Número de animais que apresentaram proteinúria (+/++/+++) na avaliação bioquímica da urina de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estadiamento clínico da LVC baseado no teor de anticorpos, sinais clínicos, dados laboratoriais, tipo de terapia e prognóstico para cada estágio.	27
Quadro 2	Valores de referências e variáveis de avaliadas no hemograma da espécie canina.	34
Quadro 3	Valores de referência e variáveis avaliadas no exame bioquímico na espécie canina.	35
Quadro 4	Valores de referência para o exame de urina na espécie canina.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sinais clínicos observados nos dos grupos de animais positivos para LVCestádio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	38
Tabela 2	Número e porcentagem de cães com alterações nos parâmetros cor e viscosidade do líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	39
Tabela 3	Valores das médias e seus respectivos desvios padrão de proteína (g/dL) e pH no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	40
Tabela 4	Número e porcentagem de cães que apresentaram alterações nos valores de proteína no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	41
Tabela 5	Valores das médias e seus respectivos desvios padrão da porcentagem (%) de linfócitos, macrófagos e neutrófilos no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	43
Tabela 6	Número de cães que apresentaram presença de <i>Leishmania</i> sp. no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	44
Tabela 7	Número e porcentagem de cães que apresentaram alterações no teste de qualidade e precipitação de mucina (TQPM) do líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	46
Tabela 8	Valores das médias e seus respectivos desvios padrão das variáveis eritrométricas dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	49
Tabela 9	Número e percentual de cães que apresentaram anemia discreta, moderada e intensa e número destes que apresentavam o parasito no LS dos grupos animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	50
Tabela 10	Valores das médias e seus respectivos desvios padrão das variáveis leucométricas dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	52
Tabela 11	Média e desvio padrão das proteínas e enzimas séricas avaliadoras da função hepática de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	54
Tabela 12	Comportamento das proteínas séricas e enzimas avaliadoras da função hepática dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	56

Tabela 13	Valores das médias e desvio padrão das dosagens séricas de uréia e creatinina de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	58
Tabela 14	Valores absolutos e relativos de cães que apresentaram valores de uréia e creatinina aumentados, e diminuídos nos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	59
Tabela 15	Valores médios e seus respectivos desvios padrão da densidade e pH urinários de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	61
Tabela 16	Valores absolutos e relativos do exame do sedimento urinário (bactérias/campo) de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	62
Tabela 17	Valores absolutos e relativos do exame do sedimento urinário (hemácias e leucócitos/campo) de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	62
Tabela 18	Número e porcentagem de cães que apresentaram proteinúria (+/+ / +/+/+/+) dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	63
Tabela 19	Valores absolutos e relativos do exame do sedimento urinário (cilindros hialinos, granulados) de cães dos grupos animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).	64

RESUMO

As leishmanioses representam um complexo de doenças de caráter crônico com distribuição geográfica ampla e de alta importância na saúde pública mundial. A doença possui apresentações clínicas variadas e pouco discutidas, como as alterações articulares. O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) é complexo, pois os sinais clínicos podem ser semelhantes a várias patologias. Diversos métodos podem ser utilizados no diagnóstico, mas nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade e, por essa razão, o diagnóstico correto da LVC ainda é um desafio, apesar de vários métodos apresentarem progressos significativos na atualidade. Os achados laboratoriais fornecem importantes subsídios para avaliação do estado clínico do paciente e determinação do prognóstico. A análise parasitológica do líquido sinovial (LS) também é determinante no diagnóstico e destaca alta sensibilidade na detecção do parasito. Este trabalho tem como objetivos analisar as características físico-químicas, citológicas e parasitológicas do líquido sinovial da articulação do tarso e alterações hematológicas e bioquímicas de cães com leishmaniose visceral na região metropolitana de Belo Horizonte. Foram avaliados 36 cães, sendo 12 negativos para LVC (controle) e 24 soropositivos. O grupo 2 foi composto por animais classificados no estágio II da doença, apresentando linfadenomegalia, dermatite papular, onicogribose, ulcerações na pele, perda de peso e epistaxe (doença moderada) e o grupo 3 os animais foram classificados no estágio III da doença, apresentando além dos sinais descritos no grupo 2, vasculites, artrites, uveíte e glomerulonefrite (doença grave). Os achados do hemograma, bioquímica sérica e urinálise mais frequentes foram anemia em 100% dos cães dos grupos 2 e 3; hiperproteinemia em 66,7% dos cães do grupo 2 e 83,3% dos cães do grupo 3; hipoalbuminemia em 91,7% dos cães dos grupos 2 e 3; hiperglobulinemia em 83,3% dos cães do grupo 2 e 91,7% do grupo 3; diminuição da relação albumina-globulina (A/G) e proteinúria em 100% dos cães dos grupos 2 e 3. Na análise do líquido sinovial dos cães, o parasito foi visualizado em 33,3% (4/12) dos cães do grupo 2 e 75% (9/12) dos cães do grupo 3. Ambos apresentaram aumento de neutrófilos (64%) no LS. Foram evidenciadas correlações negativas entre a presença do parasito no LS, qualidade do coágulo de mucina e viscosidade e correlações positivas entre estágio da doença e valores de globulina, relação albumina/globulina, uréia, creatinina e cilindrúria. Foi possível concluir neste estudo que os animais positivos para LVC com doença grave apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas mais acentuadas, assim como as alterações físico-químicas do LS. Observou-se também maior frequência do parasito no LS dos animais do grupo 3 (doença grave). O trabalho também destaca a viabilidade da avaliação do LS para auxílio no diagnóstico parasitológico de leishmaniose em cães sintomáticos.

Palavras-chave: Cão, leishmaniose visceral canina, líquido sinovial, hematologia, bioquímica sérica, urinálise.

ABSTRACT

Leishmaniasis represent complex and chronic diseases with broad geographic distribution and high importance in public health worldwide. The disease has varied clinical presentations, including joint changes, that are little discussed. The diagnosis for canine visceral leishmaniasis (CVL) is complex because the clinical signs may be similar to various conditions. Several methods can be used in the diagnosis, but none has 100% sensitivity and specificity. Therefore, the correct diagnosis of CVL is still a challenge although several methods present significant progress today. Laboratory findings provide important information for assessing the patient's clinical status and prognosis. The parasitological analysis of synovial fluid (SF) is also crucial in the diagnosis and highlights high sensitivity in the detection of the parasite. This study aims to analyze the physical, chemical cytological and parasitological characteristics of the tarsal joint synovial and hematological and biochemical changes in dogs with visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte. Group 2 was consisted of animals classified as stage II disease, with lymphadenopathy, papular dermatitis, onychogryphosis , skin ulcerations, weight loss and epistaxis (mild disease) and Group 3 animals were classified as stage III disease presenting in addition to signals described in group 2 , vasculitis , arthritis, glomerulonephritis and uveitis (severe disease) . The most frequent blood test, serum biochemistry and urinalysis findings were anemia in 100% of dogs in groups 2 and 3; Hyperproteinemia in 66.7% of group 2 dogs and 83.3 % of group 3 dogs ; hypoalbuminemia in 91.7 % of dogs in groups 2 and 3; hyperglobulinaemia in 83.3% of group 2 dogs and 91.7 % of group 3 ; decreased albumin - globulin (A / G) and proteinuria in 100% of dogs in groups 2 and 3. In the analysis of synovial fluid of dogs, the parasite was seen in 33.3 % (4/12) of the group's dogs 2 and 75 % (9/12) of group 3 dogs. Both showed an increase of neutrophils (64 %) in the SF. Negative correlations were observed between the parasite presence in SF, quality of mucin clot and viscosity and positive correlations between disease stage and globulin values, albumin/globulin, urea, creatinine and cylindruria. It was concluded from this study that the positive animals for CVL with severe disease had hematological and biochemical changes more pronounced, and the physico - chemical changes in the SF. It was also observed more often in SF parasite of animals of group 3 (severe disease). This work also highlights the viability SF assessment to aid in parasitological diagnosis of leishmaniasis in symptomatic dogs.

Key-words: Dog, leishmaniasis, synovial fluid, joint, hematology, serum biochemistry, urinalysis.

1.INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um complexo de doenças de caráter crônico, com distribuição geográfica ampla e de alta importância na saúde pública mundial (Brasil, 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a leishmaniose visceral (LV) sendo segunda protozoose de maior importância na atualidade, ficando atrás apenas da malária, a incluindo entre as seis doenças consideradas prioritárias em seu programa de controle (WHO, 2006). Recentemente é apontada como endêmica em 98 países nos cinco continentes, sendo 11 destes localizados na América Latina (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2013). Estima-se que 90% dos casos registrados nos países latinos, ocorram no Brasil (Brasil, 2015). Devida sua elevada incidência, sua ampla distribuição geográfica e marcante aumento na transmissão associado à urbanização da mesma, a doença representa importante problema de saúde pública no país (Costa-Val *et al.*, 2007).

Nas Américas, a LV é causada pela espécie *L. infantum* que pode ser citada como sinônimo da *L. chagasi* por serem indistinguíveis geneticamente de acordo com trabalhos recentes de caracterização molecular (Maurício *et al.*, 2000; Kuhls *et al.*, 2011). Estes protozoários são transmitidos para o homem e também para outros mamíferos como roedores, raposas, tamanduás e marsupiais no ciclo silvestre, através da picada da fêmea de vetores denominados flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui ou tatuqueiras, que adquire o parasito ao realizar hematofagismo em animais infectados (Shaw, 2006; Sonada, 2007). O *L. longipalpis* é considerado o principal vetor biológico da *L. infantum* no Brasil (Monteiro *et al.*, 2005)

A transmissão geralmente ocorrer através da picada do flebotomíneo, mas estudos sugerem que também possa ocorrer pela picada de carrapatos (Torres, 2009; Colombo, 2012; Freitas 2012; Silva, 2012b), transfusões sanguíneas (Alencar *et al.*, 1991), transmissão venérea (Benites *et al.*, 2011), transmissão vertical e mecanicamente por certas moscas como *Stomoxys calcitrans* (Jones *et al.*, 2000).

O cão doméstico é classificado como reservatório mais importante do parasita em áreas urbanas (Monteiro, 2005), mas a participação de outras espécies de mamíferos que vivem junto do homem como os felinos domésticos vem se tornando cada vez mais importantes (Benassi, 2015; Gomes, 2015; Oliveira *et al.*, 2015). Vides, *et al.* (2011) relataram 49,1% de gatos positivos para *Leishmania* em área endêmica no interior de São Paulo. Os equinos também têm sido relatados como reservatórios importantes no ciclo da doença em diferentes regiões da América Latina como: Brasil, Argentina, Venezuela e Porto Rico (Benassi, 2015) e em países da Europa (Gama, 2014) mas sem importância epidemiológica.

Atualmente, são considerados cães com leishmaniose clínica, aqueles que apresentam além de alterações clínicas, alterações de exames laboratoriais e infecção confirmada, e cães com leishmaniose subclínica ou clinicamente saudáveis aqueles que não apresentem sinais clínicos ou alterações de exames laboratoriais, mas que tenham infecção confirmada (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Os animais acometidos podem apresentar manifestações hematológicas, renais, hepatoesplênicas, oculares, neurológicas, distúrbios locomotores e menos comumente, pulmonares e cardíacos (Sonada, 2007; Azevedo *et al.*, 2008).

Os achados laboratoriais mais importantes incluem anemia, geralmente normocítica normocrômica, hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, preteínúria, diminuição da relação albumina/globulina sérica, enzimas hepáticas aumentadas, trombocitopenia, azotemia, linfopenia e leucocitose com desvio a esquerda (Sonada, 2007).

Alterações articulares cada vez mais se tornam comuns dentre os sinais clínicos apresentados pelos cães, podendo os problemas locomotores apresentar incidência de 30% advindo de poliartrites, sinovites, polimiosite, osteoartrite, periostite proliferativa, lesões osteolíticas, úlceras interdigitais, lesões nos coxins plantares, e neuralgia (Buracco *et al.*, 1997; Nolli, 1999; Feitosa *et al.*, 2000; Bevilacqua, 2002; McConkey, 2002). As artrites na grande maioria das vezes estão associadas à deposição de imunocomplexos ou à presença direta do parasita no interior das articulações, confirmando a identificação de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no líquido sinovial de cães (Feitosa *et al.*, 2000; Agut *et al.*, 2003).

Por apresentar sinais clínicos comuns a outras doenças, o diagnóstico da LV muitas vezes é um desafio clínico, a sintomatologia assemelha-se a erliquiose, dermatopatias autoimunes nos cães e malária, esquistossomose e febre tifoide em humanos. Entretanto, sabe-se que dependendo do estado clínico do animal, é maior a possibilidade de se encontrar o parasita em animais infectados que apresentem sinais clínicos do que em animais assintomáticos (Gontijo e Melo, 2004). Diferentes métodos de diagnóstico para detecção de *Leishmania* são descritos, sendo os sorológicos como a RIFI, ELISA e imunocromatografia os mais usados (Alvar *et al.*, 2004). Outros métodos, como parasitológicos, atualmente são utilizados e consistem na identificação de formas amastigotas do parasita em esfregaços de aspirados de linfonodos, lesões cutâneas, medula óssea, baço. Outras técnicas são as biomoleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e a PCR em tempo real (qPCR) (Miró *et al.*, 2008).

O líquido sinovial (LS) auxilia no diagnóstico de artrite por leishmaniose e também no diagnóstico diferencial nas afecções articulares do cão (Pedersen, 1978). A análise parasitológica do LS também é determinante no diagnóstico e destaca alta sensibilidade na detecção do parasito (Silva *et al.*, 2014).

Considerando o crescente número de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) causando comprometimento articular, despertou-se a necessidade de estudar as alterações do líquido sinovial, pouco exploradas e pouco descritas na literatura, observadas em cães positivos. Além disso, o estudo poderá auxiliar no diagnóstico da doença que possui sinais semelhantes a várias outras e dessa forma orientar sobre o prognóstico.

2.OBJETIVOS

- Analisar as características do líquido sinovial da articulação do tarso de cães com leishmaniose na região metropolitana de Belo Horizonte.
- Comparar as alterações presentes no líquido sinovial de cães com leishmaniose na região metropolitana de Belo Horizonte, classificados nos estágios 2 e 3 da doença.
- Avaliar a viabilidade da análise do líquido sinovial (LS) para auxiliar no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.
- Comparar alterações hematológicas, bioquímica sérica e urinálise de cães naturalmente infectados por leishmaniose na região metropolitana de Belo Horizonte.

3.REVISÃO DE LITERATURA

3.1.Histórico da enfermidade

As leishmanioses são consideradas de grande interesse na saúde pública mundial, com distribuição geográfica ampla, representando um complexo de doenças de caráter crônico, com espectro clínico importante e diversidade epidemiológica (Brasil, 2007).

As leishmanias são endêmicas em mais de 98 países, sendo destes, 11 localizados na América Latina (WHO, 2013) ocorrendo desde as zonas intertropicais do continente Americano e Africano até às regiões temperadas da América Latina, Europa e Ásia, excluindo apenas a Austrália e a Antártica (WHO, 2010). Dos casos dos países latinos, estima-se que 90% ocorram no Brasil (Brasil, 2015). A doença representa um importante problema de saúde pública no país devido a sua elevada incidência, ampla distribuição geográfica e marcante aumento na transmissão associado à urbanização da mesma (Costa-Val *et al.*, 2007).

Desde a época colonial existem relatos sobre a doença no continente Americano. Pedro Pizarro relatou que povos do Peru eram dizimados por uma doença que deformava o nariz, a qual foi posteriormente caracterizada como leishmaniose. Essas deformações eram registradas em peças de cerâmicas por artistas da época (Rath *et al.*, 2003).

No final do século XIX, os agentes etiológicos das leishmanioses foram descobertos por Cunningham em 1885, na Índia, descrevendo formas amastigotas em casos de calazar. Em 1898, o pesquisador russo Borovisky demonstrou ser um protozoário o agente etiológico do Botão do Oriente (Rath *et al.*, 2003). Em 1903, Willian Leishman e Charles Donovan relataram o agente etiológico e Laveran e Mesnil consideraram que este parasita fosse um piroplasma, denominando-o de *Piroplasma donovani* (Correia e Correia, 1992). Ross, nesse mesmo ano, em homenagem a Leishman e Donovan, renomeou o parasito como *Leishmania donovani*.

A partir de 1904, diferentes relatos demonstraram que o calazar não ocorria exclusivamente na Índia, sendo alguns casos registrados também na China (Rath *et al.*, 2003).

Foram relatadas diferenças entre o organismo causador do Calazar em diferentes áreas do Mediterrâneo e observado que crianças eram mais acometidas pela doença e assim sendo, Nicole em 1908 estabeleceu uma nova espécie a *Leishmania infantum* (Rath *et al.*, 2003).

Em 1909, Lindenberg encontrou leishmanias em úlceras cutâneas de pacientes no Estado de São Paulo. Em 1911, Splendore diagnosticou uma forma mucosas da doença, e o agente etiológico da doença foi nomeado por Gaspar Viana como *L. (viannia) brasilienses* (Ussui e Neves, 2001). Dentre vários nomes, a doença foi chamada de Leishmaniose Tegumentar Americana, úlcera de Bauru, Leishmaniose Cutaneomucosa, Espúndia, entre outros (Rath *et al.*, 2003).

A leishmaniose visceral humana no Brasil data-se de 1913, descrita por Migone (Paraguai) descrevendo o primeiro caso em necropsia, oriundo do estado do Mato Grosso (Fonseca *et al.*, 2001). Henrique Pena em 1934 descobriu casualmente a LV, enquanto examinava amostras de fígado para investigação da febre amarela. Aproximadamente 41 casos de LV foram identificados, sendo a maioria em crianças, na região Nordeste, principalmente no estado do Ceará (Leão, 1997; Brasil, 2014). Em 1936, Evandro Chagas, cita o vetor *P. longipalpis*, hoje *Lutzomyia longipalpis*, responsável pela disseminação da leishmaniose visceral (Feitosa *et al.*, 2000).

Evidenciaram-se casos em 23 estados brasileiros, sendo a maior concentração de casos por km² (Figura 1) encontrada nas regiões Norte e Nordeste (Andrade *et al.*, 2007; Dantas-Torres, 2009; Marcondes e Rossi, 2013; Teixeira-Neto *et al.*, 2014; Werneck, 2014). Atualmente, vários casos foram diagnosticados em cães localizados na região Sul do país, em Uruguaiana/RS, onde a doença era considerada escassa (Silva *et al.*, 2014).

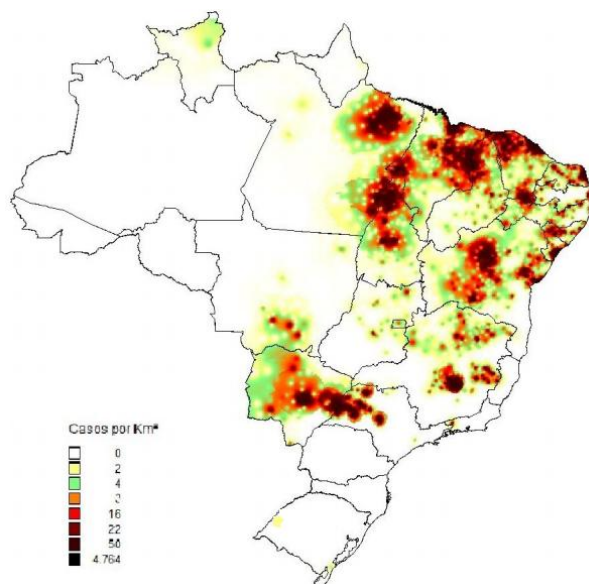


Figura 1. Mapa da densidade de casos de leishmaniose visceral por km², no Brasil em 2012. Fonte: SINAN/SVS/MS.

Foram registrados 34.583 casos da LV humana (LVH) no país no período entre 2003 e 2009 segundo o Ministério da saúde. A doença é mais frequente no sexo masculino (63,9%) e em crianças menores de 10 anos (48%). A letalidade da LVH no Brasil entre 1994 e 2009, aumentou 67,6% passando de 3,4% em 1994 para 5,7% em 2009. Nos últimos quatro anos a letalidade média foi de 5,8%, atingindo 7,1% (Figura 2) em 2012 (Brasil, 2014). Estima-se que ocorram anualmente 200 a 400 mil casos de LV e 700 mil a 1,2 milhões de Leishmaniose Tegumentar (LT), no mundo, com 20 a 30 mil mortes neste período, e média de três mil novos casos por ano no Brasil o que a coloca como uma das cinco doenças infectoparasitárias e endêmicas de maior relevância. A leishmaniose visceral apresenta comportamento epidemiológico cíclico (Figura 3), com elevação de casos com período médio a cada cinco anos (Brasil, 2014).

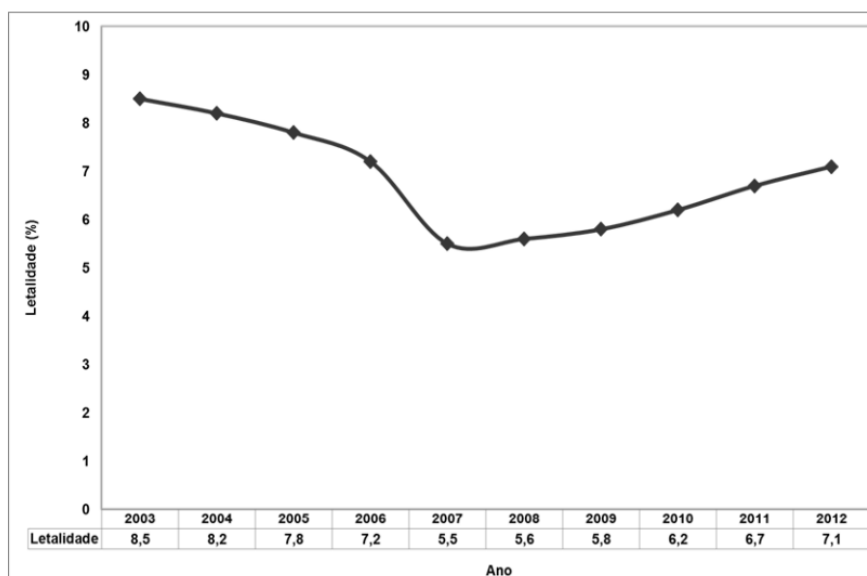


Figura 2. Letalidade por leishmaniose visceral no Brasil no período de 2003 a 2012.
Fonte: SINAN/SVS/MS.

A prevalência de leishmaniose visceral canina em áreas endêmicas do Brasil está em torno de 5,9 a 29% onde a alta prevalência da infecção canina está associada ao maior risco da doença em humanos (Leite *et al.*, 2015)

Em Minas Gerais a LV ocorre desde 1940, quando os primeiros casos humanos foram detectados na região Norte do Estado. Nessa época, a doença era tipicamente rural, diferentemente do que se observa atualmente, com a periurbanização e urbanização da doença onde 84% dos casos confirmados são de pacientes residentes em zonas urbanas (Belo Horizonte, 2014).

Em 1989, a doença passou a ser notificada na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), ocorrendo em Sabará o primeiro caso humano e posteriormente em Belo Horizonte, em 1991 (Resende, 2007). As taxas de letalidade no estado estão acima da média nacional, com valores aproximados de óbitos de 21,8% e 17,9% nos anos de 2012 e 2013 respectivamente. (Belo Horizonte, 2014).

