SIMONI MARUYAMA

**Estudo clínico-epidemiológico de casos de Granuloma leproide
canino, diagnosticados pelas histopatologia e técnica de
reação em cadeia de polimerase (PCR)**

São Paulo

2010

SIMONI MARUYAMA

**Estudo clínico-epidemiológico de casos de Granuloma lepróide canino,
diagnosticados pelas histopatologia e técnica de reação em cadeia de
polimerase (PCR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Medicina
Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2297
FMVZ

Maruyama, Simoni

Estudo clínico-epidemiológico de casos de Granuloma lepróide canino, diagnosticados pelas histopatologia e técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) / Simoni Maruyama. -- 2010.
95 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson.

1. Micobacterioses. 2. Granuloma lepróide. 3. PCR. 4. Dermatopatias. 5. Cães.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo clínico-epidemiológico, retro e prospectivo de casos de granuloma leproide canino, diagnosticados histopatologicamente e pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR)", protocolado sob o nº1277/2007, utilizando 20 (vinte) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "A retrospective and prospective clinical-epidemiological study of canine leproid granuloma cases using histopathology and polymerase chain reaction technique (PCR)", protocol number 1277/2007, utilizing 20 (twenty) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 20 de março de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

HOSPITAL VETERINÁRIO

/jsc

Ao Ilustríssimo Senhor
Professor Doutor **Carlos Eduardo Larsson**

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto “Estudo clínico-epidemiológico, retro e prospectivo, de casos de granuloma lepróide canino, diagnosticados histopatologicamente e pela reação em cadeia de polimerase (PCR)”, desenvolvido pela Pós-Graduanda Simoni Maruyama, sob a sua responsabilidade, previamente aprovado pela Comissão de Bioética desta Faculdade, foi analisado e atende às normas da Comissão de Ética desse Hospital, que acompanhará administrativamente sua execução. Substituição do responsável, inserção de novos colaboradores e mudanças na metodologia proposta deverão ser imediatamente comunicadas a esta Comissão, como as datas de suspensão ou término do projeto.

São Paulo 14 de agosto de 2008.

Prof. Dr. Idercio Luiz Sinhorini
Presidente da Comissão de Ética Hospitalar
HOVET-FMVZ-USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARUYAMA, Simoni

Título: Estudo clínico-epidemiológico de casos de Granuloma lepróide canino,
diagnosticados pelas histopatologia e técnica de reação em cadeia de polimerase
(PCR)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Às minhas tias Junko e Noriko, que desde o primeiro momento, foram meu maior incentivo para fazer o Curso de Especialização. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

Sou eternamente grata...

Aos meus pais Mitsue e Jun, que além de suas possibilidades, proporcionaram tudo e principalmente, seus princípios morais e exemplo de vida...

Ao meu irmão Ricardo, ainda que longe, estimula sempre com sabedoria e otimismo...

Ao meu irmão Marcos, meu confidente “acadêmico”, já tenho saudades das nossas conversas de projetos...

Ao Marcos Marini Melo, que pacientemente aguarda por mim e sempre apoiou minha trajetória profissional, mesmo em sacrifício de nossos sentimentos...

Amo todos vocês!

*Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.*

Clarice Lispector

Ao Prof. Larsson, agradeço por todo o incentivo e confiança. É um privilégio tê-lo como orientador, pois és um mestre no mais belo sentido literal da palavra. Não há como esquecer sua disposição em sempre esclarecer nossas dúvidas e ajudar, não importa o momento. Lembrarei sempre com gratidão, de seu empenho e gentileza, pelas idas ao Dr. Michalany, ao Ministério da Agricultura e tantas outras e todas as oportunidades.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, à coordenação do programa de pós-graduação e todos os docentes, o meu eterno reconhecimento, por tudo o que aprendi neste período.

Ao Departamento de Clínica Médica (VCM) da FMVZ/USP, desde os tempos do Curso de Especialização (CEDV-I), pela acolhida e oportunidade.

À verba PROAP, pelo custeio das despesas com o material de pesquisa.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ/USP, em especial Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão que prontamente disponibilizou seu auxílio e as instalações do LABMAS para o início do experimento.