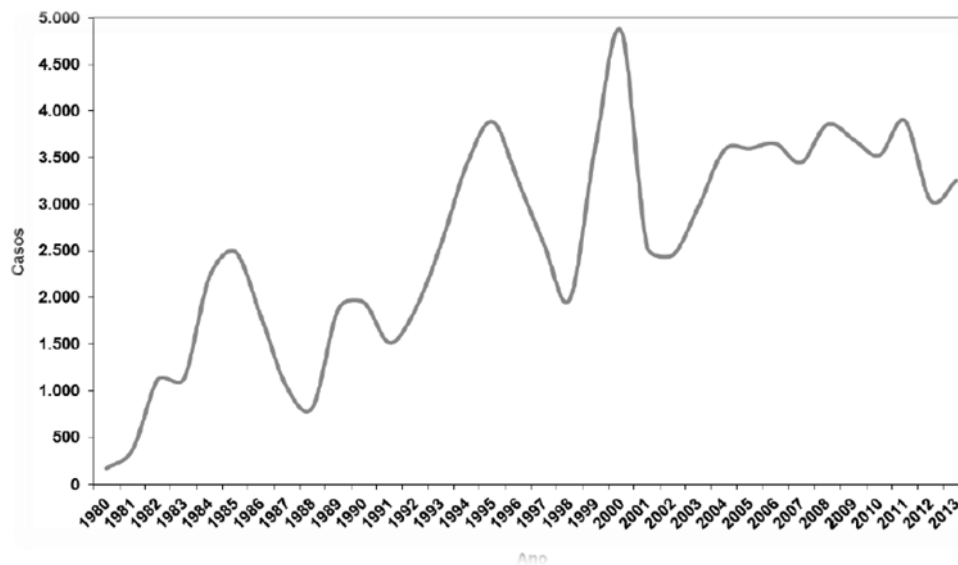


Figura 3. Casos de leishmaniose visceral- Brasil, 1980-2013. Fonte: SVS/MS

Em Belo Horizonte, entre os anos de 2011 e 2014, 23.562 cães encontravam-se sorologicamente positivos para leishmaniose e destes animais, foi realizada eutanásia em 19.782. Em humanos 1618 casos novos de LV demonstraram aumento das taxas da doença nessa população (Belo Horizonte, 2014). As taxas de letalidade no município foram consideradas altas quando comparadas a média no país, que segundo o Ministério da Saúde é de 6% (Brasil, 2006). No ano de 2004, a letalidade atingiu 18,7%, sendo que no período entre 2005 e 2008 houve uma redução para 9,0%, 9,4%, 8,2% e 9,5%, respectivamente. Entretanto, foi registrado um novo aumento nos anos seguintes, 2009- 2012, onde as taxas de letalidade se apresentaram 19,3%, 18,7%, 16,2% e 18,2%, respectivamente (Belo Horizonte, 2014) (Figura 4).

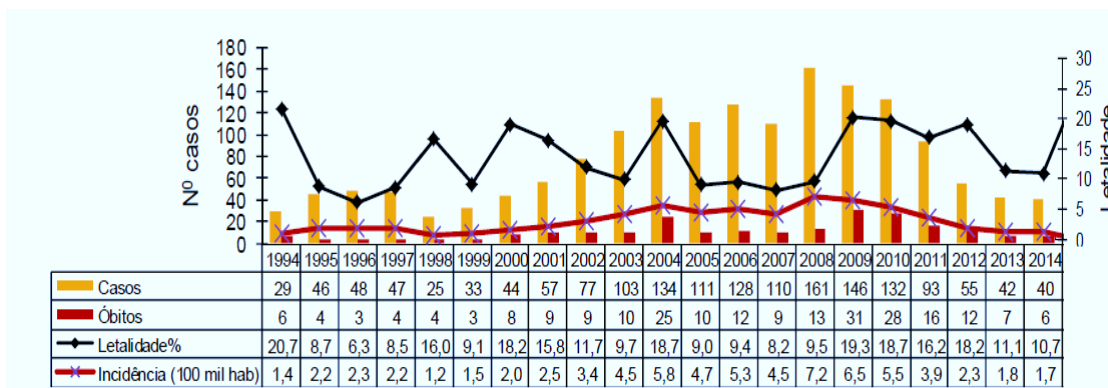


Figura 4. Série histórica da LVH no município de Belo Horizonte, de 1994 a 2014. Fonte: GEEPI e GEZOZ/GVSI/SMSA

O aumento na prevalência da LVC, via de regra, está relacionado com o surgimento de casos da doença em humanos (Oliveira *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006). De acordo com Silva, (2015) assim como os casos humanos, no ano de 2014, constatou-se um aumento de 11,8% nas taxas de soropositividade da LVC (Figura 5).

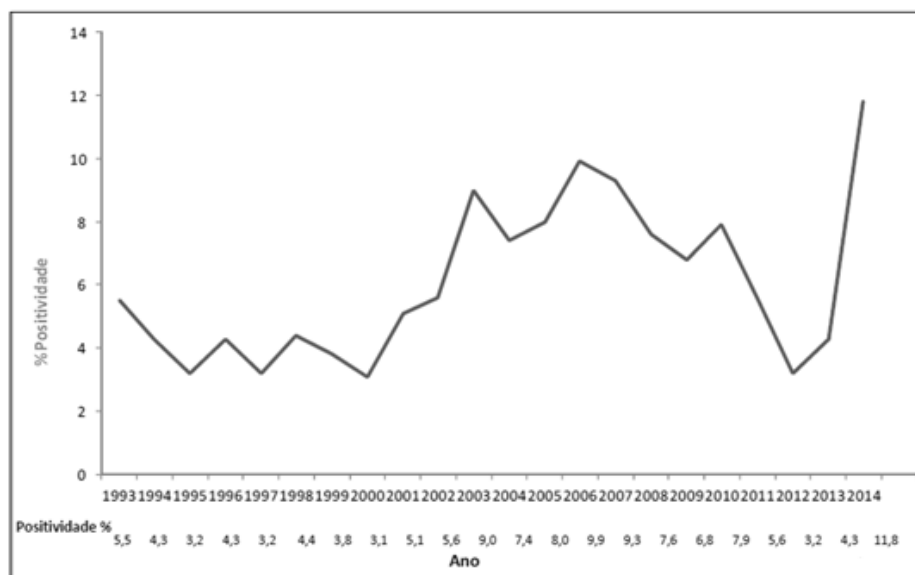


Figura 5. Percentual de positividade da LVC em Belo Horizonte, período de 1996 a 2014.
Fonte: GECCOZ/SMSA

3.2 Etiologia

Os parasitos do gênero *Leishmania* são organismos unicelulares, pertencentes ao sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Classe Kinetoplastea, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Existem dois subgêneros dentro do gênero *Leishmania*: o *Leishmania* e o *Viannia*, que são diferenciados pelo local em que se multiplicam no trato digestório do vetor, onde o subgênero *Leishmania* se adere à porção anterior e média do intestino e *Vianna* apresenta uma fase da sua divisão aderindo à parede do intestino posterior. As espécies que constituem esse gênero apresentam características morfológicas muito similares, porém biológicas distintas e apresentam características bioquímicas, genéticas e imunológicas diferenciadas (Neves, 2006).

As duas formas clínicas básicas em que as leishmanioses humanas podem apresentar são: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). Essas formas clínicas dependem da espécie de *Leishmania* envolvida e da susceptibilidade do hospedeiro (De Arruda, 2010).

Os principais complexos e espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* são: complexo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*), complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) e pelas espécies *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica* (Hubálek e Rudolf, 2011). As espécies de maior importância associadas aos animais são *L. infantum* e *L. chagasi* (Solano-Gallego *et al.*, 2009). No ciclo antroponótico, as principais espécies são *L. tropica* e *L. donovani* (Ready, 2010).

Alguns autores consideram *L. chagasi* sinônimo de *L. infantum*. Porém, existem divergências sobre o uso do nome específico *chagasi*. Alguns autores consideram diferenças bioquímicas entre elas, mantendo o nome *L. chagasi* (Brasil, 2006; Solano e Gallego, 2009).

O ciclo de vida do parasito é digenético (heterógeno), ou seja, parte do desenvolvimento ocorre no hospedeiro vertebrado e parte no invertebrado. Durante o seu ciclo sofrem modificações em

sua forma, sendo designados de dimórficos por apresentarem duas formas diferentes: amastigota e promastigota (Brazil, 2003; Gramiccia, 2011).

Denomina-se amastigota a forma que se encontra no hospedeiro vertebrado, e tem como características ser redonda a oval e pode ser encontrada intracelular, em células do sistema mononuclear fagocitário: principalmente em macrófagos e também em monócitos, células de Kupfer e células de Langerhans. Tem cerca de 4 x 2 µm, um citoplasma com um núcleo basófilo, um cinetoplasto em forma de bastonete (estrutura onde se encontra o ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial e um flagelo rudimentar sem mobilidade (Gramiccia, 2011).

A forma promastigota é a forma infectante do hospedeiro vertebrado é extracelular e se encontra no aparelho digestivo do vetor. É fusiforme, com cerca de 15 x 3 µm, possui um só núcleo central, um cinetoplasto terminal e na região anterior, um flagelo livre que pode atingir 20 µm de comprimento lhe conferindo motilidade (Gramiccia, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A reprodução de ambas as formas é feita por divisão binária longitudinal (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

3.3.Vetor

Os vetores da *Leishmania* spp. são insetos pertencentes a ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. A subfamília é constituída por seis gêneros, mas apenas dois têm importância em medicina humana e veterinária: o gênero *Phlebotomus* (*P.*) no Velho Mundo (VM), que possui 11 subgêneros, sendo o subgênero *Larroussius* o mais importante na transmissão da leishmaniose, e o gênero *Lutzomyia* (*L.*) no Novo Mundo, com 25 subgêneros (Wall e Shearer, 2001; Gramiccia, 2011).

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte (2 a 3,5mm), com o corpo coberto por uma camada densa de pêlos, pernas longas e delicadas, olhos proeminentes e arredondados, antenas longas, constituídas por 16 segmentos. Tem coloração clara como cor de palha (Ussui e Neves, 2014), mas já foi relatada variando de branco a preto (Maroli *et al.*, 2013). Durante o pouso, mantém suas asas em posição vertical (eretas) e entreabertas, facilitando seu reconhecimento (Ussui e Neves, 2014). O sexo é facilmente distinguido pela forma do abdômen do flebotomíneo, uma vez que apenas os machos possuem os segmentos posteriores modificados, apresentando-se em forma de garra e designando-se por genitália (Afonso e Alves-Pires, 2008).

Para garantir suas funções vitais, tanto machos quanto fêmeas necessitam de carboidratos, importantes para o acasalamento, voo e postura de ovos. Esses carboidratos são adquiridos de fontes naturais de açúcares como seiva de plantas. As fêmeas (só estas) são também hematófagas e, portanto, possuem importância epidemiológica (Afonso e Alves-Pires, 2008).

Na bacia do Mediterrâneo e Ásia os flebotomíneos estão mais ativos desde a Primavera até o final de Outono e de Abril a Novembro, ou seja, durante os meses quentes. Na América do Sul, alguns flebotomíneos têm atividade durante todo o ano, como é o caso de *L. longipalpis*, classificado como principal vetor no NM (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Sua atividade é crepuscular e noturna. O *L. longipalpis* é encontrado principalmente, perto das habitações humanas (endofílico), próximo à fonte de alimento, onde podem entrar à noite

devido fototropismo positivo. Durante o dia, estes insetos ficam em repouso em locais de alta umidade, com temperaturas moderadas a estáveis, alto teor de matéria orgânica de origem animal ou vegetal, tais lugares fornecem condições favoráveis ao desenvolvimento de suas larvas (exofílicas) (Solano-Gallego, *et al.*, 2009).

O ciclo biológico da *L. longipalpis* acontece em ambiente terrestre e compreende desenvolvimento em quatro fases: ovo, larva (que se subdivide em quatro estágios) e finalmente pupa e adulto (Brasil, 2006). O inseto pode completar um ciclo de ovo até forma adulta em cerca de 30 a 45 dias, variando com temperatura, humidade e fotoperíodo (Santa Rosa e Oliveira, 1997).

3.4. Hospedeiros e reservatórios

A identificação de um parasito em determinada espécie, seja por exame sorológico, direto ou molecular não quer dizer que essa espécie é considerada como reservatório (Roque e Jansen, 2014). O animal infectado é classificado como hospedeiro do parasito (Ashford, 1996). O termo hospedeiro diz respeito a uma espécie que abriga um parasito oportunista que comprometerá ou não sua sobrevivência. No entanto o hospedeiro precisa preencher alguns critérios para ser considerado reservatório: apresentar prevalência mínima de 20%; apresentar superposição espaço/tempo com os vetores; sobreviver tempo suficiente para garantir a transmissão do parasito; possuir a mesma espécie encontrada no homem; manter o parasito no sangue ou na pele em quantidades suficientes para infectar o vetor (Silva *et al.*, 2005).

Cada mamífero atuante como reservatório desempenha um papel importante na manutenção do parasito. Os sistemas reservatórios devem ser considerados em uma escala espaço-temporal restrita, específica para cada local e cada momento (Roque e Jansen, 2014). A força e especificidade da seleção, o que possibilitaria uma determinada espécie ser considerada mais ou menos importante como mantenedora do ciclo de transmissão, é afetada diretamente pelo ambiente onde interagem hospedeiro/parasita (Wolinska e King, 2009).

Canídeos selvagens dos gêneros *Dusicyon*, *Cerdocyon* e *Lycalopex*, marsupiais como *Didelphis* e roedores *Akodon*, *Oryzomys*, *Proechimys* são considerados potenciais reservatórios silvestres da leishmaniose. No Brasil, foram descritas duas espécies de raposas naturalmente infectadas: *Lycalopex vetulus* no Ceará e *Cerdocyon thous* no Pará e Minas Gerais dentre os roedores: *Proechimys guaynnensis* no Pará *Oryzomys concolor* no Mato Grosso (Lainson e Shaw, 1970), *Akodon arviculoides* e *Oryzomys nigripes* no Estado de São Paulo (Forattini *et al.*, 1972).

O cão (*Canis familiaris*) é considerado o mais importante reservatório da LV e o responsabilizam pelo surgimento de casos novos e pela manutenção de focos da doença nos grandes centros (Silva *et al.*, 2001). Devida sua convivência próxima ao homem, apresentarem alta susceptibilidade a infecção e apresentarem intenso parasitismo cutâneo, os cães preenchem as condições necessárias para serem reservatórios da leishmaniose (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006).

Apesar de ser considerado principal reservatório, os cães não são preferência alimentar para o *L. longipalpis* em algumas áreas. Objetivando avaliar a preferência alimentar do vetor, um estudo realizado no Mato Grosso mostrou que a maioria dos flebotomíneos não tiveram preferência pelos cães, mas por aves, roedores e humanos (Missawa *et al.*, 2008). Segundo Bern *et al.*

(2010), Marcondes e Rossi (2013), o tamanho da biomassa do hospedeiro, acessibilidade e abundância do mesmo, que determinam a preferência alimentar do *L. longipalpis*, portanto, o crescimento de forma desordenada dos grandes centros urbanos, desmatamentos e a adaptação rápida do vetor ao ambiente, propicia a mudança na alimentação buscando novas fontes. Dessa forma, em algumas regiões o papel do cão na epidemiologia da doença causada pela *L. infantum*, pode ser pouco considerável.

Outros animais domésticos já foram encontrados infectados por *Leishmania*, tais como equinos (Benassi, 2015) e felinos (Gomes, 2015; Benassi, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

3.5.Ciclo biológico e transmissão

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxênico, envolve hospedeiro intermediário, o flebotomíneo, e um hospedeiro vertebrado definitivo (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

A transmissão se dá quando fêmeas dos flebotomíneos (*L. longipalpis*) se alimentam em hospedeiros infectados, mais comumente em áreas de pêlo rarefeito, como cabeça, pavilhões auriculares, ou áreas glabras (sem pêlo) como espelho nasal e pele do abdômen, ingerindo macrófagos contendo as formas amastigotas que serão liberadas no intestino do inseto e por divisão binária irão se transformar em formas promastigotas (Rey, 2002; Michalick, 2005). Após dois a três dias do repasto alimentar as formas promastigotas irão migrar para a porção torácica do intestino médio do inseto. Durante a migração os parasitas se transformam em promastigotas, curtas e largas, livres na luz do intestino, paramastigotas arredondadas, que se fixam ao epitélio intestinal pelo flagelo e diferenciam por fim, em promastigotas metacíclicas, que são formas alongadas, com flagelo longo e alta motilidade, e não mais se dividem. As formas promastigotas metacíclicas irão se instalar na faringe, cibário e probóscide do inseto e serão injetadas na pele do hospedeiro juntamente com a saliva durante novo repasto sanguíneo (Michalick, 2005). As promastigotas metacíclicas serão fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) do hospedeiro e se transformam em amastigotas multiplicando-se no interior do fagolisossomo, infectando novas células do SMF quando a célula hospedeira original se rompe, ocorrendo à liberação destas formas. As células serão fagocitadas novamente por macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então, a disseminação por via hematogênica para outros tecidos, como linfonodo, fígado, baço e medula óssea que são ricos em células SMF. Quando outro inseto se alimenta de sangue neste hospedeiro infectado o ciclo se completa (Michalick, 2005; Silva, 2012a).

A transmissão entre a população canina através de transfusão de sangue a partir de doadores infectados, cópula, mordedura, via transplacentária, ingestão de vísceras contaminadas, foi citada por alguns autores, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos (Silva *et al.*, 2009; Brasil, 2015). Outros autores relataram a hipótese de transmissão por ectoparasitas, como pulgas e carrapatos (Coutinho e Linardi, 2007; Freitas, 2012).

3.6.Patogenia

Ao fazer o repasto, os flebotomíneos, inoculam juntamente com a saliva, as formas infectantes, promastigotas metacíclicas, na pele do hospedeiro vertebrado. No local da inoculação uma reação inflamatória é iniciada atraindo outros tipos celulares, como neutrófilos, histiócitos,

monócitos e macrófagos, sendo estes dois últimos importantes no processo de fagocitose (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

O parasito possui em sua estrutura, um glicoconjugado, a Glicoproteína 63 (GP63) que permite a endocitose pelos macrófagos (Bates, 2007; Alexandre-Pires e Correia, 2008). As formas promastigotas serão fagocitadas se diferenciando em amastigotas no interior dos fagolisossomas e irão se multiplicar levando a ruptura dos macrófagos. Novas células serão infectadas pelas formas amastigotas livres podendo disseminar para órgãos linfoides do hospedeiro vertebrado como linfonodos, baço, medula óssea, fígado e também áreas cutâneas, instalando dessa forma infecção sistêmica (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Nem todos os cães infectados por *Leishmania* irão desenvolver a doença. Em termos clínicos, os cães podem ser considerados resistentes ou susceptíveis ao desenvolvimento da doença. O desenvolvimento da infecção com sinais intensos ou discretos ou forma subclínica dependerá da reação imunitária individual do hospedeiro. O estado subclínico não será permanente caso o equilíbrio seja interrompido por fatores imunossupressores e doenças concomitantes, podendo assim a doença progredir (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Fatores dependentes do hospedeiro irão influenciar diretamente na patogenia, sendo primários: constituição genética e capacidade de resposta imunitária, que irão condicionar a capacidade e grau de resistência à infecção e a predisposição para desenvolver um ou outro tipo de doença e os secundários: estado nutricional, sexo, idade e doenças concomitantes presentes (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

As respostas imunológicas podem variar em diferentes estágios da infecção. Na infecção subclínica com parasitismo reduzido, a principal característica da infecção foi o aumento dos níveis de células T CD8+. A fase mais grave da doença e de maior grau de parasitismo é acompanhada pela diminuição das células T CD4+, CD5+ e CD8+, linfócitos B CD21+ e monócitos. (Guerra *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2009).

Observa-se um aumento na produção de interleucinas Th-2, especificamente IL-4, IL-6, IL-10, com a evolução da infecção para doença clínica, com isso a imunidade humoral é estimulada, principalmente linfócitos B e uma depressão da imunidade celular (Ciaramella e Corona, 2003). Os órgãos linfoides tendem a esgotar as regiões de linfócitos T e proliferação das áreas de linfócitos B levando a esplenomegalia e linfadenomegalia generalizada. Com o aumento da imunidade humoral, ocorre excesso na produção de imunoglobulinas (Ig), principalmente hipergamaglobulinas que quando aumentadas podem se tornar prejudiciais. Formam-se grandes quantidades de imunocomplexos circulantes (CIC), devida alta produção de Ig, e estes podem ser depositados na parede de vasos sanguíneos, causando vasculites, no líquido sinovial, levando a poliartrites, necrose dos tecidos, lesões na derme, uveítes e mais raramente lesões no sistema nervoso (Font *et al.*, 2004; Torrent *et al.*, 2005). A glomerulonefrite pode se desenvolver pela deposição dos imunocomplexos nos rins e levar a insuficiência renal, principal causa de morte nos cães com leishmaniose (Rigo *et al.*, 2013).

3.7. Sinais clínicos

A LV é classicamente uma doença crônica, mas também foram descritos na literatura cursos agudos (Ciaramella *et al.*, 1997). O período de incubação é muito variável e os sinais clínicos

podem desenvolver-se de três meses até sete anos após a infecção (Miró *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Os sinais clínicos da LV canina são consequências de interações entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (Santos-Gomes, 2002; Solano-Gallego e Baneth, 2008). As imunoglobulinas são produzidas em excesso e perdem sua função protetora tornando-se prejudiciais, levando a formação de imunocomplexos circulantes (CIC) pela hipergamaglobulinemia e estes complexos são depositados em vários órgãos e tecidos (Lopez, 1996). Segundo Noli (1999), as alterações se devem, além da deposição de imunocomplexos, à formação de lesões inflamatórias não supurativas causadas pela ação direta do parasito nos tecidos.

Cães positivos para LVC podem manifestar diversos sinais clínicos, sendo as lesões cutâneas, normalmente as mais comuns, como alopecia, especialmente na cabeça, ao redor dos olhos, nos membros; seborreia seca, hiperqueratose, dermatite pustular e nodular e dermatose ulcerativa. Aliados a esses sinais, outras anormalidades clínico-patológicas podem ser observadas como perda de peso progressiva com atrofia muscular, linfadenomegalia focal ou generalizada, inapetência, prostração, hepatoesplenomegalia, poliúria, polidipsia, epistaxe, onicogribose, diarreia, vômitos, poliartrites, hepatite crônica, coagulação intravascular disseminada (CID), pancreatite e meningites (Pumarola, 1991; Ciaramela *et al.*, 1997; McConkey, 2002; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Dentre os sinais clínicos neurológicos que foram observados destacam-se ataxia, tremores, paresia dos membros, andar em círculos e convulsões (Feitosa *et al.*, 2000). Alterações oculares também foram descritas e são variadas, sendo que blefarite, conjuntivite, ceratoconjuntivite seca e uveítes são as mais comuns (Andrade *et al.*, 2009).

Apresentações clínicas variadas levaram a necessidade de criar uma classificação dos cães portadores da doença. Mancianti *et al.* (1988), classificaram os cães infectados em: assintomáticos, aqueles que não apresentavam sinais clínicos; oligossintomáticos, aqueles que apresentassem sinais clínicos moderados como: perda de peso, discretas lesões de pele e linfadenomegalia; e sintomáticos, aqueles que apresentassem vários sinais graves da doença. Essa classificação foi utilizada por vários anos e contribuiu muito, porém, seu valor é limitado por não considerar as alterações de patologia clínica e cães aparentemente sadios com graves alterações sistêmicas (Solano-Gallego e Baneth., 2008).

Solano-Gallego (2011), propuseram um sistema de classificação composto por quatro estágios clínicos: Estádio I, doença discreta, Estádio II, doença moderada, Estádio III, doença grave, e Estádio IV, doença muito grave. Esses estágios foram classificados de acordo com os resultados sorológicos que variam de negativo a alto nível de anticorpos anti-*Leishmania*, associado a alterações de patologia clínica e sinais clínicos (Quadro 1).

Quadro 1. Estadiamento clínico da LVC baseado no nível de anticorpos, sinais clínicos, dados laboratoriais, tipo de terapia e prognóstico.

Estadiamento Clínico	Sorologia	Sinais Clínicos	Achados de patologia clínica	Terapia	Prognóstico
Estágio I Doença Discreta	Negativa ou discretos níveis de anticorpos (infecção confirmada p/imunohistoquímica)	Cães com sinais clínicos discretos como linfadenopatia discreta ou dermatite papular	Sem alterações perfil renal normal: creatinina <1,4mg/dl e relação de proteína creatinina urinária <0,5	Acompanhamento ou alopurinol apenas associado ao antimoniato de meglumina ou miltefosina	Bom
Estágio II Doença moderada	Níveis de anticorpos discretos a elevados Corte 1/80	Além de sintomas listados em I: dermatite esfoliativa difusa, onicogribose, ulcerações, anorexia, perda de peso e epistaxe.	Anemia não regenerativa, hiper-gamaglobulinemia creatinina <1,4mg/ dL e relação de proteína creatinina urinária 0,5-1	Alopurinol associado ao antimoniato de meglumina ou miltefosina	Bom a reservado
Estágio III Doença grave	Níveis de anticorpos elevados Corte 1/80	Além dos sinais listados anteriormente, os cães podem apresentar lesões advindas da deposição de imunocomplexos: vasculites, artrites, uveíte e glomérulonefrite	Alterações listadas no estágio II, doença renal crônica (IRIS I) relação de proteína creatinina urinária >1 ou IRIS II, creatinina 1,4-2mg/dL	Alopurinol associado ao antimoniato de meglumina ou miltefosina. Seguir o protocolo IRIS para doença renal crônica	Reservado a desfavorável
Estágio IV Doença muito grave	Níveis de anticorpos muito elevados Corte 1/80	Além das lesões citadas anteriormente os cães podem apresentar tromboembolismo pulmonar síndrome nefrótica e estágio final da doença renal	Alterações listadas no estágio III, doença renal crônica IRIS III (creatinina sérica 2-5mg/dL) ou IRIS IV (creatinina >5mg/dL) ou síndrome nefrótica com proteinúria acentuada e relação de proteína creatinina urinária >5.	Alopurinol Seguir o protocolo IRIS para doença renal crônica	Desfavorável

Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, (2011). IRIS staging of chronic renal disease (http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml).

3.8. Diagnóstico

O diagnóstico da LV, tanto no homem quanto no cão, é complexo, já que essa doença pode apresentar sintomas e sinais semelhantes a outras patologias, como por exemplo, Doença de Chagas, malária, febre tifóide, esquistossomose e tuberculose, no homem, e erliquiose, dermatopatias autoimunes, como lúpus e pênfigo, no cão (Gontijo e Melo, 2004; Solano-Gallego e Baneth, 2008). O problema ainda é maior em se tratando de LVC, pois os cães podem apresentar diferentes sinais clínicos, que podem variar quanto a gravidade, ou ainda manter a doença subclínica por vários meses, mantendo-se como fonte de infecção para os flebotômíneos desempenhando dessa forma importante papel na epidemiologia da doença (Gontijo e Melo, 2004).

A pesquisa de infecção por *Leishmania* deve ter uma abordagem completa, considerando a anamnese/histórico clínico do animal, exame físico completo e bem realizado, resultados de análises laboratoriais, exames diretos que detectam o parasito ou testes indiretos que avaliam a resposta imunitária específica do hospedeiro (Gramiccia, 2011).

Diversos métodos podem ser utilizados no diagnóstico da LVH e LVC, mas nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (Tavares *et al.*, 2003). Por essa razão, o diagnóstico correto da LVC ainda é um desafio muito grande, apesar de vários métodos apresentarem progressos significativos. Atualmente, realizam-se testes sorológicos, parasitológicos e moleculares; cada um apresentando os seus pontos positivos e negativos (Maia e Campino, 2008).

Solano-Gallego *et al.*, (2011) sugeriram uma abordagem diagnóstica em cães com suspeita clínica de leishmaniose demonstrada na Figura 6.

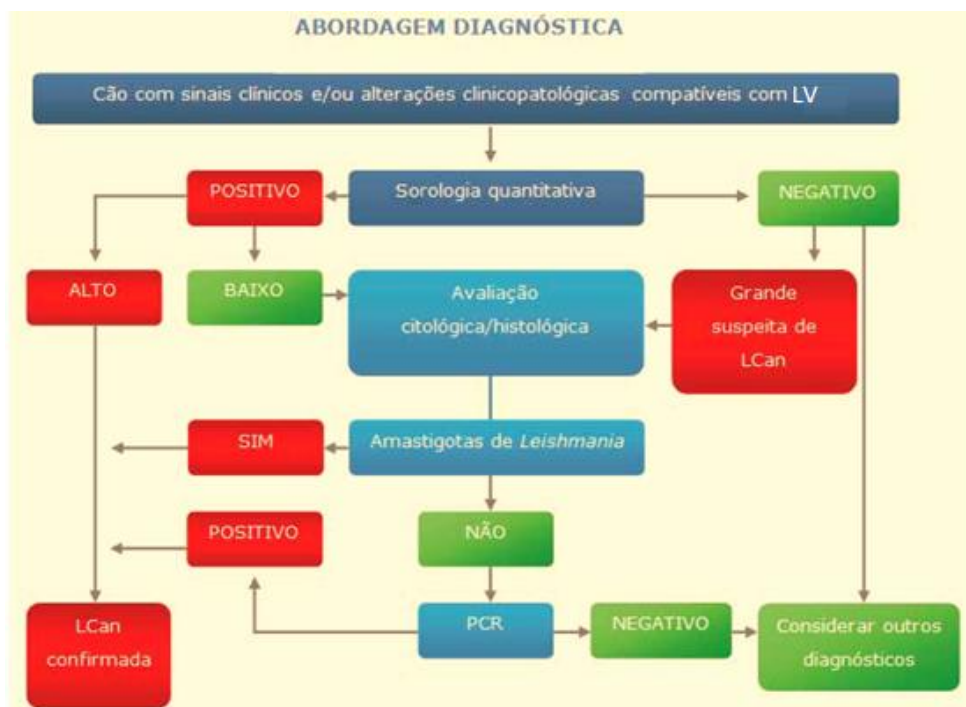


Figura 6 – Abordagem diagnóstica em cães com suspeita clínica de leishmaniose (adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011).

3.8.1. Análise laboratorial

Os testes laboratoriais que podem contribuir para o diagnóstico da doença, por apresentarem alterações associadas a mesma são basicamente constituídos pelo hemograma, perfil bioquímico (renal, hepático, proteinograma) e exame de urina (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

As alterações comumente encontradas no hemograma completo são: anemia, leucopenia ou leucocitose moderada e trombocitopenia (Baneth e Solano-Gallego, 2012). A anemia frequentemente encontrada é classificada como normocítica normocrômica, não regenerativa, podendo ser de moderada a grave. Esta pode ser causada pela perda de sangue (epistaxe e hemorragias intestinais), hemólise (imunocomplexos), redução da eritropoiese (deficiência de ferro, baixa produção de eritropoietina na insuficiência renal crônica, aplasia medular), deficiência nutricional e doenças concomitantes (Hemoparasitoses) (Saridomichelakis, 2009). O quadro anêmico pode ser agravado pela diminuição da meia vida das hemácias associadas à produção de anticorpos, que leva ao sequestro esplênico (Ykeda *et al.*, 2003). Para alguns autores, a anemia está diretamente relacionada à gravidade do quadro clínico do animal, onde os sintomáticos apresentariam menor número de hemácias, hematócrito diminuído e níveis de hemoglobina abaixo dos valores de referência (Reis, 2001; Xavier, 2002; Costa-Val, 2004).

Com relação às alterações leucocitárias, alguns autores relatam leucopenia e outros leucocitose por neutrofilia, sendo achado ocasional (Slappendel, 1988). Em um estudo que comparava alterações leucocitárias em animais positivos para LVC, Bourdoiseau *et al.* (1997), concluíram que os cães com estado clínico bom, apresentavam linfocitose, enquanto aqueles com estado clínico grave apresentavam linfopenia. A monocitose também é encontrada e pode vir acompanhada, muitas das vezes, pela presença de grandes monócitos ativados, e esses podem estar parasitados (Buracco, 1997). A trombocitopenia pode estar presente em 30 a 50% dos casos de cães portadores de LVC (Xavier, 2002).

Em 70% a 100% dos cães infectados por LVC espera-se hiperproteinemia (Reis, 2001; Baneth e Solano-Gallego, 2012). O perfil eletroforético das proteínas plasmáticas dos cães doentes apresenta aumento das gamaglobulinas pela ativação policlonal das frações β e γ e diminuição da albumina que ocorre devido a perdas por nefropatia, doença hepática, subnutrição crônica ou à combinação destes fatores (Koutinas, 1999; Reis, 2001; Xavier, 2002; Ikeda, 2003; Costa-Val, 2004). Assim sendo, na maioria dos animais doentes, a relação Albumina/Globulina (A/G) estaria invertida, sendo que quanto mais sinais o animal apresentasse menor a relação (Koutinas, 1999; Reis, 2001; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Importantes correlações foram relatadas entre sintomas e os valores de proteínas totais, globulina, albumina, relação A/G e as frações β e γ do proteinograma, e essas frações com os valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito (Amusatogui, *et al.*, 2003).

Em se tratando da avaliação hepática, sinais de comprometimento estrutural e funcional hepático podem acontecer incluindo aumento moderado das enzimas alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST), assim como aumento sérico das bilirrubinas (Valladares *et al.*, 1997; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Porém Amusatogui *et al.*, (2003) e Ikeda *et al.*, (2003) citaram ser de baixa frequência nos cães portadores de LVC, sendo observadas em apenas 16% dos casos.

Cerca de 45% dos cães portadores de LV apresentam azotemia, e em 38%, apenas a creatinina está elevada. Aumento nos níveis de uréia são mais comuns que os níveis de creatinina (Nieto *et al.*, 1992). Amusatogui *et al.*, (2003), verificaram aumento dos níveis séricos de uréia em 65% dos cães com LV enquanto apenas 7% apresentavam aumento de creatinina. Xavier, (2002), observou que cães sintomáticos apresentavam maiores índices de uréia sérica que aqueles assintomáticos. Os níveis de creatinina aumentados no sangue podem ser usados como indicadores de presença de CIC, pois existe forte correlação positiva com os CIC determinantes de nefropatias na LVC (Lopez *et al.*, 1996).

A proteinúria encontrada na avaliação urinária é a alteração mais frequentemente descrita nos animais positivos para LVC, sendo encontrada em 70 a 85% ou em até 100% dos animais portadores (Nieto, 1992; Koutinas *et al.*, 1999). Cilindros hialinos e/ou granulados podem ser observados em 100% dos casos (Koutinas *et al.*, 1999).

Em animais que tenham histórico e sinais clínicos que indiquem insuficiência renal crônica (IRC) espera-se uma relação proteína/creatinina urinárias superior a 0,5 (Koutinas *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

3.8.2. Técnicas sorológicas

Os métodos sorológicos mais comuns para a detecção de anticorpos no soro são a RIFI e ELISA, podem ser utilizados para diagnóstico de indivíduos infectados e em estudos de prevalência (Gomes *et al.*, 2008).

A suscetibilidade à doença está relacionada com a resposta imune do animal infectado, sendo assim, cães que apresentem altos títulos de anticorpos, geralmente apresentam um alto parasitismo. A soroconversão pode ocorrer em intervalos que variam de um a 22 meses e em cães com o parasito disseminado os títulos de anticorpos estarão elevados (Reis, *et al.*, 2009). Sendo assim, os métodos sorológicos aplicados a animais que não apresentem sinais clínicos, apresentam a sensibilidade baixa e estes, podem apresentar resultados falso-negativos. Vários patógenos como leishmaniose tegumentar, chagas, babesiose, erliquiose, hepatozoon dentre outros, podem causar reações cruzadas que também podem levar resultados falso positivos (Solano-Gallego, *et al.*, 2011).

A RIFI é muito utilizada no diagnóstico da LVC com alta sensibilidade. Porém a especificidade da técnica fica comprometida quando esta é utilizada em áreas em que o cão é portador de leishmaniose tegumentar (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Formas promastigotas de *Leishmania* são usadas como antígeno na RIFI, portanto sua preparação exige pessoal qualificado. Comparadas aos kits comerciais, as lâminas feitas em laboratórios de diagnóstico produzem resultados melhores. As desvantagens do método é ser caro, demorado e demandar pessoal treinado (Tavares *et al.*, 2003).

O ELISA também é muito utilizado no diagnóstico, sendo a segunda técnica mais comum no continente Europeu. Indica-se atualmente como triagem, para posterior confirmação pela RIFI nos inquéritos epidemiológicos no Brasil (Brasil, 2007). Sua especificidade também é comprometida por reações cruzadas com várias espécies de tripanossomatídeos ou até mesmo por espécies filogeneticamente distantes (Tavares *et al.*, 2003).

Inúmeros testes imunocromatográficos têm sido testados nos últimos anos, usando como antígenos, proteínas recombinantes como rK39 e rK26, como também proteínas que são

extraídas de bactérias que compõem reagentes marcadores dos testes para LVC (Lemos *et al.*, 2008). O teste proporciona resultados qualitativos rápidos, mas sua sensibilidade ainda é variável mesmo apresentando especificidade alta (Mettler *et al.*, 2005).

3.8.3. Técnicas biomoleculares

A utilização de técnicas biomoleculares para o diagnóstico da LVC demonstrou elevadas sensibilidade e especificidade, superando resultados atingidos pelas técnicas de RIFI e ELISA na detecção de animais infectados por *Leishmania*. São exemplos da técnica, a reação em cadeia de polimerase convencional (PCR) e a PCR em tempo real ou quantitativa (qPCR) (Miró *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

O método de PCR consiste na identificação de uma região do DNA do parasito, denominada alvo. A PCR é uma técnica qualitativa e pode ser de extrema utilidade, especialmente em casos com resultados sorológicos duvidosos (Gomes *et al.*, 2008) e a qPCR é uma técnica quantitativa, utilizada para quantificar a carga parasitária e a distribuição tecidual, cinética da infecção e monitorar a resposta ao tratamento, permitindo definir possibilidades de recidiva a partir de uma carga parasitaria residual pós tratamento (Gomes *et al.*, 2008; Gramiccia, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

As técnicas de PCR podem ser realizadas em variadas amostras de cães portadores da LVC, para detecção do DNA do parasito. Podem ser utilizadas amostras de sangue periférico, baço, linfonodos, pele e medula óssea. Alguns estudos evidenciaram que a detecção do parasito no sangue periférico comparada a outras amostras é menos sensível (Fisa *et al.*, 2001).

Maia *et al.*, (2009) , utilizaram cães com variados sinais clínicos e comprovaram que o uso de aspirado de linfonodos pela técnica de PCR é ideal para o diagnóstico precoce da LVC. Em casos que não tenham sinais, principalmente linfadenomegalia, o aspirado de medula óssea é indicado pois apresenta maior carga parasitária (Quaresma *et al.*, 2009).

Através da PCR, Manna *et al.*, (2008), atingiram resultados com especificidade e sensibilidade elevadas: em 95% das biópsias cutâneas, 94% das amostras sanguíneas e 99% em amostras de linfonodo foram detectados DNA do parasito.

A associação entre a PCR e o uso do swab conjuntival para a detecção de *Leishmania* spp. em cães, descrita em alguns estudos no Brasil e Itália, demonstram alta sensibilidade tanto para detecção de animais com sintomatologia clássica quanto para animais que não apresentam sinais aparentes (Benvenega, 2013; Leite *et al.*, 2015). A eficácia do swab conjuntival foi demonstrada por Benvenega, (2013), a qual foi capaz de detectar a doença em gatos e equinos infectados.

Resultado de PCR negativo não é suficiente para descartar a infecção em um cão clinicamente suspeito. Vários resultados discordantes entre si podem ser obtidos em diferentes tecidos utilizados de um mesmo cão. A distribuição heterogênia do parasita em cada tecido, a carga parasitária associada ao tropismo e a resposta imunitária local, justificam tal fato (Maia e Campino, 2008).

3.8.4. Técnicas parasitológicas

Considerado o melhor método para diagnóstico da LV, o método parasitológico, apresenta alta especificidade e consiste na demonstração do parasita, tanto em esfregaços sanguíneos, como também em aspirados de linfonodos, lesões cutâneas, medula óssea, baço, líquido sinovial (LS) e biópsias hepáticas (Alvar *et al.*, 2004). O método pode ter sua sensibilidade variada de acordo com o tipo de material coletado, tempo de leitura da amostra e densidade parasitária do indivíduo infectado (Genaro, 1993). A identificação das formas amastigotas depende de treino, experiência e habilidade do examinador (Alvar *et al.*, 2004). Segundo Costa *et al.*, (2014), a coleta da amostra é uma desvantagem da técnica devido ao caráter invasivo tornando-se impraticáveis nos estudos epidemiológicos, onde um grande número de animais são avaliados em curto períodos de tempo além da inexperiência de muitos profissionais na coleta.

3.8.4.1. Análise do líquido sinovial (LS)

O líquido sinovial (LS) tem importante auxílio no diagnóstico de artrite por leishmaniose e também o diagnóstico diferencial nas afecções articulares do cão (Pedersen, 1978). Trabalhos recentes mostram que a análise parasitológica do LS também é determinante no diagnóstico de LVC e destacam a alta sensibilidade de detecção do parasito (Silva *et al.*, 2014). Sua avaliação deve ser feita em conjunto com os sinais clínicos, radiográficos, com exames hematológicos, bioquímicos e sorológicos a fim de determinar a etiologia e natureza da doença (Pedersen, 1978).

Importantes informações são fornecidas pela análise do LS como a cor, viscosidade, turbidez, celularidade, qualidade do coágulo de mucina e concentração de proteínas totais (Tatarunas *et al.*, 2004).

O processo inflamatório articular causado pela LV promove aumento na quantidade do LS, diminuição da viscosidade devido a degradação do ácido hialurônico (HA) pela hialuronidase originada das células ou agentes inflamatórios (Pedersen, 1978).

O LS de um cão saudável apresenta-se viscoso, de cor amarelo palha, pH entre 7,0 e 7,8, não contém fibrinogênio e um bom coágulo de mucina é formado quando feita sua análise (Fernandes *et al.*, 2009).

Fatores que possam limitar a avaliação do LS são principalmente os baixos volumes e alta viscosidade (Fernandes *et al.*, 2009). A manipulação da amostra pode alterar os resultados e as células do LS se degradam rapidamente, dessa forma a análise deve ser realizada em até quatro horas após a coleta e mantida refrigerada a 4°C em até no máximo 24 horas. Para preservar a morfologia celular do LS, esfregaços em lâminas de vidro devem ser confeccionados no momento da coleta (Tatarunas *et al.*, 2004).

Em cães positivos para LV foram observadas alterações como: aumento da concentração de proteínas totais secundárias ao edema tecidual devida elevação da permeabilidade vascular da membrana sinovial (Buracco *et al.*, 1997); aumento da celularidade, principalmente neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos (Spreng, 1993; Tatarunas *et al.*, 2004); mudanças de coloração que variam de turva a amarelo esverdeada; diminuição da viscosidade, coágulo de mucina fraco a muito fraco e espessamento da cápsula articular (Tatarunas *et al.*, 2004).

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1.Animais

Foram utilizados 38 animais, dentre machos e fêmeas, dois a cinco anos de idade, pesando entre 15 e 35kg, sendo 12 animais com resultados de sorologia negativos para leishmaniose (RIFI e ELISA), grupo controle (G1) e 26 animais com resultados de sorologia positivos para leishmaniose (RIFI e ELISA) com titulação igual ou superior a 1/80, sendo classificados de acordo com sinais clínicos e análises laboratoriais em animais de estágio II (G2- doença moderada) e estágio III (G3- doença grave). Todos os animais foram submetidos ao teste teste de imunoenensaio imunocromatográfico para detecção de anticorpos anti *Ehrlichia canis*. Esses exames foram realizados em laboratório particular CDMA diagnóstico.

Dos 26 animais positivos para LVC utilizados neste estudo, dois foram excluídos por apresentarem teste de imunoenensaio imunocromatográfico para detecção de anticorpos anti *Ehrlichia canis* positivo.

Dez animais foram provenientes de clínica particular e da região metropolitana da cidade de Belo Horizonte e 28 cães, do Centro de Controle de Zoonoses de BH (CCZ).

Este projeto foi enviado para a Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado sob Protocolo nº. 371 / 2014 (anexo 1).

4.2.Locais de execução

A anamnese, avaliação clínica e coleta de amostras dos animais foram realizadas na clínica veterinária participante e no Centro de Controle de Zoonoses de BH (CCZ-BH).

As análises laboratoriais foram realizadas no laboratório de patologia clínica da Escola de Veterinária da UFMG e laboratório de análises clínicas da clínica veterinária participante e CDMA diagnóstico.

4.3.Triagem dos animais

A triagem dos animais foi realizada pelo conjunto de informações obtidas pela realização de anamnese, exame clínico geral e ortopédico e avaliações laboratoriais. Foram descartados os animais que apresentaram alterações ortopédicas compatíveis com processos degenerativos (doença articular degenerativa) e animais com alterações sugestivas de doenças infecto contagiosas. Foram realizados testes de imunoenensaio imunocromatográfico para detecção de anticorpos anti *Ehrlichia canis*, sendo os animais positivos também descartados. Os dados foram anotados em fichas individuais, contendo os dados completos dos animais e exames realizados.

4.4.Avaliação Clínica

Foi executado exame clínico completo em cada animal, avaliando parâmetros como estado geral, peso, hidratação, características de pele e anexos, linfonodos palpáveis, coloração de mucosas, frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal, palpação abdominal e exame ortopédico completo.

4.5. Coleta e processamento de amostras

Foram realizados exames hematológicos, bioquímicos, urina rotina, proteína urinária, relação creatinina/proteína urinária dos animais negativos e imediatamente antes da eutanásia dos animais positivos. A coleta do líquido sinovial foi realizada imediatamente após a eutanásia e processadas conforme descrito posteriormente.

Os animais soropositivos foram eutanasiados conforme critérios descritos no CEUA (comissão de ética no uso de animais- UFMG).

4.5.1. Análise Hematológica

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular, utilizando-se seringa de 3ml com agulha 25x7 e armazenado em tubos contendo EDTA. O perfil hematológico foi realizado em analisador hematológico veterinário Abacus¹, que fornece a dosagem de hemoglobina e valores de VCM, HCM, CHCM. O volume globular (VG) foi analisado também pelo micro-hematócrito, centrifugado por cinco minutos a 10000rpm para comparação com o resultado automático. A contagem diferencial de leucócitos, análise morfológica das células, inclusive plaquetas, foi realizada em microscopia óptica em objetivas de 20x, 40x e 100x, utilizando sangue corado pelo panótico². Contagens plaquetárias automáticas que não se encontraram dentro dos valores de normalidade, foram conferidas a partir de observação em lâmina através da média em dez campos de 100x com posterior multiplicação por 20000. Os valores de referência seguem o proposto por Messick (2010), conforme explicitado no quadro 2.

O número de reticulócitos foi determinado de acordo com as recomendações de Thrall e Weiser (2007) citado por Lopes *et al.* (2006), que preconiza somar quantidades iguais de sangue e do corante azul de metileno na concentração de 5%. A mistura é mantida por 15 minutos em banho maria a 37°C. Em seguida, foram feitos os esfregaços, para contagem dos reticulócitos presentes entre 1000 hemácias observadas na objetiva de imersão sob aumento de 1000X.

Quadro 2: Valores de referência e variáveis avaliadas do hemograma na espécie canina.

Variável	Unidade	Valores de referência
Hematócrito	%	37 – 55
Hemoglobina	g/dL	12 – 18
Hemácias	$\times 10^6/\mu\text{L}$	5,5 – 8,5
VCM	fL	60 – 77
CHCM	%	32 – 36
RDW	%	12 – 15
Leucócitos	μL	6000 – 17000
Neutrófilos	μL	3000 – 11500
Bastonetes	μL	0 – 300
Linfócitos	μL	1000 – 4800
Monócitos	μL	150 – 1350
Eosinófilos	μL	100 – 1200
Basófilos	μL	Raros
Plaquetas	μL	200000 – 500000

Adaptado de Messick (2010)

¹ Analisador Hematológico Veterinário Abacus, Diatron.

² Panótico Rápido LB®, Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil.

4.5.2. Teste de para detecção de anticorpos anti-Ehrlichia canis

Todos os cães foram também submetidos ao teste de imunoensaio imunocromatográfico para detecção de anticorpos (IgG e IgM) anti Ehrlichia canis pelo Alere Erliquiose Ac Test Kit³ para detecção de co infecções e descartar os positivos. Foram inseridos 10µL de sangue total, com uma pipeta capilar, no orifício do indicado no cassete de teste. Após, foram acrescentados 2 gotas de solução tampão no mesmo orifício e aguardados 20 minutos para interpretação do resultado. A presença de duas linhas coloridas (C e T), não importa qual apareça primeiro, indica um resultado POSITIVO. Os cães positivos foram descartados.

4.5.3. Análise Bioquímica

A análise bioquímica foi realizada, a partir de amostras de soro, em Analisador Bioquímico Cobas Mira⁴. As análises bioquímicas incluíram ALT, AST, FA, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina/globulina (Perfil hepático e proteinograma), ureia e creatinina (Perfil renal). A interpretação foi feita com base nos valores de referência citados em Kaneko *et al.*, (1997) (quadro 3).

Quadro 3. Valores de referência e variáveis avaliadas no exame bioquímico na espécie canina.

Variável	Unidade	Valor de referência
ALT	U/L	0 – 110
AST	U/L	0 – 100
FA	U/L	20 – 156
Creatinina	mg/dL	0,5 – 1,5
Ureia	mg/dL	20 – 56
Proteínas totais	g/dL	5,4 – 7,5
Albumina	g/dL	2,3 – 3,1
Globulinas	g/dL	2,7 – 4,4
Relação A/G	-	0,6 – 1,1

Fonte: Adaptado de Kaneko *et al.* (1997)

4.5.4. Urinálise

Cerca de 5-10ml de urina foram coletados por cateterização vesical e analisada imediatamente em temperatura ambiente, segundo técnica descrita por Kerr (2005). A amostra foi refrigerada para análise do sedimento, que foi realizada até seis horas após a coleta.