Aos amigos sempre solícitos do VPS: Prof(a).Dra. Alessandra Marnie M.G.Castro, obrigada por toda a paciência e dedicação especial que jamais esquecerei, à bióloga Sheila Oliveira de S. Silva, às pós-graduandas Karen L. Ferrari e Camila Oliveira e a todos do laboratório que auxiliaram no aprendizado da PCR: Enio, Estela, Juliana e tantas outras pessoas...

Ao Prof. Richard Malik da Universidade de Sidney, pelas informações, e-mails e fotos gentilmente cedidas.

À Dra. Janet Fyfe e ao Mycobacterium Lab pela valiosa colaboração nos exames realizados

Ao Dr. Nilceo Michalany, ao Odilon, à todos do Laboratório de Dermatopatologia pelos cortes histológicos.

À Dra. Priscilla Taboada do Laboratório Histopet, pela amizade e confiança em emprestar os blocos de parafina, fundamentais para o começo do projeto.

Ao Prof. Marconi Farias, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela gentileza em fornecer dados e informações para a pesquisa.

À Prof.(a).Dra. Denise Schwartz (também pelo meu aceite no “estágio pessoal”) e à Prof.(a). Dra.Marcia Mery Kogika, pois literalmente não existem palavras para agradecer as cartas para a Austrália.

Aos amigos mais que especiais de mestrado, nas aulas da pós, nos afazeres da SBDV, no dia a dia, nas horas boas e também no “desespero”: Angela Velloso Braga Yazbek (com Mauricio Mirian – sempre a “nos socorrer”!) e Luiz Eduardo Bagini Lucarts. Sem a companhia de vocês, não conseguiria imaginar essa trajetória. Que saudades sentirei...

Aos colegas e pós-graduandos Camila Domingues Oliveira e Claudio Nazaretian Rossi, agradeço o auxílio no atendimento, a amizade e a convivência,

Ao Bruno M. Teixeira, pós-graduando e uma pessoa nota 10, prestativo e gentil, conte comigo também com o que precisar.

Aos veterinários contratados da Dermato: Carlos Eduardo Larsson Junior, Rita de Cassia Carmona Castro, Gustavo Seixas Dias e Mary Otsuka Ikeda...vocês foram fundamentais e serão sempre exemplos a serem lembrados.

Ao Carlão e a Prof(a).Dra. Maria Helena Matiko Akao Larsson também agradeço em especial, pois nunca esquecerei o auxílio nas traduções e aquela conversa com o Prof. Richard Malik no congresso!

Às “ex-pós-graduandas” e amigas acima de tudo: Ana Cláudia Balda, Luciana Arioli Maschietto, Marcia Cristina Sonoda e Tatiana Saleme Borges: obrigada pelo início na Dermato!

Aos veterinários contratados do HOVET, em especial as da Clínica Médica (Bruna, Denise Simões, Khadine, Paula e Vera), o que seria sem a triagem dos cães e a ajuda no cotidiano...

Aos residentes e ex-residentes, pós-graduandos e estagiários, pelo auxílio de todos os dias.

Aos enfermeiros do HOVET sempre prontos em ajudar, em especial Carlito, Geraldo e Toninho.

Às secretárias do VCM, Cida, Silvana e principalmente à Adelaide que incontáveis vezes auxiliou... “nem sei como agradecer”, por tudo.

À bibliotecária Elza Faquim, pelas correções.

A todos os funcionários da FMVZ/USP, do HOVET, principalmente da recepção e secretaria pelo apoio e colaboração, na busca aos arquivos dos prontuários.

Às amigas do tempo da graduação, sempre presentes e “encaminhando os casos”: Déa Joia, Mari Meneghello e San. E as amigas eternas do colégio: Camila e Cristina Giacomelli, apesar de hoje pouco nos encontrarmos, o que vale é meu imenso carinho por vocês!

À ClinDog, Dr. Jorge de Jesus Melo e Dra. Rosane Marini Melo, que mesmo tão longe acreditam e esperam por mim.

Aos proprietários dos cães incluídos no projeto e a todos os animais, a razão de estudarmos todos os dias.

E aos meus animais especiais, “filhinhos e sobrinhos”, os ainda presentes e os que já se foram... Jane, Ninas, Petit, Melisso, Torro, Bilica (*in memorian*) e Tequila, Melissa, Ryu, Max “da ClinDog”...E a Mishi e Fifi (da loja), também a Chica, a Michele, o Alfredo (da Déa) e tantos outros.. que serão sempre responsáveis por me fazer médica veterinária...