Foi também feita dosagem de proteína e creatinina urinária e relação proteína/creatinina urinária. Os valores de referências adotados foram os citados em Stockham e Scott (2011) (quadro 4).

³ Erliquiose Ac Test Kit, Alere, São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁴ Analisador bioquímico Cobas Mira plus, Roche.

Quadro 4 Valores de referência para o exame de urina na espécie canina.

Teste	Valores de referência
Exame físico	
Cor	Amarelo
Aspecto	Límpido
Odor	Sui gêneris
Densidade	1,015 – 1,045
Exame químico	
pH	6,0 – 7,5
Proteínas	Negativo
Glicose	Negativo
Exame químico (continuação)	
Corpos cetônicos	Negativo
Sangue oculto	Negativo
Bilirrubina	Negativo
Urobilinogênio	Negativo
Exame do sedimento	
Hemácias	< 5
Leucócitos	< 5
Bactérias	Ausente
Células epiteliais renais	Ausente
Células epiteliais Pelve	Ausente
Células epiteliais Vesicais	Ausente
Células epiteliais Uretrais	Ausente
Cilindros Hialinos	Ausente
Cilindros granulosos	Ausente
Cilindros celulares	Ausente
Cilindros céreos	Ausente
Cilindros mistos	Ausente
Cristais	Ausente

Fonte: Adaptado de Stockham e Scott (2011)

Fonte: adaptado de Stockhan e Scott, (2011).

4.5.5. Líquido Sinovial

Os animais positivos para leishmaniose tiveram o líquido sinovial coletado imediatamente após a eutanásia e dos negativos coletados naturalmente. A coleta foi realizada nas articulações dos tarsos, após tricotomia e antisepsia com Clorexidine 2 utilizando seringa de 3ml e agulha 25x7. Coletou-se entre 500 e 700µL (microlitros) sem contaminação por sangue. Foram distribuídos em tubos de microcoleta contendo EDTA e outro sem EDTA (Tartarunas *et al.*, 2004). Foram feitos esfregaços em lâmina de vidro, fixados ao ar e encaminhado para coloração e leituras imediatas.

- Análise do líquido sinovial:
 - a. Exame físico-químico: A avaliação de cor e aspecto foi realizada nos tubos de ensaio e classificadas como: incolor, amarelo palha e amarelo escuro (MacWilliams e Friedrichs, 2003). Através de fitas reagentes Combur 10⁵, foram avaliados: pH, classificados de acordo com Perman, (1980) em ácido (inferior a 7,0), normal (entre 7 e 7,8) e alcalino (acima de 7,8) e proteínas, classificadas dentro dos valores de referência (entre 2 e 2,5g/dl) e aumentada (acima de 2,5g/dl).
 - b. Viscosidade: A determinação da viscosidade foi realizada no momento da transferência do LS da seringa de colheita para lâmina de vidro, estimando-se o

⁵ Test combur 10, Roche Diagnostic Gmbh e Uridiag Baydiag Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil

comprimento, em centímetros, do filamento formado pela gota antes do seu desprendimento da extremidade da seringa.

Foi classificada em: Ausente: ausência de formação de filamento; diminuída: comprimento do filamento inferior a 5 cm, normal: filamento igual ou maior que 5 cm (Barnabe *et al.*, 2005).

- c. Análise citológica: Foi feita contagem diferencial e morfologia das células do LS bem como pesquisa direta de parasitas. A contagem de células mononucleadas foi feita nos esfregaços corados com corante panótipo rápido. A contagem foi realizada em imersão, utilizando microscópio de luz com objetiva de imersão para contagem de 100 células nucleadas.
- d. Análise parasitológica: Feita pesquisa direta do parasita tanto intra como extra celular.
- e. Teste de Qualidade de precipitação da mucina (TQPM): Foi realizado de acordo com a técnica descrita por Fisher (2003). Baseia-se na precipitação do sal protéico do ácido hialurônico após a acidificação do líquido sinovial pelo ácido acético a 2,5% formando um coágulo que reflete o grau de polimerização desse ácido (Barnabé *et al.*, 2005).

Segundo MacWilliams e Friedrichs, (2003), o coágulo pode ser classificado em: normal (formação de coágulo ótimo, compacto e grande em solução límpida), regular (formação de coágulo amolecido em solução discretamente turva), fraco (coágulo friável em solução turva) ou muito fraco (não formação de coágulo, mas alguns flocos em solução turva).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado.

As alterações do exame físico dos cães, análises físico-químicas e citológicas do líquido sinovial (LS), análises hematológicas, bioquímicas e urinálise foram caracterizadas e submetidas à análise descritiva.

Previamente à aplicação dos testes de comparação, os dados paramétricos foram testados quanto à normalidade (teste de Anderson Darling) e homocedasticidade.

As análises físico-químicas e citológicas do LS, hematológicas, bioquímicas e urinálise incluem indicadores objetivos (paramétricos) e subjetivos (não paramétricos). As respostas que atenderam aos critérios de normalidade e homocedasticidade (neutrófilos no LS, hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, leucócitos e ALT) foram submetidas à análise de variância e analisadas pelo teste de Levene. As respostas que não atenderam aos critérios de normalidade (pH, proteínas, leucócitos, segmentados, linfócitos e macrófagos do LS, leucócitos totais, plaquetas, segmentados, eosinófilos, monócitos, linfócitos, uréia, creatinina, fosfatase alcalina, AST, proteínas totais, albumina, globulina, relação albumina/globulina) foram submetidos a análise de variância e analisadas pelo teste de Kruskal Wallis.

Para testar e medir a correlação entre a variável parasito no LS e as variáveis proteínas totais (séricas), proteínas no LS, neutrófilos (segmentados) no LS, creatinina, globulinas, hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e relação A/G foram utilizadas correlações de Pearson.

Para testar e medir a correlação entre coágulo de mucina e as variáveis proteínas totais (séricas), proteínas no LS, neutrófilos (segmentados) no LS, creatinina, globulinas, hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e relação A/G foram utilizadas correlações de Spearman.

As correlações significativas foram consideradas fortes quando ocorreram em mais de 49% da população estudada ($r > 0,7$), moderada, quando ocorreram em 9 a 49% ($0,3 < r < 0,7$), e fraca, quando ocorreram em menos de 9% da população ($r < 0,3$).

Para avaliar as correlações entre variáveis não numéricas deste estudo (mucina e grupo, mucina e parasito, mucina e viscosidade, parasito e grupo e parasito e viscosidade), foram utilizados o teste de Qui Quadrado e análise de correspondência.

As correlações significativas foram consideradas quando o p-valor foi menor que o nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$).

6.RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.Avaliação física dos cães

Os 12 cães do grupo controle (G1) não apresentaram alterações físicas.

As alterações físicas dos cães positivos para LVC (grupos 2 e 3) estão descritas na Tab. 1.

Analisando os 12 cães do grupo 2 (G2), todos apresentavam linfadenomegalia, onicogrifose e perda de peso discreta a moderada (100%), 11 (91,7%), apresentaram dermatite difusa com descamação furfurácea que variaram de discreta a moderada; nove (75%) apresentaram úlceras na pele ou hiperqueratose da região dos cotovelos e calcanhares e cinco (41,7%) apresentaram, além dos sinais descritos anteriormente, alopecia/hiperqueratose periocular.

Tabela 1 – Sinais clínicos observados nos grupos de animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3) de acordo com Solano-Gallego *et al.* 2011.

Sinais clínicos	Grupo 2		Grupo 3	
	n	%	n	%
Alopecia/Hiperqueratose				
Periocular	5	41,7	12	100
Dermatite Furfurácea	11	91,7	12	100
Efusão Articular	0	0,0	8	66,7
Epistaxe	0	0,0	2	16,7
Esplenomegalia	8	66,7	11	91,7
Linfadenopatia	12	100	12	100
Onicogrifose	12	100	12	100
Perda de peso	12	100	12	100
Úlcera /Hiperqueratose	9	75	12	100
Cotovelo				
Uveíte	0	0,0	8	66,7

No grupo 3 (G3), todos os animais (100%) apresentaram os sinais descritos anteriormente além disso, oito (66,7%) apresentaram uveíte (vermelhidão nos olhos, nebulosidade, secreção purulenta) e efusão articular e dois (16,7%) apresentaram epistaxe.

Os sinais clínicos avaliados neste estudo (tab. 1), corroboram com as alterações clínicas citadas por Solano-Gallego *et al.*, (2011) na classificação do estadiamento clínico da LVC associados aos resultados de exames laboratoriais (hemograma completo, valores de creatinina, relação A/G) e infecção confirmada.

Os sinais clínicos mais frequentes encontrados nos animais do presente estudo (linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose, caquexia, alterações de pele e uveíte) também foram relatados por Castro *et al.* (2012). Vieira (2013) também mencionou, além dos sinais descritos anteriormente, epistaxe e efusão articular em casos mais avançados da doença assim como foi observado nos animais do grupo 3 do presente trabalho.

6.2. Análise do líquido sinovial (LS)

6.2.1. Exame físico-químico

6.2.2. Cor e viscosidade

Os resultados do exame físico de cor e viscosidade do líquido sinovial de cães no grupo controle (G1), cães positivos para leishmaniose estadiamento II (G2) e estadiamento III (G3) estão descritos na Tab. 2

Tabela 2. Número e porcentagem de cães com alterações nos parâmetros cor e viscosidade do líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Variável	Categoria	Grupos					
		G1 (n=12)		G2 (n=12)		G3 (n=12)	
		n	%	n	%	n	%
Cor	Incolor	5	41,6	0	0,0	0	0,0
	Amarelo palha	7	58,3	8	66,7	3	25,0
	Amarelo escuro	0	0,0	4	33,3	9	75,0
	Ausente	12	100,0	8	66,7	3	25,0
Turbidez	Presente	0	0,0	4	33,3	9	75,0
Viscosidade	Normal	10	83,3	6	50,0	4	33,3
	Diminuída	2	16,7	6	50,0	8	66,7
	Ausente	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Na análise descritiva individual o líquido sinovial apresentou-se incolor em cinco cães (13,8%), todos do grupo 1; amarelo palha em 18 (50 %), sendo sete cães do grupo 1 e oito do grupo 2; e amarelo escuro em 13 (36,1%), sendo quatro do grupo 2 e nove do grupo 3. E a turbidez presente quatro cães do grupo 2 e nove do grupo 3 (Tab. 3).

A coloração normal do LS varia de incolor a amarelo palha e sua alteração sinaliza contaminação sanguínea ou afecção. A cor amarelo escuro e a turbidez podem ser indicativa de inflamação e evidenciar aumento na contagem celular (Perman, 1980; Boon, 1997). Presentes nos grupos 2 e 3 podem ser justificadas por estarem presentes em cães positivos para leishmaniose, doença que pode causar artrite associada, na maioria das vezes, pela deposição de imunocomplexos ou à presença direta de formas amastigotas no interior das articulações, como observado nos resultados de Feitosa *et al.*, (2000) e Agut *et al.*, (2003).

Na análise descritiva individual a viscosidade apresentou-se normal em 20 cães (55,5%), sendo dez do grupo 1 (controle) (83,3%), seis do grupo 2 (50%) e quatro do grupo 3 (33,3%) e diminuída em 16 animais (44,4%), sendo dois do grupo 1 (controle), seis do grupo 2 e oito do grupo 3. Não se observou viscosidade ausente em nenhum grupo (tabela 3).

A diminuição da viscosidade do LS também pode ser justificada pelo processo inflamatório articular causado pela leishmaniose, presente nos grupos 2 e 3 (positivos para leishmaniose). O processo inflamatório articular promove aumento na quantidade do LS causando, dessa forma, sua diluição. Além disso, ocorre degradação do ácido hialurônico (HA) pela hialuronidase originada das células ou agentes inflamatórios como observado por Feitosa *et al.*, (2000) e Agut *et al.*, (2003). A diminuição da viscosidade encontrada nos resultados dos animais positivos para leishmaniose também foi relatada por Silva, (2007). MacWilliams e Friedrichs, (2003), além de encontrarem viscosidade diminuída em articulações acometidas pela leishmaniose, também visualizaram essa alteração em articulações traumatizadas ou degeneradas o que pode explicar os achados no grupo 1, já que o mesmo, possui animais saudáveis e negativos para leishmaniose. Essa alteração também pode ser explicada pela dieta pobre.

6.2.3. Proteínas e pH no LS

Os valores da média e desvios padrão para proteínas e pH no LS estão evidenciados na tab.3.

Tabela 3. Valores das médias e seus respectivos desvios padrão de proteína (g/dL) e pH no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

Variável	Grupos			Valores de Referência*
	G1 (n=12)	G2 (n=12)	G3 (n=12)	
Proteína (g/dL)	2,467 ± 0,260 B	4,208 ± 2,050 A	4,250 ± 1,373 A	2 - 2,5g/dL
pH	7,183 ± 0,213 A	7,80 ± 0,718 A	7,750 ± 0,754 A	7 - 7,8

Valores seguidos de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).
Fonte: MacWilliams (2003).

Na comparação entre grupos, para a variável proteínas no LS, houve diferença estatística do grupo 1 com relação aos grupos 2 e 3.

Em uma análise descritiva geral as médias para proteínas no LS dos grupos 2 e 3 (positivos para leishmaniose) se encontraram acima dos valores de referência para espécie canina (gráfico 1).

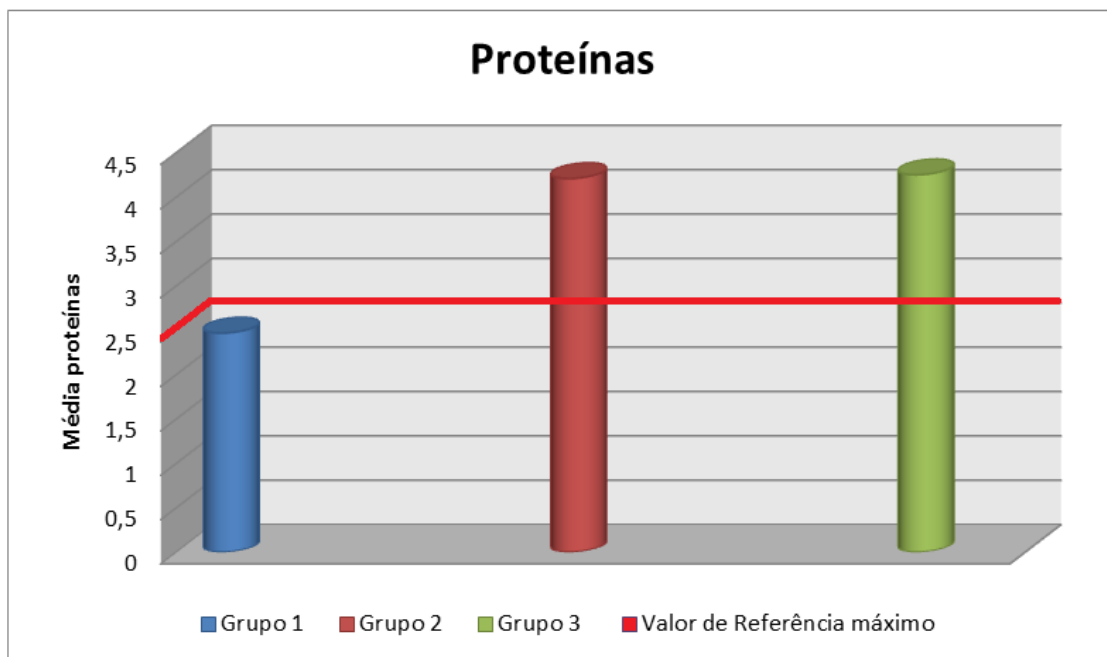


Gráfico 1. Representação gráfica contendo as médias de proteínas (g/dL) no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3). A linha vermelha horizontal representa valor máximo de referência para proteínas do líquido sinovial para espécie canina (Fonte: Perman, 1980).

A análise descritiva individual para a variável proteína no LS está evidenciada na Tab. 4.

Tabela 4. Número e porcentagem de cães que apresentaram alterações nos valores de proteína no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

Variável	Categoria	Grupos						Valor Referência*
		G1 (n=12)		G2 (n=12)		G3 (n=12)		
		n	%	n	%	n	%	
Proteína (g/dL)	2 – 2,5	12	100,0	3	25,0	1	8,3	2 – 2,5 g/dL
	> 2,5	0	0,0	9	75,0	11	91,7	

Fonte: MacWilliams (2003).

A constatação de diferença dos valores de proteínas entre grupo 1 (controle) e grupos 2 e 3 pode ser justificada por os animais do grupo 1 não apresentarem LVC e estarem clinicamente saudáveis, enquanto os animais do grupo 2 e 3 apresentavam LVC em diferentes estágios classificados de acordo com Solano-Gallego *et al.*(2011).

A concentração de proteínas no LS varia de 2 a 2,5 g/dl de acordo com Perman, (1980) e Lipowitz (1985). A presença de médias aumentadas nos valores de proteínas no LS nos grupos 2 e 3 (positivos para leishmaniose) pode ser justificada pela presença da *Leishmania*, que acarreta aumento da permeabilidade vascular presente em animais devido à artropatia inflamatória como observado por Fernandez *et al.* (1983). Os valores das médias dos grupos 2 e 3 quando confrontadas com as obtidas por Chaves *et al.*, (2015) (4,16g/dL) demonstraram semelhança. Macwilliams e Friedcrichs (2003) mencionaram a tendência de aumento nos valores de proteínas totais devido à inflamação e exsudação de proteínas do plasma para dentro do espaço articular.

Na análise descritiva individual, observou-se maior porcentagem de animais com aumento de proteínas no LS no grupo 3 (91,7%) seguido do grupo 2 (75%) (tabela 4). Considerando-se que o grupo 3 compreende animais com doença grave (avançada) e o grupo 2 com doença moderada esses achados podem ser justificados pelo aumento de proteínas em artropatia inflamatória crônica, presente nos animais do grupo 3. Confrontando os valores obtidos por Silva (2007) com os encontrados no presente estudo, verificou-se semelhança para proteínas no LS de animais inoculados com *Leishmania chagasi* por via intra-articular.

Na comparação entre grupos, para variável pH no LS, não houve diferença estatística (gráfico 2).

Em uma análise descritiva geral, as médias para pH no LS se encontraram dentro dos valores de referência para espécie canina nos três grupos (Tab. 3/gráfico 2). De Biase *et al.*, (2001) também encontraram valores de pH dentro da normalidade (7,8). Ao contrario dos resultados do presente estudo, Silva (2007) observou pequena mudança no pH para ácido (6,68).

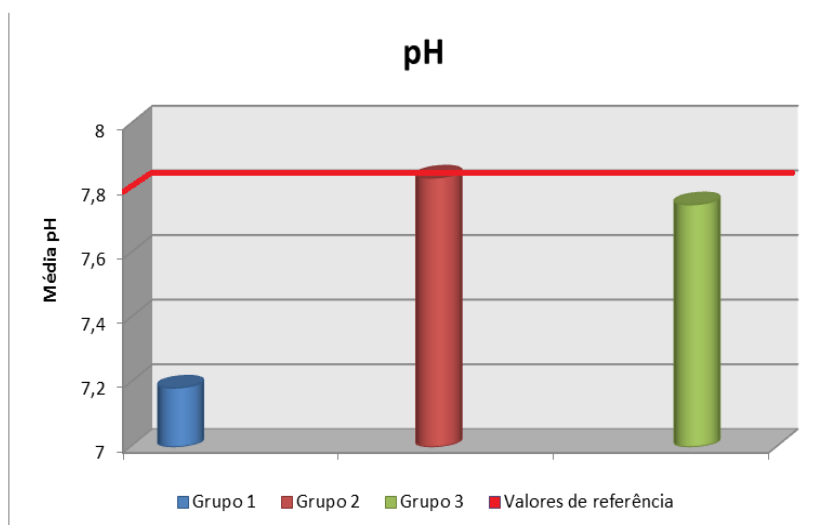


Gráfico 2. Representação gráfica contendo as médias de pH no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3). (Fonte: Fernandes *et al.*, 2009).

6.2.4. Análise citológica do líquido sinovial

Os valores das médias e desvios padrão para a % de linfócitos, macrófagos e neutrófilos do líquido sinovial estão evidenciados na Tab. 5.

Tabela 5. Valores das médias e seus respectivos desvios padrão da porcentagem (%) de linfócitos, macrófagos e neutrófilos no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

Células	G1 (n=12)	G2 (n=12)	G3 (n=12)	Valores de Referência
Linfócitos (%)	73,09±3,315A	21,01± 7,51 B	17,9 ±4,87 B	65 – 90% (linf.+ macr)
Macrófagos (%)	12,3 ± 3,88A	8,33 ± 5,02 A	9,01±3,81 A	<10%
Neutrófilos (%)	9,9 ±1,3 B	63,67 ± 10,24 A	64,42±6,54 A	

Valores seguidos de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

*Fonte: Boon (1997)

Na comparação entre grupos, para variáveis linfócitos e neutrófilos, houve diferença estatística significativa. Não houve diferença estatística significativa para macrófagos.

O grupo 1 apresentou predomínio de células mononucleares, macrófagos e linfócitos (85,5%), e menor porcentagem de polimorfonucleados, principalmente os neutrófilos (10,1%). Esse achados para líquido sinovial normal, corroboram com Fernandez *et al.* (1983).

Nos grupos 2 e 3 (positivos para leishmaniose), evidenciou-se uma inversão da celularidade (gráfico 3), já que o predomínio de mononucleares foi substituído pelo de polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, como citado em outros estudos como de Jacques *et al.* (2002) e Clements *et al.* (2004).

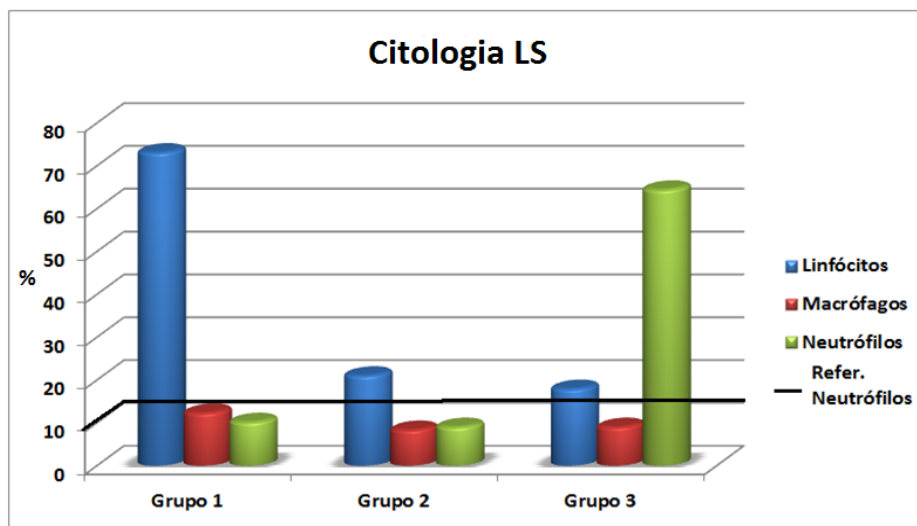


Gráfico 3. Representação gráfica contendo as médias em % das principais células presentes no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3). A linha horizontal representa valor máximo de referência para neutrófilos do líquido sinovial para espécie canina (Fonte: Perman, 1980).

No grupo 2 foram encontrados valores médios de neutrófilos de 63,7% e, no grupo 3, 64,4%. Os mononucleares apresentaram-se diminuídos, com 21% de linfócitos no grupo 2 e 17,9% no grupo 3, e 8,33% de macrófagos no grupo 2 e 9,01% no grupo 3. Segundo Perman (1980) a contagem de neutrófilos aumenta em artrites sépticas e imunomediadas como no presente estudo. Ao contrário, Luvizotto (2006) relata que cães infectados com *Leishmania* sp apresentam uma reação inflamatória mononuclear no LS. O presente estudo corroborou também com os resultados obtidos por Buracco *et al.* (1997) (71% neutrófilos), Silva (2007) (70% neutrófilos) e Silva (2009a) (70-90% neutrof.). A queda nos valores de linfócitos nos grupos 2 e 3 pode ser justificada por uma diminuição relativa devido aumento de neutrófilos, pois foi a realizada apenas análise diferencial devido baixo volume de LS.

6.2.5. Pesquisa direta do parasito

A análise descritiva individual para a variável presença do parasito no LS está evidenciada na Tab. 6.

Tabela 6. Número de cães que apresentaram presença de *Leishmania* sp. no líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Parasito	Grupo					
	G1 (n=12)		G2 (n=12)		G3 (n=12)	
	n	%	n	%	n	%
Presente	0	0,0	4	33,3	9	75,0

Na análise descritiva individual, o parasito foi identificado no LS de 13 cães (54,2%) de um total de 24 cães positivos para leishmaniose (grupos 2 e 3).

No grupo 1 (controle) nenhum animal apresentou parasito no LS.

No grupo 2, quatro animais (30,8%) apresentaram formas amastigotas no citoplasma de macrófagos.

No grupo 3, o protozoário foi identificado em nove animais (69,2%)(gráfico 4). Em cinco destes, as formas amastigotas localizavam-se no interior do citoplasma de macrófagos, em dois destes no interior de neutrófilos e em outros dois animais, localizavam-se livres no LS (figura 1).



Gráfico 4. Representação gráfica contendo o número de cães que apresentaram *Leishmania* sp. no líquido sinovial dos grupos de animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

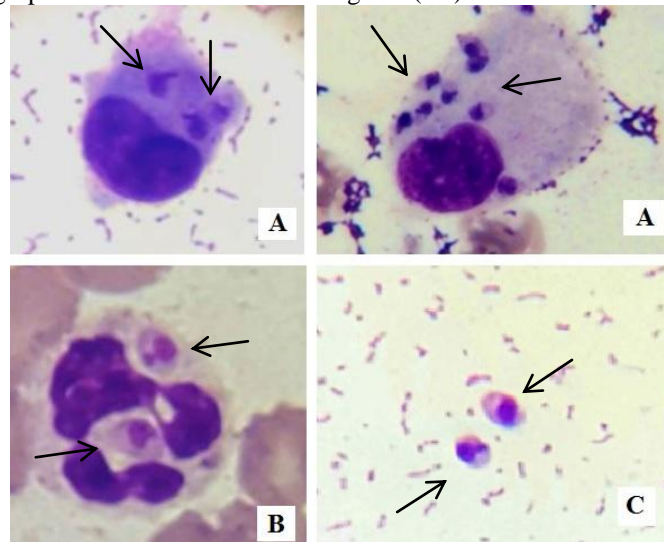


Figura 7. Análise parasitológica do líquido sinovial dos animais positivos para LVC estágio II (G2) e estágio III (G3) para identificação de *Leishmania* sp. (método panótico rápido). Obj. 100x. Formas amastigotas presentes no citoplasma de (A) macrófagos e (B) neutrófilos (setas). Em (C) as amastigotas encontram-se livres no LS.

Mcconkey *et al.* (2002) também encontraram formas amastigotas de *Leishmania* no citoplasma de células mononucleadas e neutrófilos, assim como no presente estudo. A visualização do parasito na análise do LS de cães também foi citada por Buracco *et al.* (1997), Yamaguchi *et al.* (1982) e Spreng (1993). O presente estudo corrobora com resultados de Silva (2007), que identificou o parasito em macrófagos do LS de 64% dos cães avaliados (n=20), com Silva (2009a) que encontrou o parasito em 24,87% dos cães (n=154) e Silva (2014), que encontrou o parasito em 87,5% (n= 40). Segundo Parry (1999), citado por Silva (2007), *Leishmania* sp. tem sido demonstrada em um número pequeno de cães com LVC, discordando com os resultados do presente trabalho. Os autores citados não realizaram associação quanto à presença do parasito e classificação sintomática e laboratorial dos animais.

Na análise de correlação, observaram-se correlações positivas fracas ($r < 0,3$) entre a presença do parasito no LS e proteínas totais séricas (0,292) e positivas moderadas ($0,3 < r < 0,7$) entre as variáveis proteínas no LS, neutrófilos (segmentados) no LS (0,368), creatinina (0,301), e globulinas (0,389). São consideradas positivas, pois quando aumenta o número de parasita no LS consequentemente aumenta a outra variável.

Correlações negativas moderadas, onde o parasita aumenta e a variável diminui, foram observadas entre parasito no LS e hemácias (-0,686), hemoglobina (-0,678), hematócrito (-0,685), plaquetas (-0,362) e relação A/G (-0,488).

Na análise de correspondência, existe associação negativa entre viscosidade e parasito ($\alpha < 0,05$), ou seja, quanto maior a quantidade de parasita no LS menor a viscosidade.

6.2.6. Teste de qualidade e precipitação de mucina (TQPM)

Os resultados obtidos no teste de qualidade e precipitação de mucina (TQPM) do líquido sinovial obtido da articulação tarsal de cães dos grupos controle (G1), estágio II (Grupo 2) e estágio III (G3) se encontram na Tab. 7.

Tabela 7. Número e porcentagem de cães que apresentaram alterações no teste de qualidade e precipitação de mucina (TQPM) do líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

TQPM	Grupo					
	G1 (n=12)		G2 (n=12)		G3 (n= 12)	
	n	%grupo	n	% grupo	n	%grupo
Normal	12	100,0	6	50,0	3	25,0
Regular	0	0,0	4	33,3	1	8,33
Fraco	0	0,0	2	16,6	7	58,3
Muito fraco	0	0,0	0	0,0	1	8,33

Na análise descritiva individual, o grupo 1 apresentou 12 cães (100%) com classificação do coágulo como normal.

Entre os 24 cães positivos para LVC (grupo 2 e 3) 9 cães (37,5%) apresentaram coágulo classificado como normal (figura 2a), cinco (20,8%) como regular (figura 2b), nove (37,5%) como fraco (figura 2c) e apenas um animal (4,16%) como muito fraco (figura. 2d).

Segundo Ellisson (1988) e Boon (1997) o teste de coágulo de mucina indica a qualidade e a concentração do ácido hialurônico no LS e baseia-se no grau de precipitação obtido quando misturado ao ácido acético. Neste estudo observou-se que, em articulações normais (cães do grupo 1), e articulações de dez cães positivos para LVC (grupos 2 e 3), o coágulo de mucina

apresentava-se espesso em solução clara, classificado como normal, sugerindo boa qualidade e concentrações normais do ácido hialurônico.

Os coágulos de mucina de qualidades regular, fraco e muito fraco foram encontrados nos cães positivos para LVC (grupos 2 e 3). A leishmaniose pode causar artrite por desencadear uma reação de hipersensibilidade tipo III, levando a deposição de imunocomplexos no LS (Agut *et al.*, 2003). Segundo Perman (1980), Lipowitz *et al.* (1985) e Boon (1997), na presença de inflamação, o coágulo de mucina se torna fraco ou irregular devida diminuição da viscosidade do LS, como observado no presente trabalho. Miller *et al.* (1974) relataram que artrites sépticas ou não-sépticas geralmente possuem coágulo de mucina fraco consequente de enzimas lipossomais liberadas de neutrófilos degenerados, corroborando com achados deste estudo.

Os coágulos de mucina foram classificados como regular em cinco animais, sendo dois em cães livres do parasito no LS (no grupo 2) e três em cães com a presença do parasito no LS (dois no grupo 2 e um no grupo 3) (gráfico 5).

Os coágulos fracos foram visualizados em nove cães com o parasito presente no LS, sendo dois do grupo 2 e sete do grupo 3.

Os coágulos classificados como muito fracos foram encontrados em apenas um cão do grupo 3. Todos os cães que apresentaram coágulo de mucina fraco e muito fraco apresentavam o parasito presente no LS (gráfico 5).

Nelson e Couto (1994) e Agut *et al.* (2003) citam que além da produção de imunocomplexos, a presença do microrganismo dentro da articulação causa uma reação inflamatória granulomatosa, resultando na formação de coágulos de baixa qualidade. Silva (2007) encontrou em seus resultados, maior número de amostras com coágulos de mucina classificados como ruins (fracos) em cães que apresentavam o parasito intra-articular, como encontrado no presente trabalho.

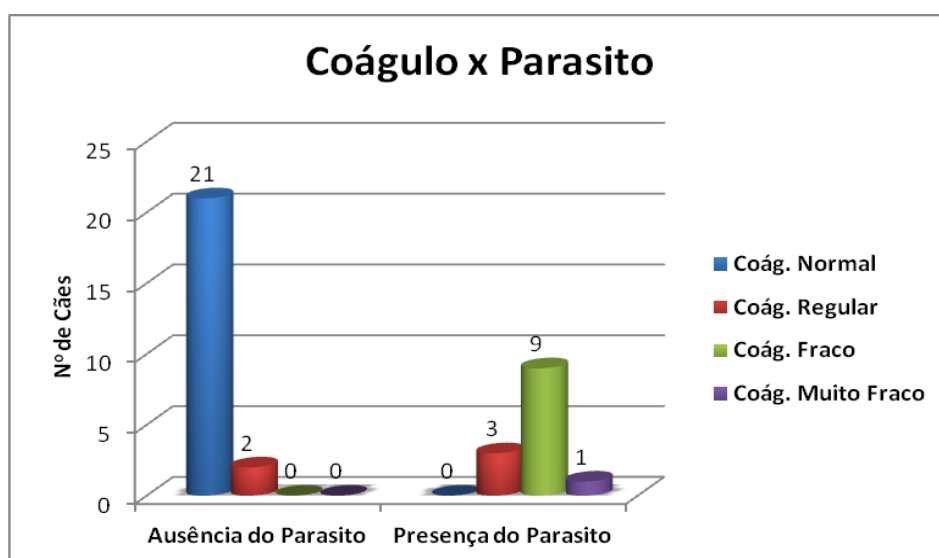


Gráfico 5. Representação gráfica do número de cães e tipos de coágulos de mucina encontrados nos cães com a presença e ausência do parasito no LS.

Na análise de comparação observaram-se correlações positivas moderadas entre coágulo de mucina no LS e as variáveis hemácias (0,540), hemoglobina (0,530), hematócrito (0,563), plaquetas (0,472), albumina (0,517) e relação A/G (0,473). São consideradas positivas, pois quando aumenta a qualidade do LS consequentemente aumenta a outra variável.

Correlações negativas moderadas foram encontradas entre o coágulo de mucina com neutrófilos (segmentados) (-0,567) no LS, uréia (-0,398) e creatinina (-0,368). São consideradas negativas, pois diminui a qualidade do coágulo de mucina quando aumenta a variável avaliada.

Na análise de correspondência, há forte correspondência da qualidade do coágulo de mucina com o grupo em que o indivíduo se encontra. Observa-se que a categoria “Normal” está mais associada ao Grupo 1, a categoria “Regular” com o Grupo 2 e “Fraco” com o grupo 3 (gráfico 6).

Na mesma análise, comprovou-se que existe associação entre a qualidade do coágulo de mucina com as variáveis viscosidade e presença do parasito no LS, ou seja, a qualidade de mucina piora quando diminui a viscosidade do LS e há presença do parasito no mesmo.

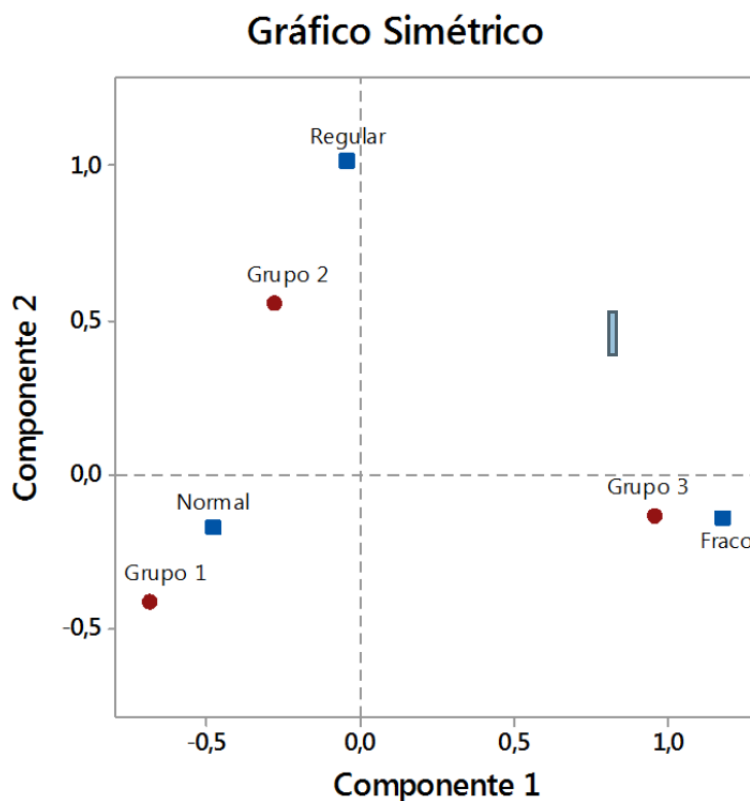


Gráfico 6. Correspondência entre grupos e categorias de qualidade da mucina do líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

6.3. Análise Hematológica

6.3.1. Eritrograma e Plaquetograma

Os valores das médias e desvios padrão para hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM, plaquetas e reticulócitos estão evidenciados na Tab. 8.

Na comparação entre grupos, para variáveis hemácias, hemoglobina e hematócrito houve diferença significativa do grupo 1 (controle) em relação aos grupos 2 e 3.

Para variáveis VCM e CHCM não houve diferença significativa entre os grupos.

A classificação da gravidade das anemias e a presença do parasito no LS nos cães dos grupos 2 e 3 de acordo com o VG (volume globular) se encontram na Tab. 9.

Os grupos 2 e 3 (positivos para leishmaniose) apresentaram valores médios no número de plaquetas inferiores ao grupo controle, como evidenciado na Tab. 8. Não houve diferença significativa entre grupos para as médias de contagem de plaquetas.

Em uma análise descritiva geral, as médias para hemácias (gráfico 7), hemoglobina, hematócrito e reticulócitos encontraram-se abaixo dos valores de referência para espécie canina nos grupos 2 e 3.

Tabela 8. Valores das médias e seus respectivos desvios padrão das variáveis eritrométicas dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

Variável	G1 (n=12)	G2 (n=12)	G3 (n=12)	Valores Referência*
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	6,89 ± 0,84 A	4,09 ± 0,78 B	3,84 ± 1,38 B	5,5 - 8,5
Hemoglobina (g/dL)	15,09 ± 2,30 A	8,71 ± 1,71 B	7,93 ± 2,96 B	12 - 18
Hematócrito (%)	46,28 ± 6,44 A	26,16 ± 5,19 B	24,2 ± 8,21 B	37 - 55
VCM (fL)	65,43 ± 4,18 A	64,27 ± 6,08 A	62,42 ± 5,55 A	60 - 77
CHCM (%)	32,58 ± 1,57 A	33,33 ± 1,14 A	33,01 ± 1,55 A	32 - 36
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	432,80 ± 115 A	238,1 ± 146,0 B	275,3 ± 194,5 AB	200-500
Reticulócitos (%)	0,42 ± 0,09 A	0,29 ± 0,09 A	0,22 ± 0,11 A	0,5 - 1,5

Valores seguidos de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa (p < 0,05).

*valores de referência propostos por Messick (2010).

Tabela 9. Número e percentual de cães que apresentaram anemia discreta, moderada e intensa e número destes que apresentavam o parasito no LS dos grupos animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

Intensidade da Anemia* (VG %)	G2		Parasito no LS		G3		Parasito no LS	
	n	%	n Presente	%	n	%	n Presente	%
Discreta (30-36%)	3	25,0	0	0,00	3	25,00	1	33,3
Moderada (20-29%)	8	66,6	3	37,5	5	41,60	4	80,0
Intensa (< 20%)	1	8,33	1	100,0	4	33,3	4	100,0

*Fonte: Jain, (1993).

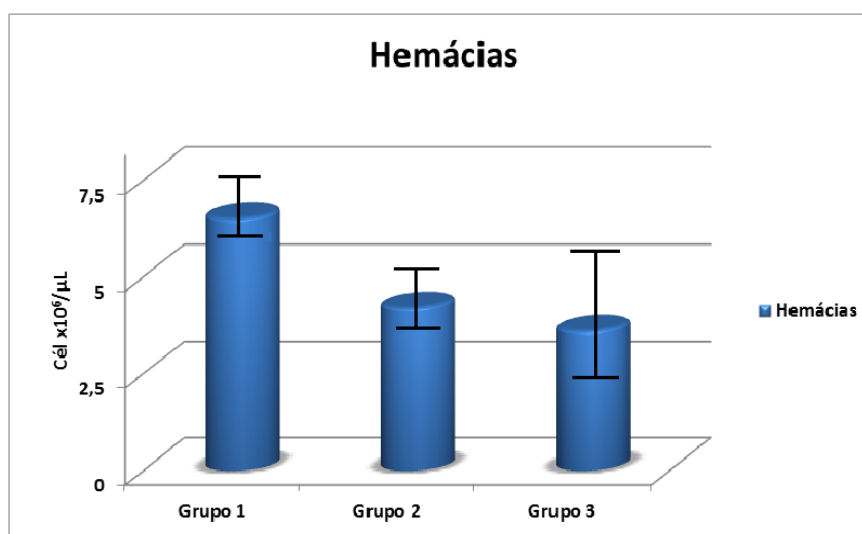


Gráfico 7. Representação gráfica da média e do desvio padrão do número de eritrócitos de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Na análise descritiva individual, foi observada anemia em 100 % dos cães positivos para LVC (grupos 2 e 3)(Tab. 8).

No grupo 2, 25% (3/12) dos cães apresentaram anemia discreta, 66,6% (8/12) anemia moderada e 8,3% (1/12) anemia intensa (Tab. 9). O parasito se encontrava no LS em 37,5% (3/8) dos cães com anemia moderada e 100% (1/1) com anemia intensa.

No grupo 3, 25% (3/12) dos cães apresentaram anemia discreta, 41,6% (5/12) anemia moderada e 33,3% (4/12) anemia intensa. O parasito se encontrava no LS em 33,3% (1/3) dos cães com anemia discreta, 80,0% (4/5) dos cães com anemia moderada e 100% (4/4) com anemia intensa.

No grupo 2 (doença moderada), observou-se anemia normocítica normocrômica em 75% (9/12) dos cães, anemia normocítica hipocrômica em 8,3% (1/12) e microcítica normocrômica em 16,7% (2/12).

No grupo 3 (doença grave), observou-se anemia normocítica normocrômica em 83,3% (10/12), anemia normocítica hipocrômica em 8,3% (1/12) e microcítica normocrômica em 8,3% (1/12) dos cães.

Mesmo que as médias se encontrassem dentro dos valores de referência para plaquetas, quando avaliados individualmente, foi observada trombocitopenia em 41,6% (5/12) dos cães do grupo 2 e 50% (6/12) dos cães do grupo 3.

A anemia é um achado frequente em animais portadores de LVC, estando presente em cerca de 50 a 70% dos cães (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Ykeda *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2012). A intensidade na redução do número de hemácias, hemoglobina e hematócrito foi maior nos animais do grupo 3, composto de animais que apresentavam quadro clínico grave. Neste mesmo grupo e no grupo 2, o hematócrito (VG) apresentou valores médios de 24,2 e 26,16% respectivamente, caracterizando uma anemia moderada. De acordo com Amusatogui (2003), Costa-Val (2004) e Freitas *et al.* (2012), a anemia está relacionada à gravidade do quadro clínico: os animais sintomáticos seriam os com menor número de hemácias, hematócrito e hemoglobina. O mesmo pode justificar que em 100% dos casos de anemia intensa havia presença do parasito no LS.

Segundo Costa-Val *et al.* (2007) a anemia normocítica normocrômica é a mais frequente nos cães portadores de LVC como visto no presente estudo. Georgetti *et al.* (2013) encontraram, na maioria dos animais, anemia macrocítica normocrômica, resultado discordante deste trabalho. Honse (2008), ao analisar alterações hematológicas de cães com leishmaniose verificou também, além de anemia normocítica normocrômica, anemias normocíticas hipocrômicas e microcíticas normocrômicas assim como neste estudo.

A anemia normocítica normocrômica pode ser justificada pela diminuição da eritropoiese decorrente de uma hipoplasia ou aplasia da série eritróide, frequente em doenças crônicas (Ciaramella *et al.*, 1997; Costa Val, 2007). Couto (2010) cita que este tipo de anemia também pode ser encontrado em cães que apresentem doença renal crônica, alterações hepáticas e doenças inflamatórias. A anemia normocítica hipocrômica e microcítica normocrômica observadas podem ser atribuídas à deficiência de ferro (Fe), vitamina B12 e ácido fólico decorrentes de enterites, desnutrição ou parasitismo intestinal (Ciaramella e Corona, 2003).

A anemia da doença inflamatória (ADI) comumente encontrada nas doenças inflamatórias crônicas também pode ter sido causa da anemia observada nos cães positivos para leishmaniose (grupo 2 e 3). O processo se dá pela produção de mediadores inflamatórios, como citocinas: interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (FNT α) e interferon gama (INF γ). Tais mediadores atuam inibindo a resposta medular e produção de eritropoietina, diminuem a meia vida das hemácias associados a danos de membrana causados por oxidantes endógenos produzidos durante o processo inflamatório e também a indisponibilidade de ferro

por macrófagos (Kent *et al.*, 1994). Dessa forma a ADI pode justificar a hipoplasia eritróide e anemias nos cães com LVC.

Outras causas de anemia seriam perda sanguínea por epistaxe, ulcerações de pele, deficiência de coagulação, diminuição da meia vida das hemácias pela produção de auto anticorpos e hemólise por lesão oxidativa e sequestro esplênico (De Luna *et al.*, 2000).

Quanto à classificação da anemia segundo a regeneração, todos os animais apresentaram produção muito baixa ou ausente de reticulócitos, como já esperado, uma vez que 75% dos cães apresentaram anemia normocítica normocrômica. Garcia-Navarro (2005) relatou que cães que apresentam anemia com ausência de resposta medular caracterizam morfologicamente uma anemia normocítica normocrômica, justificando os achados do presente trabalho.

A ausência de regeneração pode ser explicada pela presença do parasito na medula óssea, promovendo à infiltração de linfócitos, plasmócitos e macrófagos e assim, comprometendo a produção eritrocitária (Costa-Val *et al.*, 2007).

A trombocitopenia observada em alguns animais dos grupos 2 e 3 está de acordo com os resultados de Ciaramella e Corona (2003) e Costa-Val *et al.* (2007), e pode ser justificada pela presença de mecanismos imunomediados que levam à produção de anticorpos antiplaquetas e à diminuição por consumo devido a vasculite e esplenomegalia.

6.3.2. Leucograma

Os valores das médias e desvios padrão para leucócitos totais, bastonetes, segmentados, eosinófilos, monócitos e linfócitos estão evidenciados na Tab. 10.

Tabela 10. Valores das médias e seus respectivos desvios padrão das variáveis leucométricas dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

Variável	G1 (n=12)	G2 (n=12)	G3 (n=12)	Valores Referência*
Leucócitos (μL)	11,32 \pm 2,60 A	11,17 \pm 4,1 A	12,01 \pm 8,43 A	6000-17000
Bastonetes (μL)	298 \pm 153,4 A	620,4 \pm 520,5 A	658,8 \pm 430,90 A	0-300
Neutrófilos (μL)	7872 \pm 1898 A	7660,3 \pm 3708,7 A	9324,25 \pm 7704,6 A	3000-11500
Eosinófilos (μL)	496,70 \pm 243,9 A	527,5 \pm 350,53 A	431,66 \pm 392,7 A	100-1200
Monócitos (μL)	258,40 \pm 203,3 A	313 \pm 232,38 A	280,33 \pm 312,49 A	150-1350
Linfócitos (μL)	2401 \pm 1160 A	2032,4 \pm 722,5 A	2095,25 \pm 884,72 A	1000-4800

Valores seguidos de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

*valores de referência propostos por Messick (2010).

Na comparação entre grupos, para as variáveis leucócitos totais, bastonetes, segmentados, eosinófilos, monócitos e linfócitos, não houve diferença estatística entre os grupos.

Em uma análise descritiva geral, as médias para as variáveis leucócitos totais, segmentados, eosinófilos, monócitos e linfócitos se encontraram dentro dos valores de referência para espécie canina (gráfico 8). Os valores das médias para variável bastonetes encontraram-se aumentadas nos grupos 2 e 3 (positivos para leishmaniose).