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo
começo, qualquer um pode começar
agora e fazer um novo fim.*

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

MARUYAMA, S. **Estudo clínico-epidemiológico de casos de Granuloma lepróide canino, diagnosticados pelas histopatologia e técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR).**

[Clinical and epidemiological study of cases of Canine leproid granuloma diagnosed by histopathology and by polymerase chain reaction (PCR)]. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

O Granuloma lepróide canino, quadro sindrômico, também denominada “lepra canina”, foi descrito pela primeira vez em 1973, no Zimbábue, em cães da raça Boxer e Bull mastiff e consiste em um dos tipos de micobacterioses tegumentares encontradas nos animais de companhia. No presente estudo, objetivou-se caracterizar os aspectos clínicos e epidemiológicos da enfermidade, nos animais atendidos no período de 1990 a 2010, no Serviço de Dermatologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, bem como determinar a ocorrência de similaridade gênica da micobactéria envolvida, entre os animais brasileiros e os descritos em trabalhos estrangeiros. A amostragem foi composta de 37 animais com diagnóstico estabelecido por exame histopatológico ou citobacterioscópico cutâneo, onde se verificou evidente predisposição racial (83,7%), principalmente da raça Boxer (61,2%), ampla distribuição etária e ausência de predisposição sexual. Os cães apresentavam bom estado geral, sem comprometimento sistêmico, apenas tegumentar, com predomínio das lesões de morfologia nodular (75,6%) e situadas em pavilhões auriculares (86,5%). O diagnóstico foi estabelecido a partir dos seguintes exames subsidiários: histopatologia cutânea (56,8%), citobacterioscopia (21,6%) e por ambas as metodologias (21,6%). Trata-se ainda de enfermidade ocorrente em várias unidades federativas brasileiras, no entanto parece ser pouco diagnosticada e assim submetida a tratamentos equivocados, o que foi verificado em 54% dos cães tratados preteritamente. Os fármacos empregados no tratamento sistêmico, rifampicina ou enrofloxacin, mostraram-se igualmente eficazes, com estabelecimento da alta clínica em tempo médio de 84,1 dias. Já técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) foi executada a partir de cortes histológicos cutâneos, emblocados em parafina, oriundos de 13 animais, sendo que em 09 (69,2%) deles se detectou a presença de *Mycobacterium* cepa CLGS, pelo

método da PCR em tempo real e a confirmação do agente em comum entre os casos do Brasil e de outros países.

Palavras-chave: Micobacterioses. Granuloma Lepróide. PCR. Dermatopatias. Cães.

ABSTRACT

MARUYAMA, S. Clinical and epidemiological study of cases of Canine leproid granuloma diagnosed by histopathology and by polymerase chain reaction (PCR).

[Estudo clínico-epidemiológico de casos de Granuloma lepróide canino, diagnosticados pelas histopatologia e técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR)]. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

Canine leproid granuloma, syndromic, also called "canine leprosy, was first described in 1973 in Zimbabwe in Boxer dogs and Bull mastiff and consists of a type of soft tissue mycobacterial infections found in pets. In the present study aimed to characterize the clinical and epidemiological aspects of the disease in animals treated between 1990-2010 at the Department of Dermatology, Veterinary Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo, and to determine the occurrence of genetic similarity of mycobacteria involved, of dogs from Brazil and other countries. The sample consisted of 37 animals with diagnosis established by histopathology or cytology skin, where there was clear racial predisposition (83.7%), mainly Boxer (61.2%), broad age distribution and no sexual predisposition. The dogs were in good general condition, without systemic involvement, only cutaneous, with a predominance of nodular lesions morphology (75.6%) located in the ears (86.5%). The diagnosis was established from the following exams: cutaneous histopathology (56.8%), cytology (21.6%) and by both methods (21.6%). It is still disease occurring in several Brazilian states, however appears to be underdiagnosed and thus subjected to inappropriate treatment, which was observed in 54% of dogs treated. The drugs used in systemic treatment, rifampin and enrofloxacin, were equally effective, with the establishment of recovery a mean of 84.1 days. Already technique of polymerase chain reaction (PCR) was performed from histological sections of skin, paraffin embedded, from 13 animals, while in 09 (69.2%) of them detected the presence of *Mycobacterium* strain CLGS by method of real-time PCR and confirmation of the agent in common between the cases of Brazil and other countries.