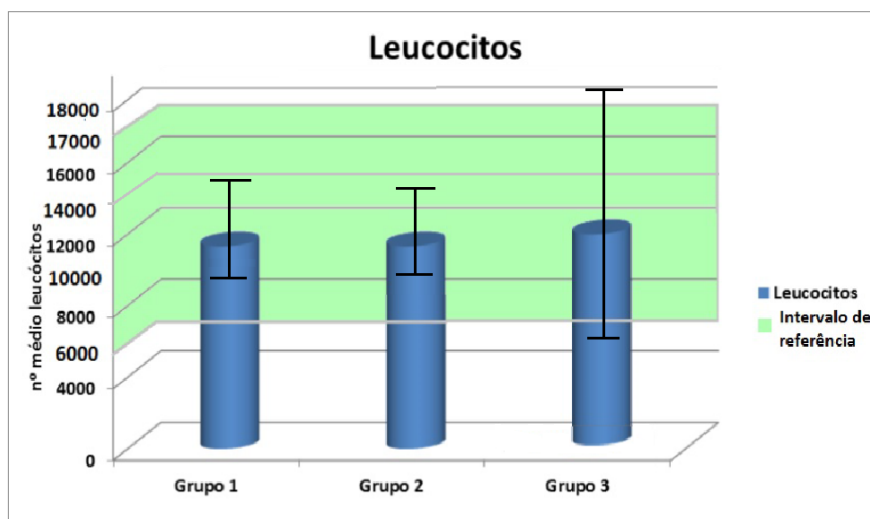


Gráfico 8. Representação gráfica da média e do desvio padrão do número de leucócitos de cães dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3). A área verde representa o intervalo de referência para leucócitos em cães (Fonte: Messick, 2010).

Em uma análise descritiva individual, observou-se que 100% (12/12) dos cães do grupo 1, negativos para LVC, apresentaram leucograma dentro da normalidade. Leucocitose por neutrofilia foi observado em 12,5% (3/24) dos cães, sendo um animal do grupo 2 e dois do grupo 3. Somente 8,3% (2/24) dos cães, apresentaram leucopenia por neutropenia, sendo um cão do grupo 2 e um cão do grupo 3.

Vários resultados referentes ao leucograma de cães portadores de LVC são relatados por diversos autores que descrevem a ocorrência de leucopenia (Noli, 1999) enquanto outros descrevem leucocitose (Ciamarella *et al.*, 1997; Feitosa *et al.*, 2000; Ykeda *et al.*, 2003). Neste estudo, a maior parte dos cães (79,2%) apresentou leucograma dentro dos intervalos de normalidade descritos por Messick (2010), estando de acordo com os achados de Costa-Val *et al.* (2007) e Honse (2008). Os valores de bastonetes aumentados indicam desvio nuclear de neutrófilos à esquerda, observados na leucocitose por neutrofilia citados.

A leucocitose por neutrofilia observada em apenas três cães corrobora com os relatos de Anosa e Idowu (1983), que citaram que a leucocitose por neutrofilia geralmente se dá por infecções bacterianas secundárias e são encontradas ocasionalmente, como também descrito nos resultados de Ikeda *et al.* (2003). Os três cães que apresentaram leucocitose por neutrofilia no presente trabalho, apresentavam também infecção cutânea bacteriana em úlceras nos cotovelos, pústulas abdominais e dermatites difusas.

A ocorrência de leucopenia em dois cães (8,3%) concorda com os resultados de Ikeda *et al.* (2003), que observaram leucopenia em somente 6,3% dos cães, e discorda de Abranches *et al.* (1991) que demonstraram leucopenia em 100% dos cães estudados.

A neutropenia encontrada neste trabalho pode ser justificada pela redução da reserva medular (hipoplasia ou depressão medular), sequestro esplênico, alta taxa de migração para os tecidos, destruição imunomediada e ao processo inflamatório grave (Ciaramella e Corona, 2003).

6.4. Bioquímica sérica

6.4.1. Perfil Hepático e proteinograma

Os valores das médias e desvios padrão para proteínas e enzimas séricas avaliadoras da função hepática de cães com LVC encontram-se na Tab. 11.

Na comparação entre grupos, para as variáveis ALT e fosfatase alcalina (FA), não houve diferença estatística entre os grupos.

Na comparação entre grupos, para as variáveis AST, proteínas totais, albumina e relação A/G houve diferença significativa entre o grupo 1 (controle) e os grupos 2 e 3.

Tabela 11. Média e desvio padrão das proteínas e enzimas séricas avaliadoras da função hepática de cães dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

Variável	Grupos			Valores de Referência*
	G 1 (n=12)	G 2 (n=12)	G 3 (n=12)	
ALT (U/L)	55,42 ± 20,09 A	70,09 ± 28,73 A	72,00 ± 38,53 A	0-110 U/L
AST (U/L)	47,42 ± 9,21 B	60,70 ± 19,18 A	71,47 ± 43,49 A	0-100 U/L
Fosfatase Alcalina (U/L)	74,00 ± 21,46 A	67,91 ± 35,98 A	71,09 ± 36,49 A	20-156 U/L
Proteínas Totais (g/dL)	6,73 ± 0,26 B	8,67 ± 2,46 A	8,80 ± 2,73 A	5,4-7,5 g/dL
Albumina (g/dL)	2,96 ± 0,27 A	2,02 ± 0,79 B	2,24 ± 0,82 B	2,3-3,1 g/dL
Globulina (g/dL)	3,69 ± 0,24 C	6,63 ± 2,94 A	6,54 ± 3,32 B	2,7-4,4 g/dL
Relação A/G	0,81 ± 0,084 A	0,29 ± 0,19 B	0,19 ± 0,09 B	0,65-1,1

Valores seguidos de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

*Fonte: Kaneko (1997).

Para a variável globulina a diferença foi significativa entre grupo 1 em relação aos grupos 2 e 3 e também entre o grupo 2 em relação ao 3.

Em uma análise descritiva geral, os valores das médias para todas as variáveis para o grupo 1 (controle) encontraram-se dentro dos valores de referência para a espécie canina.

As médias para as variáveis ALT, AST (gráfico 8) e FA encontraram-se dentro dos valores de referência para a espécie canina para os grupos 2 e 3.

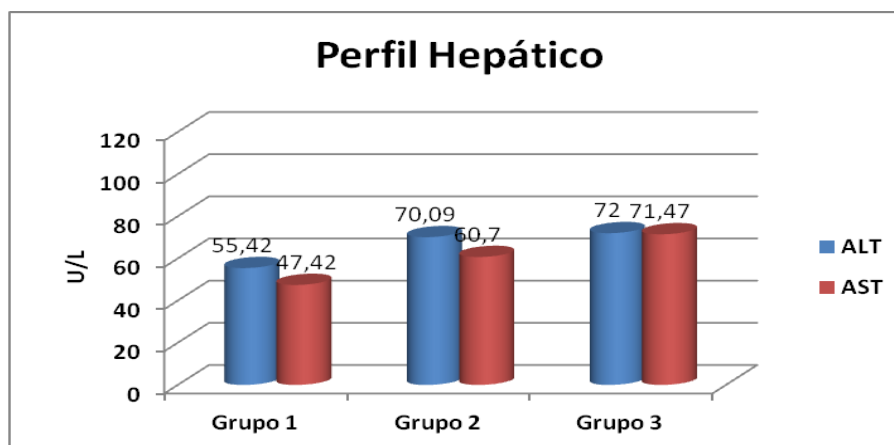


Gráfico 9. Média das enzimas séricas avaliadoras da função hepática de cães dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

Os valores das médias para proteínas totais e globulina encontraram-se acima dos valores de referência para a espécie canina nos grupos 2 e 3.

As médias para albumina e relação A/G encontraram-se abaixo dos valores de referência para a espécie canina nos grupos 2 e 3 (gráfico 10).

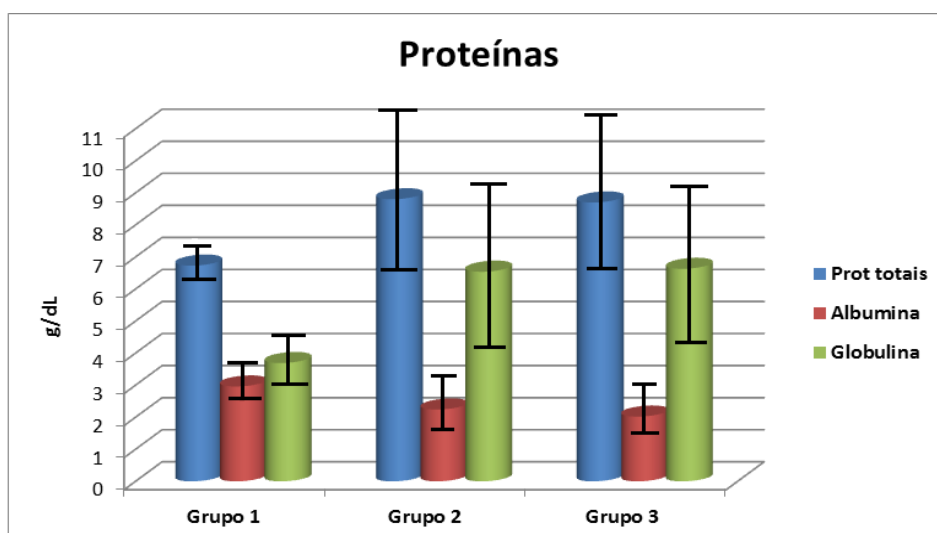


Gráfico 10. Comparação das médias e desvio padrão de proteínas totais, albumina e globulina de dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

Em uma análise descritiva individual, observou-se hiperproteinemia em 66,7% (8/12) dos cães do grupo 2 (doença moderada) e 83,3% (10/12) dos cães do grupo 3 (doença grave); hipoalbuminemia em 91,7% (11/12) dos cães do grupo 2 e 91,7% (11/12) dos cães do grupo 3. Hiperglobulinemia foi verificada em 83,3% (10/12) dos cães do grupo 2 e 91,7% (11/12) dos cães do grupo 3.

A relação albumina/globulina (A/G) encontrou-se reduzida em 100% (12/12) de ambos os grupos 2 e 3 (tabela 12), com menores valores nos animais do grupo 3 (doença grave).

Tabela 12. Comportamento das proteínas séricas e enzimas avaliadoras da função hepática dos grupos controle (G1), animais com LVC estágio II (G2) e animais com LVC estágio III (G3).

<u>Variável</u>	<u>G 1 (n=12)</u>		<u>G 2 (n=12)</u>		<u>G 3 (n=12)</u>		
	<u>n</u>	<u>%</u>	<u>n</u>	<u>%</u>	<u>n</u>	<u>%</u>	
Proteínas Totais	Aumentada	0	0,0	8	66,7	10	83,3
	Diminuída	0	0,0	0	0,0	1	8,3
	Dentro val. ref.	12	100,0	4	33,3	1	8,3
Albumina	Aumentada	0	100,0	0	0,0	0	0,0
	Diminuída	0	0,0	11	91,7	11	91,7
	Dentro val. ref.	0	100,0	1	8,3	1	8,3
Globulina	Aumentada	0	0,0	10	83,3	11	91,7
	Diminuída	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Dentro val. ref.	12	100,0	2	16,7	1	8,3
Relação A/G	Aumentada	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Diminuída	0	0,0	12	100,0	12	100,0
	Dentro val. ref.	12	100,0	0	0,0	0	0,0
ALT	Aumentada	0	0,0	4	33,3	4	33,3
	Dentro val. ref.	12	100,0	8	66,7	8	66,7
AST	Aumentada	0	0,0	1	8,3	0	0,0
	Dentro val. ref.	12	100,0	11	91,7	12	100,0
Fosfatase Alcalina (FA)	Aumentada	0	0,0	0	0,0	1	8,3
	Diminuída	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Dentro val. ref.	12	100,0	12	100,0	11	91,7

Segundo Tafuri *et al*, (1996) as alterações hepáticas encontradas na LVC associam-se com a evolução da doença em função da multiplicação das formas amastigotas nos macrófagos, e são mais comumente encontradas em cães com doença moderada a avançada, como observado neste estudo, onde o maior número de animais com alterações bioquímicas encontravam-se no grupo 3 (animais com doença grave).

As concentrações séricas de proteínas totais encontram-se consideravelmente aumentadas em cães portadores de LV, podendo ser encontrados valores superiores a 10g/dL (Ciaramella e

Corona, 2003). Neste estudo, 75% (18/24) dos cães positivos apresentaram hiperproteinemia. Destes, 72,2% apresentaram valores acima de 10g/dL, e em maior porcentagem no grupo 3. Essa elevação é atribuída ao aumento na síntese de globulinas e diminuição de albuminas.

No entanto, em alguns casos, cães positivos para LV poderão apresentar proteínas totais dentro do intervalo de normalidade, como observado em 20,8% (5/24) dos cães positivos deste estudo. Esta ocorrência pode ser explicada pela baixa de albumina acompanhada pelo aumento da globulina, que ocorre principalmente na fase crônica da infecção (Moura 2013).

Os animais com hipoalbuminemia apresentavam sinais clínicos evidentes de caquexia. A hipoalbuminemia pode ter como justificativa a anorexia, diminuição na produção de albumina por danos hepáticos, perda gastrointestinal ou perda na urina devida lesão renal (proteinúria) como encontrado nos trabalhos de Honse (2008) e Castro *et al.* (2012).

Neste estudo, o aumento dos níveis plasmáticos de globulina foi um achado frequente entre os animais infectados (91,7%) e esta proteína também apresentou aumento significativo nos resultados apresentados por Ciaramella *et al.* (1997) (70%), Koutinas *et al.* (1999)(72%) e Coutinho (2005)(56,6%). A hiperglobulinemia encontra-se associada à ativação policlonal de linfócitos B e, conseqüentemente, produção de anticorpos, principalmente β e γ globulinas (Koutinas *et al.*, 1999; Ciaramella e Corona, 2003).

Não houve diferença significativa entre os grupos para ALT. Discreto aumento foi observado em apenas 13,3% (8/12) dos cães, sendo quatro animais do grupo 2 e 4 animais do grupo 3. A baixa ocorrência de envolvimento hepático no presente estudo corrobora com os achados de Koutinas *et al.*, (1999), Kiral *et al.* (2004) e Castro *et al.* (2012). Porém no trabalho de Dias *et al.* (2008) foram descritos valores aumentados de ALT nos animais avaliados.

A diferença estatística encontrada entre grupo 1 (controle) em relação aos grupos 2 e 3 para variável AST pode ser justificada pela ausência de LVC nos animais deste grupo. Apenas um cão apresentou valor de AST muito aumentado (290 U/L) o que fez com que a média do grupo 3 se elevasse. Trata-se de uma enzima não específica do fígado, que além dos hepatócitos está presente também nas hemácias, ossos e parede intestinal (Kaneco, 1997). Dessa forma, outras alterações encontradas no indivíduo podem estar interferindo diretamente na liberação dessa enzima, já que outros parâmetros que avaliam a função hepática encontravam-se dentro da normalidade (FA e ALT). A baixa variação de valores de AST do presente estudo corrobora com resultados encontrados por Coutinho (2005) e difere dos achados de Koutinas *et al.* (1999), que detectaram aumentos de ALT e AST em cães positivos para LVC.

A semelhança entre os valores da FA nos três grupos de cães estudados corrobora com os achados de Ribeiro *et al.* (2009) e Castro *et al.* (2012), que também não encontraram variação significativa nas concentrações séricas desta enzima entre três grupos de cães doentes avaliados.

A diferença estatística para a variável relação A/G apresentada entre grupo 1 para com os grupos 2 e 3 pode ser justificada pelo fato do grupo 1 apresentar apenas cães negativos para LVC e estarem saudáveis, apresentando resultados dentro dos valores de referência. A inversão da relação A/G demonstra baixa nos valores de albumina e aumento das taxas de globulinas, observados nos grupos 2 e 3. Essa alteração se explica pelo aumento de anticorpos anti-*Leishmania* que está diretamente relacionado com a sintomatologia da doença, onde há uma relação entre o agravamento dos sinais clínicos e aumento de globulinas (Freitas, 2012). Isso

pode justificar a diferença estatística entre o grupo 2 (composto por cães com doença moderada) e grupo 3 (composto por cães com doença grave), tendo este último apresentado menores médias de relação A/G. Esses achados corroboram com os resultados de Giunchetti *et al.* (2008), que compararam a relação A/G entre animais com variados sinais clínicos e observaram valores mais baixos da relação nos animais sintomáticos. Baixas médias da relação também foram descritas por Amusatogui (2003) e Castro (2012).

6.4.2. Perfil Renal

Os valores médios (médias e medianas) e desvios padrão para uréia e creatinina encontram-se na Tab.13.

Tabela 13. Valores das médias e desvio padrão das dosagens séricas de uréia e creatinina de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Variável	G1	Grupos G2	G3	Valores de referência*
Uréia (mg/dL)	40,01±11,3 B	37,52±16,6 B	89,75±43,4 A	20-56
Creatinina (mg/dL)	0,98 ± 0,15 B	0,79 ± 0,34 B	1,87 ± 0,73 A	0,5-1,5

Valores seguidos de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

*Fonte: Kaneko (1997).

Na comparação entre grupos, para as variáveis uréia e creatinina, houve diferença estatística significativa entre os grupos 1 e 3 e entre grupos 2 e 3.

Em uma análise descritiva geral, as médias para as variáveis uréia e creatinina dos grupos 1 e 2 encontram-se dentro dos valores de referência para a espécie canina. Os valores para o grupo 3 encontram-se acima dos valores de referência para a espécie.

Em uma análise descritiva individual, a uréia apresentou-se aumentada em 41,6% (10/24) dos cães, sendo um cão do grupo 2 (doença moderada) e nove do grupo 3 (doença grave). Os valores de creatinina encontraram-se dentro da normalidade em 100% dos cães do grupo 2 e aumentada em 75% (9/12) dos cães do grupo 3 (tabela 14).

Tabela 14. Valores absolutos e relativos de cães que apresentaram valores de uréia e creatinina aumentados, e diminuídos nos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Variável		Grupos					
		G 1 (n=12)		G 2 (n=12)		G 3 (n=12)	
		n	%	n	%	n	%
Uréia (mg/dL)	Aumentada	0	0,0	1	8,3	9	75,0
	S/alteração	12	100,0	11	91,6	3	25,0
	Diminuída	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Creatinina (mg/dL)	Aumentada	0	0,0	0	0,0	9	75,0
	S/alteração	12	100,0	12	100,0	3	25,0
	Diminuída	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Os valores médios de uréia e creatinina não apresentaram elevações no grupo 1 por se tratar de animais saudáveis, e no grupo 2, por serem cães que apresentavam doença moderada.

A diferença estatística entre os grupos 1 e 3 e entre os grupos 2 e 3 pode ser explicada pelo estágio da doença em que esses animais se encontram. Os do grupo 3 encontravam-se em estágio mais avançado (doença grave) quando comparados ao grupo 2 (doença moderada) e controle (negativos), apresentando elevação dos valores de uréia e creatinina em relação aos demais. Resultado semelhante foi obtido por Ciaramella *et al.* (2004) e Coutinho (2005) que observaram, ao avaliar grupos de cães com diferentes manifestações clínicas, elevação discreta nos níveis de uréia naqueles com sintomatologia mais avançada, divergindo das médias encontradas entre os animais com quadro leve e moderado.

Os aumentos de uréia e creatinina observados nos cães do grupo 3 (gráficos 11 e 12) podem ser justificados pela nefrite intersticial e glomerulonefrite associadas ao depósito de imunocomplexos nos rins desses animais (Ciaramella *et al.*, 1997). Xavier (2002) observou que os valores de uréia sérica encontravam-se mais elevados nos cães sintomáticos quando comparados aos assintomáticos e oligossintomáticos.

Os dois grupos de animais positivos para LVC diferenciaram-se nos resultados, e quase todas as alterações na variável creatinina foram visualizadas no grupo 3. O estadiamento dos cães (estádios II e III para os grupos 2 e 3, respectivamente), foi baseado na observação dos valores desta variável, conforme sugerido por Solano e Gallego (2011). Estes autores descrevem que animais do estágio II devem apresentar creatinina abaixo de 1,4 mg/dL e animais do estágio III, creatinina entre 1,4-2 mg/dL.

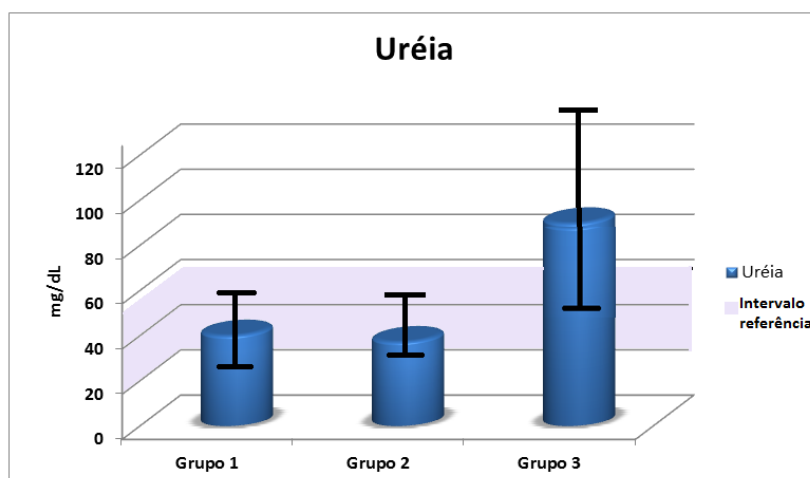


Gráfico 11. Comparação das médias e desvio padrão da uréia de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3). Área sombreada representa intervalo de referência para uréia de acordo com Kaneco *et al.*, (1997).

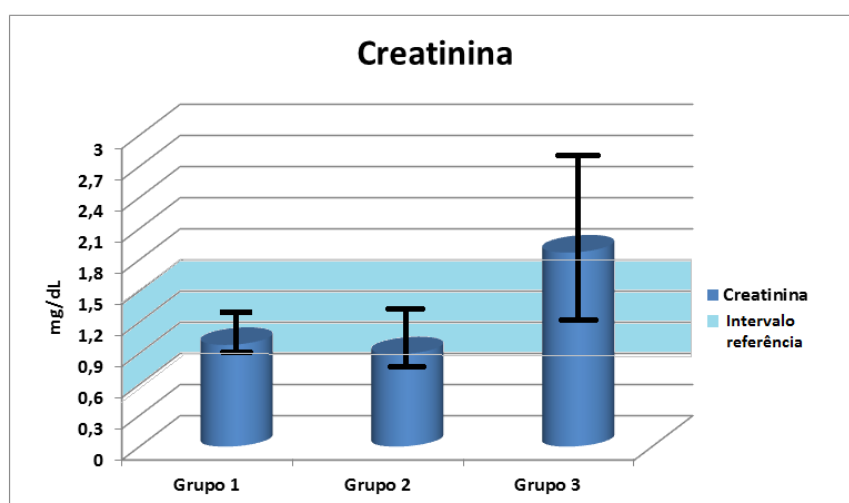


Gráfico 12. Comparação das médias e desvio padrão da creatinina de cães dos grupos controle (G1), animais estágio II (G2) e animais estágio III (G3). Área sombreada representa intervalo de referência para creatinina de acordo com Kaneco *et al.*, (1997).

6.4.3. Urinálise

6.4.3.1. Densidade e pH

Os valores das médias e desvios padrão para densidade urinária e pH estão evidenciados na Tab. 15.

Em uma análise descritiva geral as médias para densidade e pH urinários encontravam-se dentro dos valores de referência para espécie canina em todos os grupos.

Tabela 15. Valores médios e seus respectivos desvios padrão da densidade e pH urinários de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Variável	Val. Referência*	Grupos		
		G1 (n=12)	G2 (n=12)	G3 (n=12)
Densidade urinária	1,015-1,045	1,028 ± 0,0055	1,025 ± 0,0060	1,019 ± 0,0093
pH urinário	6,0-7,5	6,70 ± 0,81	7,38 ± 0,83	7,33 ± 0,86

* Fonte: Adaptado de Stockham e Scott (2011)

Em uma análise descritiva individual para densidade urinária, um cão (8,3%) no grupo 2 e seis cães (50%) no grupo 3 apresentaram densidade abaixo dos valores de referência.

A densidade é um importante indicador da capacidade de concentração urinária. Em animais saudáveis que não apresentem sinais de alteração renal, como cães do grupo 1, irá variar conforme a hidratação corporal e o consumo de fluidos (Kaneko, 1997). A densidade deve ser avaliada sempre em conjunto com outros parâmetros para classificar um animal como doente renal, como dosagens de creatinina e relação proteína/creatinina urinárias (rPCU), pois pode sofrer alterações por ação de drogas, como corticoides e diuréticos e doenças secundárias que desenvolvem poliúria e polidipsia e desidratação (Garcia-Navarro, 2005). Valores de densidade entre 1,008 e 1,012, como encontrados nos cães dos grupos 2 e 3 (1,010-1,013), indica que a osmolalidade urinária é igual a plasmática e os classificam como isostenúricos sugerindo lesão renal (Kaneko, 1997). Segundo Stockham e Scott (2010), baixos valores de densidade (1,007–1,013) indicam fortemente capacidade de concentração renal prejudicada e se houver azotemia, podem indicar insuficiência ou falência renal. Os valores encontrados nesse estudo corroboram com Braga (2012) que encontrou resultados de densidades abaixo dos valores de referência em 61,7% dos cães analisados.

Em uma análise descritiva individual para pH urinário, cinco cães (41,6%) do grupo 2 e sete cães (58,3%) do grupo 3 apresentaram pH acima dos valores de referência.

O pH urinário não necessariamente apresenta os mesmos valores que o pH sanguíneo e pode sofrer influência da alimentação, presença de infecção bacteriana e tempo de armazenamento/retenção (kaneco, 1997). Existem outras evidências nestes animais, como baixas densidades, aumento de creatinina, proteinúria e baixa rPCU que sugerem presença da lesão renal. Foram encontrados na urina desses cães, bactérias em quantidades moderadas a aumentadas indicando infecção urinária (tabela 16). Não foi realizada urocultura, porém existe possibilidade da presença de bactérias produtoras de urease (*Proteus* sp. e *Staphylococcus* sp., por exemplo) causando degradação ou hidrólise da uréia em amônia alcalinizando a urina. Essa degradação também pode ocorrer espontaneamente com a realização tardia da urinálise.

Tabela 16. Valores absolutos e relativos do exame do sedimento urinário (bactérias/campo) de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Grupo (n= 12)	Bacteriúria							
	Ausente		Raras (+)		Moderada (++)		Aumentada (+++)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
G 2	4	33,3	1	8,3	3	25,0	3	25,0
G 3	1	8,3	0	0,0	7	58,3	2	16,7

6.4.3.2. Hematúria e leucocitúria

A análise descritiva individual para as variáveis hematúria e leucocitúria está representada na Tab. 17.

Tabela 17. Valores absolutos e relativos do exame do sedimento urinário (hemácias e leucócitos/campo) de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Grupo (n= 12)	Hemácias						Leucócitos					
	5-15		16-40		41-100		5-10		11-25		26-50	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
G 1	2	25,0	0	0,0	0	0,0	2	16,6	0	0,0	0	0,0
G 2	6	50,0	1	8,3	2	16,7	4	33,3	2	16,6	1	8,3
G 3	8	66,7	1	8,3	1	8,3	4	33,3	3	25,0	1	8,3

Presença de hemácias em um pequeno número de cães do grupo 1 (2/12) e em quantidades não significativas podem ser provenientes da cateterização da uretra, dependendo do quão traumático for o procedimento. Segundo Kaneco (1997) hemácias e leucócitos podem ser encontrados na urina de mamíferos sadios (< 5 céls).

A presença de hemácias no sedimento urinário em nove cães (75%) no grupo 2 e dez cães (83,3%) no grupo 3 (Tab. 17) pode indicar a presença de hemorragia em alguma área do sistema urogenital, embora o local não possa ser definido. Também podem ser provenientes da cateterização da coleta (Trall, 2007). A hematúria pode também indicar lesões vasculares decorrentes de traumas, inflamações e/ou infartos renais e infecções do trato urinário (Stockam e Scott, 2011).

A presença de leucócitos na urina de sete (58,3%) cães do grupo 2 e oito (66,7%) do grupo 3 (Tab. 17) pode indicar, como descrito anteriormente em relação às hemácias, hemorragia ou inflamação do trato urogenital também não sendo possível a identificação do local (Trall, 2007; Stockam e Scott, 2011).

6.4.3.3. Proteinúria

A análise descritiva individual para variável proteinúria está descrita na Tab. 18.

Tabela 18. Número e porcentagem de cães que apresentaram proteinúria (+/++/+++) dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Grupo	-	Proteinúria					
		+		++		+++	
		n	%	n	%	n	%
G 1	11	1	8,3	0	0,0	0	0,0
G 2	0	3	25,0	6	50,0	3	25,0
G 3	0	1	8,3	4	33,3	7	58,3

Dentre as alterações químicas da urina dos animais positivos para LV, foi observada presença de proteína na urina em 100% (12/12) dos cães do grupo 2 e 100% (12/12) do grupo 3 (Tab. 18). Já no grupo 1 (cães negativos) foi visualizada apenas em 8,3% (1/12) dos cães.

No grupo 1 apenas um cão apresentou proteinúria discreta. Dentre os cães do grupo 2 (doença moderada), três (25%) apresentaram uma pequena quantidade (proteinúria discreta), representada por + (equivalente a 30mg/dL), seis (50%) apresentaram proteinúria moderada, representada por ++ (equivalente a 100mg/dL) e três (25%) apresentaram grande quantidade (proteinúria grave), representada por +++ (equivalente a 300mg/dL) (Tab. 18)(gráfico12).

No grupo 3 (doença grave), apenas um cão (8,3%) apresentou proteinúria discreta (+), quatro cães (33,3%) proteinúria moderada (++) e sete cães (58,3%) proteinúria grave (+++) (gráfico 13).

A proteinúria é a alteração mais frequentemente descrita, sendo encontrada em 71 a 100% dos cães portadores da LVC, independente do estágio da doença (Nieto *et al.*, 1992; Koutinas *et al.*, 1999). Em alguns casos, como no grupo 1, pode-se apresentar de forma discreta, devido ao aumento da celularidade na urina, seja por sedimentos, hemácias ou espermatozoides. Devido a essa capacidade de interferência por fatores relacionados às características físico-químicas da urina, sempre deve-se correlacionar o achado de proteinúria com parâmetros de densidade urinária e análise de sedimentos (Koutinas *et al.*, 1999). Segundo Costa *et al.* (2003) a intensidade da proteinúria é mais grave quanto pior forem as alterações patológicas. Dessa forma observa-se que o número de cães com proteinúria grave é maior no grupo 3 quando comparado ao 2 por apresentar cães em estágio grave da doença. A perda de proteína na urina pode ser secundária à glomerulonefrite causada pela deposição de imunocomplexos nos

glomérulos (Braga, 2012). De fato, uma das primeiras consequências da glomerulonefrite é a perda urinária de proteínas plasmáticas, como a albumina, devido a alterações de permeabilidade da membrana basal glomerular (Nelson e Couto, 2001).

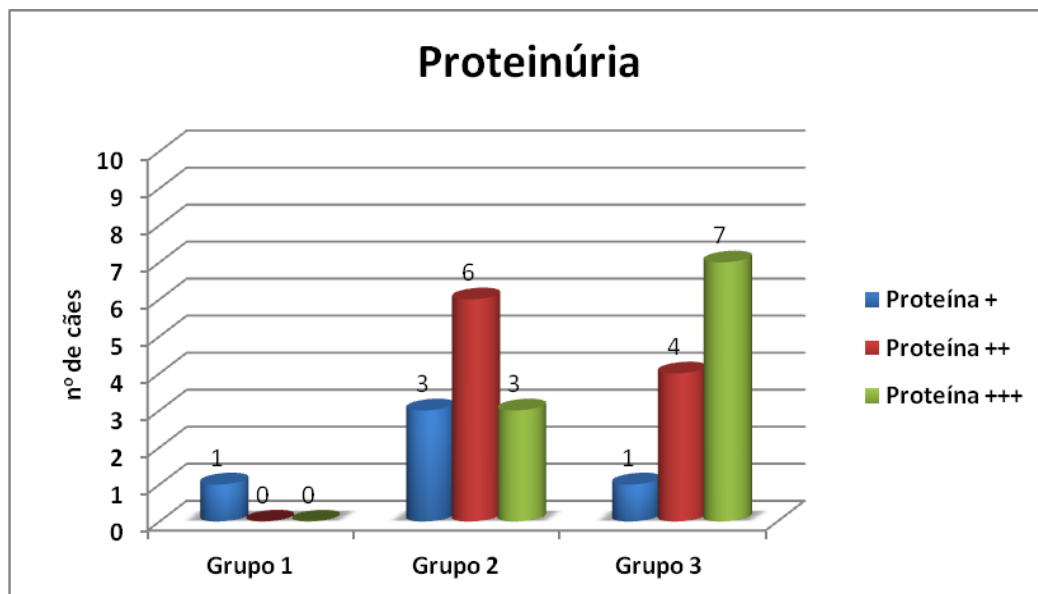


Gráfico 13. Número de animais que apresentaram proteinúria (+/++/+++) na avaliação bioquímica da urina de cães dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

6.4.3.4. Cilindrúria

A análise descritiva individual para cilindros na urina está representada na Tab. 19.

Tabela 19. Valores absolutos e relativos do exame do sedimento urinário (cilindros hialinos, granuloso) de cães dos grupos animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Grupo	Quantidade	Cilindros			
		Hialinos		Granulosos	
		n	%	n	%
G2	Aumentada >8 cil/camp	4	33,3	4	33,3
G3	Aumentada >8 cil/camp	7	58,3	7	58,3

A presença de cilindros hialinos e granuloso esteve aumentados em 33,3% dos cães (4/12) do grupo 2 e 58,3% (7/12) dos cães do grupo 3.

Os cilindros hialinos são estruturas resultantes do extravasamento de proteínas pela membrana glomerular. Em pequenas quantidades não indicam patologia renal e podem ser encontrados na urina de cães saudáveis. Indicam lesão glomerular significativa, quando presentes em grandes quantidades, e podem estar associadas a proteinúria achado comum no presente estudo. Os achados deste trabalho corroboram com Albuquerque *et al.* (2014) que em estudo de alterações estruturais de rins de cães, naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, encontraram os mesmos 58,3% dos cães com a presença de cilindros hialinos secundários à lesão glomerular. Da mesma forma que o observado com a proteinúria, quanto pior o estágio da doença, maior o número de cilindros e mais grave as lesões renais (Braga, 2012).

Os cilindros granulosos se formam a partir da degradação celular e refletem necrose ou inflamação dos túbulos renais, e em pequeno número pode também ser encontrado na urina de cães saudáveis (Stockham e Scott, 2011). A cilindrúria presente nos grupos 2 e 3 pode indicar injúria renal, mas não necessariamente uma insuficiência. A presença de cilindros granulosos na urina não é capaz de discriminar doença glomerular, intersticial ou tubular (Kaneco, 1997).

7. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este estudo e de acordo com os resultados obtidos, podem ser apresentadas as seguintes conclusões para cães com leishmaniose visceral da região metropolitana de Belo Horizonte:

- A viscosidade e a qualidade do coágulo de mucina estão diminuídos nos cães positivos para leishmaniose visceral, sendo mais evidentes nos que apresentam o parasito no líquido sinovial.
- Animais positivos para LVC apresentam no LS, aumento de polimorfonucleares, sobretudo neutrófilos.
- Formas amastigotas são visualizadas no LS dos animais positivos para leishmaniose e em maior frequência nos animais classificados no estadiamento III ou doença grave.
- Os achados laboratoriais mais frequentes nos cães positivos para LVC são anemia normocítica normocrômica, hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, diminuição da relação albumina, globulina e proteinúria. Estes achados são mais intensos nos animais com doença grave.
- Cães positivos para LVC com o parasito presente no LS apresentam anemia, plaquetopenia e baixa relação A/G.
- Os valores de uréia e creatinina apresentaram-se com alterações significativas nos animais com doença grave (G3) sendo muito importante no estadiamento da doença.
- A proteinúria é a alteração mais frequente nos cães com leishmaniose visceral independente do estágio da doença.
- Este trabalho destaca a viabilidade da avaliação do LS para auxílio no diagnóstico parasitológico e prognóstico de leishmaniose em cães sintomáticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G. *et al.* An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.13, n.5, p. 537-550, 1991.
- AFONSO, M., ALVES-PIRES, C. Capítulo II: bioecologia dos vectores. In G. M. Santos- Gomes & I. M. Pereira da Fonseca, *Leishmaniose canina*. p. 27 – 40. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A, 2008.
- AGUT, A.; CORSO, N.; MURCIANO, J.; LAREDO, F. G.; SOLER, M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec.*, v. 153, n. 21, p. 648-652, 2003.
- ALEXANDRE-PIRES, G.M. CORREIA, J.J. Capítulo IV: patogenia e lesões da leishmaniose canina. In G. M. Santos-Gomes & I. M. Pereira da Fonseca, *Leishmaniose canina*. p. 53 – 68., Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A, 2008.
- ALENCAR, J. E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (calazar). In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991. 706-717.
- ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, Londres, v.57, p. 1-88, 2004.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. v. 5, n. 7, 2012.
- AMUSATEGUI, I. *et al.* Distribution and relationships between clinical leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*, v. 18, p. 147-156, 2003.
- ANDRADE, A.M.; QUEIROZ, L.H.; NUNES, G.R.; PERRI, S.H.V.; NUNES, C.M. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 5, p. 594-595, 2007.
- ANDRADE, A.L.; SANTO, E.F.E.; SAKAMOTO, S.S.; LIMA, L.K.F.; LUVIZOTTO, M.C.R. Citologia de impressão da superfície ocular de cães infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. *Archives of Veterinary Science*, v.14, n.1, p.9-16, 2009.
- ASHFORD R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* n.14, p. 523-532, 1996.
- ANOSA, V. O.; IDOWU, A. L. The clinico-hematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigéria. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B*, v. 30, n.8, p.600-608, 1993.
- AZEVEDO, E. M. R.; LINHARES, G. F. C.; DUARTE, S. C.; JAYME, V. D. S.; OLIVEIRA, H. F.; OLVEIRA, V. F. Leishmaniose visceral canina em cão de Caldas Novas, Goiás. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17, Supl. 1, p. 339-341, 2008.
- BANETH, G., SOLANO-GALLEGO, L. Canine leishmaniosis. In C.E. Greene, *Infectious diseases of the dog and cat*. 4 ed. p. 735 - 745. Missouri, USA: Elsevier Saunders, 2012.
- BARNABÉ, P. A.; CATTELAN, J. W; CADIOLI, F. A. *et al.* Características físico químicas e citológicas da bairna tendínea digital de equinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n. 3, p. 288-294, 2005.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37, p. 1097 – 1106, 2007.
- BELO HORIZONTE. Gerência de Zoonoses. Informações sobre Leishmaniose Visceral 2014. Disponível em http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&lang=pt_BR&pg=5571&tax=41517. Acesso em: 16 de mai. 2014.
- BENASSI, J. C. Detecção de *Leishmania spp.* por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos. *Dissertação de mestrado*, Pirassununga, São Paulo, 2015.

- BENITES, A. P.; FERNANDES, C. E.; BRUM, K. B.; ABDO, M. A. G. S. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. *Pesq. Vet. Bras.* N. 31, p. 72-77, 2011.
- BENVENGA, G.U. Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo. 2013. F 101. *Dissertação de Mestrado* – Faculdade de Med. Vet. e Zootecnia, Univ. de São Paulo, São Paulo, 2013.
- BERN, C. *et al.* Of cattle, sand flies and men: a systematic review of risk factor analyses for South Asian visceral leishmaniasis and implications for elimination. *PLoS neglected tropical diseases.* v.4, n. 2, p. 599, 2010.
- BEVILACQUA, L.; MAIA, C. A. A.; ZANETTI, M. F. *et al.* Ocorrência de osteoartrite em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. In: Congresso Paulista de Clínicos de pequenos animais, 2., *Anais.* p. 10, São Paulo, 2002.
- BOON, D. Synovial fluid analysis: a guide for small-animal practitioners. *Veterinary Medicine*, v.92, n.9, p.804-810, 1997.
- BOURDOISEAU, G. *et al.* Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* v.56, n.3-4, p. 345-351, 1997.
- BRAGA, E. T. Hipertensão arterial sistêmica e sua correlação com as lesões renais de cães naturalmente acometidos por Leishmaniose Visceral. 2012. f.82. *Dissertação* (Fisopatologia médica e cirúrgica)-Faculdade de medicina veterinária – UNESP, Araçatuba.
- BRAZIL R.P., BRAZIL B.G. Biologia de flebotomíneos neotropicais/Biology of phlebotominae neotropics. In: *Rangel E. F. e Lainson R. editors.* Flebotomíneos do Brasil. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 257-274, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral.* Brasília, p. 120, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.* 2. ed. atualizada. Brasília: p. 180, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Municipal de Saúde (GECOZ/GVSI/SMSA). 10 perguntas e respostas sobre leishmaniose visceral. *Cartilha leishmaniose visceral.* Belo Horizonte. p. 7, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Aspectos epidemiológicos. 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_obitos_05_09_11.pdf>. Acesso em: 25 set. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral: Descrição da doença. Brasília. Disponível em: www.saude.gov.br. Acesso em: 20 maio 2015.
- BOURDOISEAU, G. *et al.* Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* v.56, n.3-4, p. 345-351, 1997.
- BURACCO, P.; ENFRAQUEÇA, O.; GUGLIELMINO, R. *et al.* Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in dog. England. *Small Anim. Pract.*, v. 38, n.1, p. 29-30, 1997.
- CASTRO, I. P.; SOUZA, M. V. C.; MAGALHÃES, G. M. *et al.* Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. *Biosci. J.*, v. 28, n. 5, p. 799-804, 2012.
- CHAVES, R. O.; BECKMANN, D. V.; COPAT, B. *et al.* Poliartrite em cães-27 casos (2007-2013). *Ciência Rural*, v. 45, n. 3, p. 533-539, 2015.
- CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, v. 141, p. 539-543, 1997.

- CIARAMELLA, P. CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. *Compendium of continuing Education for the Practicing Veterinarian*. n. 25, p. 358-368, 2003.
- CLEMENTS, D. N. *et al.* Type I immune-mediated polyarthritis in dogs: 39 cases (1997-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 224, n.8, p. 1323-1327, 2004.
- COLOMBO, F. A. Detecção de RNA de *Leishmania infantum chagasi* em pulgas e carrapatos coletados de cães naturalmente infectados e a padronização de uma PCR em tempo real para diagnóstico e diferenciação de espécies de leishmania. *Tese de doutorado*, São Paulo, 2012.
- CORREIA, W. M.; CORREIA, C. N. M. *Enfermidades infecciosa dos mamíferos domésticos*. 2ed. p. 718-720. Rio de Janeiro-RJ: Médica e científica, 1992.
- COSTA, F.A.L. *et al.* Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology*. n. 40, p. 677-684, 2003.
- COSTA, L.N. G. *et al.* Evaluation of PCR in the diagnosis of canine leishmaniasis in two different epidemiological regions: Campinas (SP) and Teresina (PI), Brazil. *Epidemiology and Infection*, v.7, 2014.
- COSTA-VAL, A. P. Tratamento da leishmaniose visceral canina com antimonial encapsulado em lipossomas. 2004. f.125. Tese (Doutorado Ciência Animal)- Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COSTA-VAL, A. P. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J*, v. 3, n. 17, p. 636-643, 2007.
- COUTINHO, J. F. V. Estudo clínico-laboratorial e histopatológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* com diferentes graus de manifestação física. 2005. f. 102 Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- COUTINHO, M.T.Z.; LINARDI, P.M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet. Parasitol.*, v.165: p.150-154, 2009.
- COUTO, C.G. Hematologia. In: NELSON e COUTO. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 1470p.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop*. São Paulo. v. 3, n.48, p. 151-156, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in South America. *Parasites & Vectors*, v. 2, Suppl. 1, p. 1-8, 2009.
- DE ARRUDA. Leishmanioses. In: ____ *Manual de zoonoses*. 2ed. v.1, p. 90, Paraná, 2010. Disponível em: <http://www.zoonoses.org.br/zoonoses> Acesso em 04 abr. 2015.
- DE BIASI, F.; RAHAL, S.C.; LOPES, R. S. *et al.* Alterações no líquido sinovial do joelho de cães com osteoartrite induzida pelo modelo Pond e Nuki. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. v. 53, n. 5, p. 563-567, 2001.
- De Luna R, Ferrante M, Severino L, Ambrosio R, Piantedosi D, Gradoni L, Lucisano A, Persechino A. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. *J Comp Pathol*. n. 2-3, v. 122, p. 213-216, 2000.
- DIAS, E. L.; BATISTA, Z.S.; GUERRA, R.M.S.N.C.; CALABRESE, K.S.; LIMA, T.B.; ABREU-SILVA, A. L. Canine Visceral Leishmaniasis (CvL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil, *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 9, n. 3, p. 740-745, 2008.
- ELLISON, R. S. The cytologic examination of synovial fluido. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery: Small Animal*, v. 3, p. 133-139, 1988.

- FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R. *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no Município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Rev. Clín. Vet.*, v. 5, n.28, p. 36-44, 2000.
- FERNANDES, P.J. Análise de líquido sinovial. In: CROWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos. 3ed. São Paulo: MedVet, 2009. p. 193-209.
- FERNANDEZ, F. R. *et al.* Synovial fluid analysis: preparation of smears for cytologic examination of canine synovial fluid. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 19, p. 727-734, 1983.
- FISA, R.; RIERA, C.; GALLEGO, M. *et al.* Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary parasitology*, v. 99, n. 2, p. 105-111, 2001.
- FISHER, J. D. In: Sistema músculo esquelético. *Atlas de citologia de cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 12, p 265 a 274.
- FONT, A.; MASCORT, J.; ALTIMIRA, J. *et al.* Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. *J Small Anim Pract.* n. 175, p. 199-201, 2004.
- FORATTINI, O.P. *et al.* Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Púb S Paulo*. n.6, p. 255-261, 1972.
- FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. *et al.* Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania spp.* *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, p. 24-29, 2012
- FREITAS, M. S. Investigação de *Leishmania sp* em carrapatos de cães de bairros de Imperatriz MA, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Dissertação de mestrado*, Imperatriz-MA, 2012.
- GAMA, A. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in a horse from northern Portugal. *Veterinary Parasitology*, v. 24, p. 189-192, 2014.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K. *Manual de Hematologia Veterinária*. 2ª.ed. São Paulo: Varela, 2005, 206 p.
- GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. 1993. f. 202 *Tese (Doutorado em parasitologia)*- Instituto de Ciências Biológicas, Univ. Fed. de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
- GEORGETTI, E. D. S.; SANTOS, H. D.; MINHARRO, S. Alterações hematológicas em cães positivos para *Leishmania spp.* na microrregião de Araguaína – TO. In: Seminário de iniciação científica, 9. p. 4-5, Universidade Federal de Tocantins, 2013.
- GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M. *et al.* Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis, *Research in Veterinary Science*, London, v. 84, n. 2, p. 269-277, 2008.
- GOMES, Y.M.; PAIVA, C.M., LIRA, R.A. *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet j*, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.
- GOMES, P.I.S. Detecção da Infecção da *Leishmania spp* em gatos da área Metropolitana de Lisboa, através de técnicas de diagnóstico serológico (IFI e Elisa) e de uma técnica molecular (qPCR) aplicadas a células conjuntivais e a sangue. *Dissertação de Mestrado*, Lisboa/ Portugal, 2015.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v.7, n3, p.338-349, 2004.
- GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniasis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*. 181, p. 23 – 30, 2011.

- GUERRA, L.L., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R.C, *et al.* Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* n. 104, p. 611-622, 2009.
- HONSE, C.O. Alterações hemostáticas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes de inquéritos sorológicos realizados pela Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro. 2008. 113f. Dissertação (Mestrado em pesquisa clínica de doenças infecciosas) Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Rio de Janeiro.
- HUBALEK, Z. RUDOLF, I. Chapter 8: systematic survey of zoonotic and sapronotic microbial agents. *In Microbial Zoonoses and Saprozoonoses.* p. 280 - 282. New York, USA, 2011.
- JACQUES, D. *et al.* A retrospective study of 40 dogs with polyarthritis. *Veterinary Surgery*, v. 31, n.5, p.428-434, 2002.
- JAIN, N. C. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea e Febiger; 1993.
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia veterinária.* 6. ed. São Paulo: Manole, p. 599, 2000.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L.; Appendix IX. Blood Analyte Reference Values in Small and Some Laboratory Animals. *In. Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 6 ed. London. Elsevier. 1997. p. 889 – 995.
- KENT, S.; WEINBERG, E. D.; STUART-MACADAM P. The etiology of the anemia of chronic disease and infection. *J Clin Epidemiol.* n.47, p. 23-33, 1994.
- KERR, M. Exames laboratoriais em medicina veterinária - Roca, 2003.
- KIRAL, F. K.; SEYREK, K.; PASA, S. *et al.* Some haematological, biochemical and electrophoretic findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Revue Médecine Vétérinaire*, Toulouse, v. 155, n. 4, p. 226-229, 2004.
- KOUTINAS, A.F.; POLIZOPPOULOU, Z.S. *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J.Am Anim Hosp Assoc* n. 35, p. 376-383, 1999.
- KUHLS, K. *et al.* Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recente old world origin. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v. 5, e1155p., 2011.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 5, n. 64. P. 654-667, 1970.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniasis of the New World: taxonomia problems. *Br Med Bull.*n. 28, p. 44-48, 1972.
- LAVERAN, C. L. A.; MESNIL, F. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lou. Et mean) Parasite dune fièvre dínde. *C. R. Hebd. Acad. Sci.*,n. 137, p. 957-961, 1903.
- LEÃO, N. R. Q. Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque Amazônico. Rio de Janeiro: Cepuj Instituto Evandro Chagas. p. 885. 1997.
- LEITE, R. S. *et al.* Evaluation of conjunctival swab as a mass-screening tool for molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology research*, v. 114, n. 6, p. 2255-2262, 2015.
- LEMOS, E.M. , LAURENTI, M.D.; MOREIRA M.A.B. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop.* v. 2, n. 107, p. 205–207, 2008.