Keywords: Mycobacteriosis. Canine leproid. PCR. Skin Diseases. Dogs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A = adenina

C = citosina

BAAR = bacilos álcool-ácido-resistentes

CRD = com raça definida

CLGS = “Canine leproid granuloma syndrome”

DNA = ácido desoxirribonucleico

EUA = Estados Unidos da América

FM = Faculdade de Medicina

FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

G = guanina

GLC = Granuloma leproide canino

HOVET = Hospital veterinário

PCR = “polymerase chain reaction” ou reação em cadeia de polimerase

RNA = ácido ribonucleico

SRD = sem raça definida

U = uracila

UNISA = Universidade de Santo Amaro

USP = Universidade de São Paulo

VCM = Departamento de Clínica Médica

T = timina

LISTA DE SÍMBOLOS

μ = micrón

% = por cento

$\geq$ = maior ou igual a

m = mili

β = beta

L = litro

M = mol

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 -Distribuição (%) de cães com Granuloma leproide canino, segundo o tempo de evolução lesional (dias). Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010).....	42
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a definição racial e raça. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010).....	39
Tabela 2 - Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a faixa etária (anos). Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010).....	40
Tabela 3 - Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a topografia lesional. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010).....	41
Tabela 4 - Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a distribuição lesional, quando localizada apenas em pavilhões auriculares. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010).....	41
Tabela 5 - Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo tratamento pretérito à primeira consulta e fármaco empregado. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010).....	42
Tabela 6 - Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a positividade nos métodos de diagnóstico. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010).....	43
Tabela 7 - Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a prescrição medicamentosa. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010).....	44

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Caracterização dos cães com Granuloma lepróide canino, segundo a identificação, definição racial, sexo e idade submetidos aos protocolos de PCR “nested”, PCR em tempo real e presença de DNA relativa ao GLC. Serviço de Dermatologia do HOVET – FMVZ/USP –2002 a 2009. São Paulo (2010).....	69
---	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – MICOBACTERIOSES.....	22
CAPÍTULO II - ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS DO GRANULOMA LEPRÓIDE CANINO EM SÃO PAULO (BRASIL) – ESTUDO RETRO E PROSPECTIVO (1990-2010).....	28
1 INTRODUÇÃO.....	28
1.1 ETIOLOGIA.....	29
1.2 PATOGENIA.....	29
1.3 OCORRÊNCIA.....	30
1.4 APRESENTAÇÃO CLÍNICA.....	31
1.5 DIAGNÓSTICO.....	31
1.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	32
1.7 EXAMES COMPLEMENTARES.....	32
1.8 TRATAMENTO.....	35
2 OBJETIVOS.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 AMOSTRAGEM.....	37
3.2 METODOLOGIA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS COM GRANULOMA LEPRÓIDE CANINO INCLUÍDOS NO ESTUDO RETRO E PROSPECTIVO.....	38
5 DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
CAPÍTULO III - DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO GRANULOMA LEPRÓIDE CANINO, A PARTIR DE CORTES HISTOLÓGICOS EMBLOCADOS EM PARAFINA, PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) – ESTUDO RETROSPECTIVO (2002-2009).....	62
1 INTRODUÇÃO.....	62
2 OBJETIVOS.....	64
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3.1 ANIMAIS.....	65
3.2 AMOSTRAS.....	65

3.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	66
4	RESULTADOS	69
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75
	LISTA GERAL DE REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICES	85

CAPÍTULO I

MICOBACTERIOSES

As infecções ou enfermidades micobacterianas decorrem da multiplicação de bactérias da família Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales, gênero *Mycobacterium* (GREENE, 2006).

A clássica designação micobactéria traduz a composição estrutural do agente (“fungo-bactéria”) que consiste na caracterização da natureza hidrofóbica de sua parede celular, rica em lipídios, que lhe confere tendência de crescimento similar a uma fina película de bolor na superfície de meios líquidos (CHARLES et al., 1999; MALIK et al., 2002).

São elas, bactérias aeróbias, em forma de bastonete, com tamanho de 0,2 a 0,6 por 1 a 10µm, tais bacilos são álcool-ácido resistentes, cuja denominação resulta da presença de um amplo grupamento químico, com propriedades lipídicas em sua membrana celular que, em conjunto, se caracterizam por ácidos graxos de cadeia longa e com múltiplas ligações que além de proporcionar as típicas propriedades tintoriais, conferem qualidades patogênicas, especialmente em função da resistência intracelular (AZULAY, 2008; BARABOGLIA; BARABOGLIA, 2009; OLIVEIRA, 2009)

A particularidade da decantada álcool-ácido resistência, se deve à presença, já mencionada, da grande quantidade de lipídios, os ácidos micólicos em sua membrana celular. Estes, impedem a remoção do corante fucsina, originando daí o termo “bacilos álcool-ácido resistentes” ou BAAR (LARSSON; MARUYAMA, 2008; OLIVEIRA, 2009). Assim, sua parede celular diferenciada, torna-se responsável pelos atributos quanto à sensibilidade aos agentes degermantes, intempéries e outras noxas que comprometem sua sobrevivência. Enumera-se ainda, sua elevada resistência principalmente, às variações de pH e de temperatura. (GREENE, 2006)

O termo *Mycobacterium* foi proposto, em 1896, por Lehman e Neumann, quando se conhecia apenas as espécies *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis*. Destas, *M. leprae* foi o primeiro agente identificado, em 1873, no entanto, devido a impossibilidade de crescimento em cultivo, não suscitaram maiores

investigações. De forma oposta, quando da identificação do *M. tuberculosis*, em 1882 seguiram-se vários estudos com meios de cultivo, técnicas de coloração, protocolos de tratamento e de vacinação (AZULAY, 2008)

Até 1873, acreditava-se que as micobactérias não acarretavam doenças no homem. Destarte, naquele ano, Hansen demonstrou que *M. leprae* era o agente etiológico de importante endemia que, na época, assolava a Europa, e ainda hoje, persiste, mormente, nos países tropicais e sub-tropicais, até hoje conhecida com a designação lepra ou hanseníase. Não há relato até o momento de êxito em se cultivar o Bacilo de Hansen, em meios artificiais (SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

Já, em 1882, ou seja, decorridos nove anos, Koch descreveu outra micobactéria – *M. tuberculosis*, como sendo o agente causal da tuberculose humana. Pouco mais tarde, em 1885, se descreveu *M. smegmatis*, porém só recentemente foi esta considerada patogênica para o homem. A partir daí, outras espécies também foram sendo gradativamente correlacionadas às moléstias humanas (*M. bovis*; *M. avium*; *M. intracellulare* (inicialmente chamado *Batley bacillus*, cultivado a partir de material provindo de vários pacientes de um sanatório para tuberculose na Geórgia); *M. smegmatis*; *M. ulcerans*; *M. marinum* etc (SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

A partir da década de 1950, após a identificação de novas espécies de micobactérias, outros patógenos, com a propriedade de álcool-ácido-resistência, foram isoladas de diferentes espécimens animais, do solo e da água. O interesse pela taxonomia do gênero aumentou e foi, então, constituído um grupo de agentes patogênicos que vem recebendo distintas denominações – micobactérias atípicas, oportunistas, ambientais, não tuberculosas ou paratuberculosas – existindo, hoje, mais de 128 espécies identificadas, das quais 90 formalmente reconhecidas (AZULAY, 2008; OLIVEIRA, 2009).

Mais precisamente, as micobactérias oportunistas, também, denominadas atípicas ou ambientais, receberam a designação de “micobactérias outras que não as da tuberculose”, na Conferência Internacional de Denver, em 1979 (SAMPAIO; RIVITTI, 2008). Ainda, segundo aqueles mesmos autores, as micobacterioses, atípicas ou ambientais, são moléstias causadas por distintas micobactérias, diferentes daquelas da tuberculose e da hanseníase. Desde 1950, o conceito de micobacterioses cutâneas atribuídas a outras micobactérias, que não as de Hansen ou da tuberculose, ficou bem estabelecido. Tais infecções estão relacionadas a imunodeficiências celulares, muitas vezes, específicas.

Em sequência, nas décadas de 70 e 80 registraram-se importantes conquistas com o emprego da quimioterapia com a introdução do ativo bactericida, a rifampicina. A associação de fármacos, inicialmente destinados para a terapia da tuberculose e para a hanseníase, concluiu-se na poliquimioterapia de curta duração, levando ao controle ou mesmo à cura de tais doenças, passando as políticas públicas a visar uma, agora possível, eliminação (OLIVEIRA, 2009).