- LIPOWITZ, A. J.; WONG, P. L.; STEVENS, J. B. Synovial membrane changes after experimental transection of the cranial cruciate ligament in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 46, p. 1166-1170, 1985.
- LOPES, S. T. A.; MACIEL, R. M.; FRANCISCATO, C. *et al.* Reticulócitos e hematócrito de cães pré e pós esplenectomia parcial. *Ciência Rural*. v. 36, n. 3, p. 1000-1003, 2006.
- LOPEZ, R. *et al.* Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Medicine B*.[s.n.], v. 43, p. 469-474, 1996.
- LUVIZZOTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados por leishmaniose visceral canina. Fórum sobre leishmaniose visceral canina 1. Anais... Jaboticabal 2006.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*. v.4, n. 158, p. 274-287, 2008.
- MAIA, C. *et al.* Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*.v. 179, n.1, p. 142-144, 2009.
- MANNA, L. *et al.* *Leishmania* DNA quantification by real time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Annals of New York Academy of Sciences*. v. 1149, p. 358-360, 2008.
- MANCIANTE, F. *et al.* Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society, of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.
- MARGONARI C.; FREITAS C.R.; RIBEIRO R.C.; MOURA A.C. M, *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 1, n. 101, p. 31-38, 2006.
- MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet Entomol*, n. 27, p. 123-147, 2013.
- MAURICIO, I. L. *et al.* The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.
- MACWILLIAMS, P.S; FRIEDRICH, K. R. Laboratory evaluation and interpretation of synovial fluid. *Veterinary Clinics of North America:Small Animal Practice*, v.33, p. 153-178, 2003.
- MCCONKEY, E. S.; LOPEZ, A.; SHAW, D. *et al.* Leishmanial polyarthritis in a dog. *Can. Vet. J.*, v. 43, n. 8, p. 607-609, 2002.
- MESSICK, J.B. Eritocytes. In. WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6 ed. p. 121 – 260, Iowa. Blackwell. 2010.
- METTLER, M. *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 *Leishmania* infections in dogs. *Journal of clinical microbiology*. v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.
- MICHALICK M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM. *Parasitologia humana*. 11ª ed. p. 31-35, São Paulo: Atheneu; 2005.
- MILLER, J. B. *et al.* Synovial fluid analysis in canine arthritis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 10, p. 392-398, 1974.
- MIRÓ, G. *et al.* Canine leishmaniasis: concepts and insights on an expanding zoonosis : part 2. *Trends in parasitology*. v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

- MISSAWA, N. A. *et al.* Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, 2008.
- MONTEIRO, E. M. *et al.* Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 2, n. 38, p. 147-152, 2005.
- MOURA, A.C.J. Avaliação clínico-laboratorial e do xenodiagnóstico de cães com anticorpos anti-leishmania e de cães vacinados com Leishmune, provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina. 2013. 96f. Belo Horizonte, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Medicina interna de pequenos animais. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1037-1038.
- NEVES, D. P. Gênero *Leishmania*. In: Parasitologia Dinâmica. 2 ed. São Paulo. Ed. Atheneu. p. 83-88, 2006.
- NIETO, C.G. *et al.* Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, v. 45, p. 33-47, 1992.
- NOLI, C. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus*. v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.
- OLIVEIRA, C.L, PROIETTI F.A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saude Publica*. v.5 n. 17, p. 1231-1239, 2001.
- OLIVEIRA, T. M. F. S. *et al.* Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 220-222, abr.-jun. 2015.
- PERMAN, V. Synovial fluid. In: Kaneco, J. J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 3.ed. p. 779-783. New York: Academic Press, 1980.
- PEDERSEN, N.C. Synovial fluid collection and analysis. *Veterinary Clinics North America*, v.8, p.495-499, 1978.
- PUMAROLA, M.; BREVIK, L.; BADIOLA, J. *et al.* Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J. Comp Pathol*. n. 105, p. 279-286, 1991.
- QUARESMA, P.F.; MURTA, S.M.F.; FERREIRA, E.C. *et al.* Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta tropica*, v. 111, n. 3, p. 289-294, 2009.
- RATH, S.; TRIVELIN, L.; IMBRUNITO, T. R. *et al.* Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: estado da arte. *Quimica Nova*, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 1-12, 2003.
- READY, P.D. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 15 (10), p. 1 – 11, 2010.
- REIS, A. B. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. 2001. f. 180. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- REIS, A.B., MARTINS-FILHO, O.A, TEIXEIRA-CARVALHO, A., *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, n. 128, p. 87-95, 2009.
- RESENDE, S.M. Leishmaniose Visceral em Minas Gerais. Boletim Epidemiológico: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, 2007.
- REY, L. *Bases da Parasitologia Médica*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 379, 2002.

- RIBEIRO, E. E. A.; SOUZA, F. A. L.; LOPES, J. B.; COSTA, F. A. L. Bioquímica do soro de cães com leishmaniose visceral em diferentes titulações ao IFI, idades, grupos raciais e sexo. *Pubvet*, Londrina, v. 3, n. 24, Ed. 85, Art. 99, 2009.
- RIGO, R.S., CARVALHO, C.M.E, HONER, M.R., ANDRADE, G.B. *et al.* Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* v.2, n. 55, p. 113-116, 2013.
- ROQUE A.L.R.; JANSEN A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* p.251–262, 2014.
- SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose Visceral: Uma zoonose reemergente. *Clínica Veterinária-Saúde Pública*. Ano II, n. 11, p. 24-28, 1997.
- SANTOS-GOMES, *et al.* Citokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, [s.n.], v. 88, p. 21-30, 2002.
- SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet dermatol.* n. 20, p. 471-489, 2009.
- SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagassi* or the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 577-579, 2006.
- SILVA E.S.; GONTIJO C.M.F.; PACHECO, R.S., FIUZA, V.O.P.; BRAZIL, R.P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* n. 96, p. 285-291, 2001.
- SILVA, E.S. GONTIJO, C.M.F. MELO, M.N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitol.* v. 12, n.21, p. 550-552, 2005.
- SILVA, A. A. L. Estudo clínico-laboratorial das articulações de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral e experimentalmente inoculados com *Leishmania chagasi* por via intra articular. *Dissertação* (mestrado em ciência animal).Univ. Est. Paulista, Araçatuba, SP, 2007.
- SILVA, F. L. *et al.* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* v. 1-2, n. 106, p. 55-59, 2009.
- SILVA, A. R. S. Avaliação radiográfica das articulações dos membros locomotores de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no Município de Araçatuba – SP. *Dissertação de mestrado*, São Paulo, 2009a.
- SILVA, F.O.L. Aspectos entomológicos das leishmanioses. In: *Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia*. Leishmaniose Visceral. n. 25. Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, MVZ Editora, p.28-35, 2012a.
- SILVA, V. M. Estudo de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari Ixodidae) como potencial vetor de Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal. *Dissertação de Mestrado*, 2012b.
- SILVA, M. N. G. *et al.* Parasitological analysis of synovial fluid from dogs naturally infected with *Leishmania* sp. *Ciência Rural*, v. 44, n. 7, p. 1236-1239, Santa Maria, 2014.
- SILVA, F.O.L. Ecoepidemiologia e Controle da Leishmaniose Visceral no município de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil). *Tese de doutorado*, Belo Horizonte, 2015.
- SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, v. 10, n. 1, p.1-16, 1988.
- SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Canine leishmaniasis.- a challenging zoonosis. *European Journal of Companion Animal Practice.* n. 18, p. 232-241, 2008.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology.* n. 28, v. 165(1-2), p. 1-18, 2009.

- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Leishvet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.
- SONADA, M. C. Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. *Dissertação de mestrado*, São Paulo, 2007.
- SPRENG, D., Leishmanial polyarthritis in two dogs. *Journal Small Animal Practice*. v. 34, p. 559-563, 1993.
- STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. 2.ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2011.
- TAFURI, W. L.; BARBOSA, A. J. A.; MICHALICK, M. S. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, São Paulo, v. 38, n. 2, p.81-89, 1996.
- TATARUNAS, A. C.; MATERA, J. M.; FRANCHINI, M. L. Análise de líquido sinovial em cães. *Ver. Educ. Cont. CRMV-SP*, v.7, n.13, p. 7-14, 2004.
- TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A.P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of *Leishmaniasis*. *Expert Rev Mol Diagn*. n. 5, v. 3, p. 657-667, 2003.
- TEIXEIRA-NETO, R.G.; SILVA, E.S.; NASCIMENTO, R.A.; BELO, V.S.; OLIVEIRA, C.L.; PINHEIRO, L.C.; GONTIJO, C.M.F. Canine visceral leishmaniasis in a urban setting of southeastern Brazil: na ecological study involving spatial analysis. *Parasites & Vectors*, v.7, n. 1, p. 485-494, 2014.
- TORRENT, E.; LEIVA, M.; SEGALES, J. *et al.* Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *J. Small Anim Pract*. n. 46, p. 549-552, 2005.
- TORRES, F. D. *Rhipicephalus sanguineus* e a epidemiologia da leishmaniose visceral canina no estado de Pernambuco. *Tese de doutorado*, Recife, 2009.
- TRALL, M.A. Hematologia nas espécies domésticas comuns. In. TRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1.ed. São Paulo. Rocca. 2007. P.63 – 188.
- USSUI, C. A.; NEVES, V. L. F. C. Leishmaniose Tegumentar Americana. São Paulo: Sucen, 2001. p. 1-4. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/dencas/leishteg/texto-leishmaniose-tegumentar.htm>>. Acesso em: 16 nov. 2014.
- VALLADARES, J.E. *et al.* Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. *The Veterinary Records*. v. 141, p. 574-575, 1997.
- VIDES, J. P. *et al.* *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 178, p. 22-28, 2011.
- VIEIRA, A. M. M.; Leishmaniose canina: Estudos de casos clínicos. *Dissertação* (mestrado em medicina veterinária)- Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Portugal, 2013.
- WALL, R., SHEARER, D. *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control*. (2th ed.). London: Blackwell Science Ltd, 2001.
- WERNECK, G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saúde Pública*, v. 48, n. 5, p. 851-855, 2014.
- WHO. World Health Organization. Magnitude of problem, 2006. Geneva: World Health Organization, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/en/index.html>>. Acesso em: 20 ago 2014.
- WHO. World Health Organization. Sustaining the drieve to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization, 2013. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/. Acesso em: 20 out. 2014.

WOLINSKA, J., KING, K.C. Environment can alter selection in host-parasite interactions. *Trends in Parasitol.* v. 5, n. 25, p. 236-244, 2009.


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

YAMAGUSCHI, R. A.; FRENCH, T. W. *et al.* Leishmania donovani in the synovial fluid of a dog with visceral leishmaniasis. *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 19, p. 723-726, 1982.

YKEDA, F.A.; CARLINI, P.C. *et al.* Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no interior de Araçatuba São Paulo. *Clínica Veterinária-Clínica Médica*. ano 3, n. 47, p.42-48, 2003.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1: Certificado de aprovação CEUA

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 371 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Estudo do líquido sinovial de cães naturalmente infectados por Leishmaniose Visceral Canina, na região Metropolitana de Belo Horizonte", que tem como responsável Paulo Ricardo de Oliveira Paes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 17/03/2015. Este certificado expira-se em 17/03/2020.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 371 / 2014, related to the Project entitled "Study of synovial fluid of dogs naturally infected by Canine Visceral Leishmaniasis in the metropolitan area of Belo Horizonte", under the supervision of Paulo Ricardo de Oliveira Paes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 17/03/2015. This certificate expires in 17/03/2020.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 17/03/2015.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/ 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 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	

9.2. Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa “ESTUDO DO LÍQUIDO SINOVIAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MG”, sob a responsabilidade do pesquisador professor Paulo Ricardo de Oliveira Paes, a qual pretende avaliar as alterações do líquido sinovial causadas pela leishmaniose e auxiliar no diagnóstico da doença, da região metropolitana de Belo Horizonte. Sua participação é voluntária e se dará por meio de liberação de seu animal, após vir a óbito, para realização de coleta de material para exames laboratoriais. Este estudo poderá contribuir para esclarecimento de possíveis novas alterações causadas pela doença e auxiliar no diagnóstico diferencial de outras patologias e não prevê riscos decorrentes de sua participação. Sua participação é muito importante uma vez que contribuirá para tais esclarecimentos .

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço (Escola de Veterinária da UFMG, Av. Antônio Carlos 6627), pelo telefone (31)3409-2205), ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética no USO de Animais – CEUA/UFMG, na Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Prédio Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, Belo Horizonte, Minas Gerais, telefone (31) 34094512.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do participante

Assinatura do Pesquisador Responsável

Anexo 3

Dados individuais relativos à análise do líquido sinovial dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Grupo	Animal	Dens	pH	Prote	Leuc	Neut	Linfo	Macr
1	1	1,021	7,5	2,5	5,6	12	76	9
1	2	1,024	7,2	2,5	5,8	8	74	10
1	3	1,022	7	2,4	5,2	9	76	13
1	4	1,018	7,4	2,2	5,9	10	70	14
1	5	1,021	7	2,2	5,8	11	70	12
1	6	1,02	7,5	2,3	2,4	10	75	13
1	7	1,022	7,2	2,1	2,9	9	68	18
1	8	1,024	7	2,4	3,1	11	72	15
1	9	1,021	7	2,5	7,7	11	70	12
1	10	1,022	7,4	2,4	5,8	8	74	12
1	11	1,02	7	2,5	3,2	12	79	8
1	12	1,021	7	2,5	5,8	11	78	14
2	1	1,015	8	4,2	2,2	76	17	5
2	2	1,016	8	4,2	2,9	69	26	13
2	3	1,015	9	2,8	10,2	58	17	15
2	4	1,016	7	2,4	6,7	53	36	6
2	5	1,014	8	3,4	3,8	60	26	6
2	6	1,025	8	3,8	12,5	50	18	16
2	7	1,012	7	2,2	1,2	55	29	8
2	8	1,032	9	9,2	13,9	64	13	10
2	9	1,028	7	4,2	55,7	80	10	1
2	10	1,017	7	4,2	16	55	23	13
2	11	1,022	8	2,5	1,6	66	23	5
2	12	1,037	8	7,2	18,3	78	14	2
3	1	1,026	7	5,4	2,7	60	28	6
3	2	1,011	9	2,6	1,5	60	12	17
3	3	1,022	8	5	6,2	70	10	10
3	4	1,027	7	3,2	10,3	68	19	8
3	5	1,018	7	2,8	16,3	63	20	7
3	6	1,022	8	4,2	10,2	65	18	10
3	7	1,024	8	5,4	7,9	72	13	8
3	8	1,015	7	7	4,7	68	20	10
3	9	1,025	8	3,8	10	63	21	8
3	10	1,018	8	5,2	19,8	75	15	1
3	11	1,012	9	2,5	1,6	53	21	12
3	12	1,014	7	3,9	1,2	56	18	11

ANEXO 4

Dados individuais relativos à análise do Eritrograma e plaquetograma dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Grupo	Animal	Hemác	Hemogl	Hemat	Vcm	Chcm	Plaq	Reticul
1	1	7,2	16,5	48	66,7	34,4	352	0,5
1	2	5,77	11,6	37,8	65,5	30,7	692	0,3
1	3	6,24	11,5	34,8	55,8	33	324	0,4
1	4	7,96	18,7	55,6	69,8	33,6	472	0,4
1	5	7,19	15,7	44	61,2	35,7	359	0,3
1	6	6,1	13,2	43,2	71,1	30,4	358	0,5
1	7	6,62	13,9	43,3	65,4	32,1	374	0,4
1	8	7,04	14,2	45,9	65,2	30,9	402	0,3
1	9	6,2	15,5	47	65,7	33,4	330	0,5
1	10	7,35	15,4	46,7	63,6	32,9	500	0,4
1	11	8,6	17,9	55,6	64,7	32,1	430	0,4
1	12	7,6	17	53,5	70,4	31,8	600	0,6
2	1	4,76	10,1	31,1	65,4	32,4	140	0,2
2	2	2,32	4,8	14,5	62,7	33,1	95	0,3
2	3	4,6	11,1	31,9	69,3	34,8	188	0,3
2	4	4	9,4	29,9	74,8	31,4	350	0,4
2	5	3,03	7,4	22	72,6	33,6	168	0,3
2	6	4,76	10,1	30,3	63,8	33,3	440	0,4
2	7	4,26	8,3	25,4	59,7	32,6	528	0,3
2	8	4,04	9,4	27,8	69	33,8	323	0,2
2	9	4,57	8,7	25,7	56,4	33,8	148	0,2
2	10	3,45	7,1	20	58	35,5	79	0,2
2	11	4,48	8,2	25,6	57,3	32	288	0,4
2	12	4,77	10	29,7	62,3	33,6	110	0,3
3	1	4,97	10,9	31,4	63,7	34,8	228	0,2
3	2	1,57	3,7	10,8	69,3	34,2	138	0,3
3	3	2,74	6,2	19,7	72,2	31,4	98	0,1
3	4	4,94	10,9	31,4	63,6	34,7	620	0,2
3	5	3,55	7,5	22,3	62,9	33,6	125	0,2
3	6	4,24	7,7	25,3	59,7	30,4	450	0,3
3	7	3,13	6	18,8	60,1	31,9	57	0
3	8	4,2	7,1	22,5	53,7	31,5	540	0,1
3	9	3,11	5,1	16,9	54,3	32	422	0,2
3	10	3,04	7,4	24,9	63,3	31,4	92	0,3
3	11	3,6	8	24,5	68,1	32,7	363	0,4
3	12	5,01	10,8	30	60	36	170	0,3

ANEXO 5

Dados individuais relativos à análise do leucograma dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e animais positivos para LVC estágio III (G3).

Leucócitos	Bastonetes	Neutrófilos	Eosinófilos	Monócitos	Linfócitos
9,3	186	7161	558	93	1302
10,3	206	7004	618	309	2163
13,2	528	9372	264	396	2640
9	360	7200	180	180	1080
9	90	5490	450	90	2880
11,2	336	7840	560	336	2128
8,2	164	5412	164	164	2296
11,8	354	7906	590	354	2596
9,3	186	7161	558	93	1302
13,6	544	8024	1088	136	3808
16	160	9440	480	800	5120
15	450	12450	450	150	1500
10,5	105	8295	315	420	1365
4,4	176	2112	176	88	1848
7,9	158	6083	316	79	1264
18	2340	9000	180	880	3600
6,5	260	4160	455	65	1560
12	840	8040	1080	360	1680
16,8	2352	12264	336	336	1512
16	960	12000	800	480	1760
9,6	288	5280	1056	384	2592
10,2	816	6120	102	204	2958
10,2	102	4692	1734	102	3570
12	840	8040	1080	360	1680
10,3	919	7447	651	104	1633
7,6	456	4712	152	152	2128
4,7	188	2820	282	94	1316
10,2	918	7446	102	102	1632
13	1040	8190	650	650	2470
32,4	324	28188	324	324	3240
5,7	1197	2565	114	114	1710
9,3	1302	5952	93	93	1860
22	880	18920	220	220	1760
7,7	154	5313	1155	308	770
7,8	78	4758	312	78	2574
22,5	450	15750	1125	1125	4050

ANEXO 6

Dados individuais relativos à análise do Perfil Hepático e proteinograma dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e estágio III (G3).

Grupo	Animal	ALT	AST	FA	Prot.Tot.	Albumina	Globulina	Rel. A/G
1	1	44	58	29	6,4	2,7	3,7	0,73
1	2	48	52	62	6,8	2,8	4	0,7
1	3	48	28	72	6,8	2,9	3,9	0,74
1	4	42	56	66	6,6	2,6	3,2	0,81
1	5	45	52	76	6,4	2,8	3,6	0,78
1	6	61	48	72	6,9	3	3,9	0,77
1	7	64	52	87	6,5	3	3,5	0,86
1	8	28	31	63	7,1	3,4	3,7	0,92
1	9	45	49	62	6,7	2,8	4	0,7
1	10	107	51	103	6,8	3,3	3,5	0,94
1	11	62	43	84	6,5	3	3,5	0,86
1	12	71	49	112	7,2	3,4	3,8	0,89
2	1	126	80	24	9,8	1,8	8	0,23
2	2	49	68	27	6,5	1,3	5,2	0,25
2	3	59	48	27	7	2,2	4,8	0,46
2	4	117	64	68	6,3	2,1	4,2	0,5
2	5	61	69	70	9	1,8	7,2	0,25
2	6	108	90	57	6,4	1	5,4	0,19
2	7	64	62	69	8,2	1	7,2	0,14
2	8	50	62	41	11	1,2	9,8	0,12
2	9	103	83	32	5,6	2,4	3,2	0,75
2	10	85	60	48	10	1,4	8,6	0,16
2	11	51	97	195	9	1,1	7,9	0,14
2	12	118	102	45	10,2	2	8,2	0,24
3	1	91	290	104	6,6	2	4,6	0,43
3	2	129	100	36	11	1,3	9,7	0,13
3	3	125	94	28	12,8	1,8	11	0,16
3	4	29	57	36	10,3	1,8	8,5	0,21
3	5	207	90	143	11,7	1,9	9,8	0,19
3	6	51	40	93	13,3	2,3	11	0,21
3	7	92	90	35	10,9	1,6	9,3	0,17
3	8	28	68	96	11,7	1,1	10,6	0,1
3	9	33	48	97	10	1,4	8,6	0,16
3	10	96	83	52	13,2	1,2	12	0,1
3	11	28	76	39	4,7	1	3,7	0,27
3	12	53	78	120	12	1,1	10,9	0,1

ANEXO 7

Dados individuais relativos à análise de uréia e creatinina dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e estágio III (G3).

Grupo	Animal	Uréia	Creatinina
1	1	21	0,8
1	2	56	0,9
1	3	24	0,8
1	4	32	1,1
1	5	38	1
1	6	38	1,1
1	7	52	1,1
1	8	39	0,8
1	9	54	0,9
1	10	33	1
1	11	46	1
1	12	47	1,3
2	1	41	1,1
2	2	87	1,4
2	3	23	0,5
2	4	31	0,9
2	5	28	0,5
2	6	29	0,5
2	7	42	0,7
2	8	30	0,6
2	9	31	0,8
2	10	40	0,6
2	11	35	1,4
2	12	33	0,5
3	1	83	2
3	2	64	1,7
3	3	90	1,8
3	4	100	3,1
3	5	92	1,9
3	6	46	1,6
3	7	195	3
3	8	68	0,9
3	9	120	2
3	10	55	1,2
3	11	128	2,5
3	12	36	0,8

ANEXO 8

Dados individuais relativos à análise dos aspectos físicos do LS dos grupos controle (G1), animais positivos para LVC estágio II (G2) e estágio III (G3).

Grupo	Animal	Aspec. Centr	Mucina	Parasito	Viscosidade
1	1	2	3	0	3
1	2	2	3	0	3
1	3	2	3	0	3
1	4	2	3	0	2
1	5	3	3	0	3
1	6	3	3	0	3
1	7	3	3	0	3
1	8	3	3	0	3
1	9	3	3	0	2
1	10	2	3	0	3
1	11	2	3	0	3
1	12	2	3	0	3
2	1	1	3	0	3
2	2	1	2	1	2
2	3	1	3	0	3
2	4	1	3	0	3
2	5	1	2	0	3
2	6	2	3	0	3
2	7	1	3	1	3
2	8	2	1	1	2
2	9	2	2	0	2
2	10	1	3	1	2
2	11	2	1	0	3
2	12	1	2	0	3
3	1	2	1	0	3
3	2	1	3	1	3
3	3	1	1	1	2
3	4	1	3	0	3
3	5	1	1	1	2
3	6	2	1	0	3
3	7	1	0	1	2
3	8	2	3	1	3
3	9	1	1	1	2
3	10	1	1	1	2
3	11	1	1	1	3
3	12	1	2	1	2

Ref: **Asp centrif:** 1-límpido, 2-amarelo palha, 3-amar.escuro. **Mucina:** 0-muito fraco, 1-fraco, 2-regular 3-normal. **Parasito:**0-ausente, 1-presente. **Viscosidade:**1-aumentada, 2-diminuida, 3-normal