CLASSIFICAÇÕES

De há muito, os representantes do gênero *Mycobacterium* tem sido agrupados e classificados como **patógenos obrigatórios**, ou sejam, e pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*, que não se multiplicam fora de um hospedeiro vertebrado, **micobactérias sapróbias** que, por sua vez, são subdivididas em **facultativas** como *M. avium*, *M. intracellulare* (e outros microorganismos relacionados ao Complexo *M. avium*), que vivem de forma sapróbia no ambiente, e que, eventualmente, ocasionam doença, e, finalmente, **sapróbias ambientais** que muito raramente causam doença. No entanto, em passado mais recente verificou-se que *M. leprae*, que sempre fora considerado como patógeno obrigatório de hospedeiros humanos e de dasiposídeos (tatus), pode fazer parte de um nicho ambiental ainda a ser definido (MALIK et al., 2002).

Conforme uma tradicional classificação, as micobactérias podem ser reunidas em quatro grupos, segundo Runyon (1959 apud GREENE, 2009, p.463), de acordo com: temperatura e velocidade de desenvolvimento das colônias e pigmentação – utilizando o clássico meio de cultivo de Löwenstaen:

Grupo I: cultivos de crescimento lento, fotocromógenas, tornando-se amarelo-alaranjadas após exposição a luz, devido à produção de β -caroteno (exemplo: *M. kansasii* e *M. marinum*).

Grupo II: cultivos de crescimento lento, escotocromógenas, que tornam-se amareladas com ou sem exposição à luz (exemplo: *M. scrofulaceum*).

Grupo III: cultivos de crescimento lento, não cromógenas, ou seja, que não produzem pigmentos (exemplo: *M. intracellulare*).

Grupo IV: aquelas que os cultivos têm crescimento rápido – as colônias crescem em até 5 dias (exemplo: *M. chelonae* e *M. fortuitum*)

Na forma sistemática clássica, as micobactérias, também, têm sido classificadas pelo padrão de velocidade de crescimento, pela capacidade de formação de tubérculos (nódulos), ou pelo quadro granulomatoso, desencadeado com eventual disseminação. Em síntese, as micobactérias de crescimento lento são parasitas, intracelulares, obrigatórios ou facultativos, que incluem, por exemplo, as espécies *M. tuberculosis* e *M. bovis*, causadores da verdadeira tuberculose. Já, as micobactérias de crescimento rápido receberam, preteritamente, denominações como “oportunistas” ou “atípicas”, e congregam inúmeras espécies que crescem rapidamente em meios sintéticos. Incluem-se, nesse grupo, aquelas cujas manifestações clínicas de infecção denotam formação localizada de abscessos, úlceras crônicas e paniculites (LARSSON et al., 2006; BIONDI et al., 2009).

Outro critério de classificação bem aceito em medicina veterinária consiste em dividir em grupos de enfermidades: aquelas decorrentes de infecções acarretadas por micobactérias de crescimento lento; Síndrome da lepra felina, Síndrome do Granuloma lepróide canino (ou lepra canina) e daquelas que sucedem infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido. No grupo das infecções acarretadas por micobactérias de crescimento lento, estão as causadoras da tuberculose (*M. tuberculosis* e *M. bovis*, *M. microti*-simile e *M. microti*) e as micobactérias que “não as da tuberculose” (Complexo *M. avium* e outras de crescimento lento e sapróbias, a exemplo, de *M. kansasii*, *M. genavense* e *M. simiae*). Já, na Síndrome da lepra felina estão envolvidos o *M. lepraemurium* e o grupo que congrega espécies de micobactérias - tal como ocorre na Síndrome do Granuloma lepróide canino, que compreende algumas micobactérias ainda uninominadas. Finalmente as micobactérias de crescimento rápido, ou chamadas oportunistas ou atípicas, são aquelas que se distribuem de forma ubiquitária e que podem ser isoladas, na maioria das vezes, do solo e da água, que têm como exemplo *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. phlei* e *M. thermoresistibile* (GREENE, 2006).

No entanto, hoje, em medicina humana considera-se que a classificação, segundo o tipo de pigmento elaborado e o tempo de crescimento do cultivo – lento e rápido – é bastante prática e didática, não se presta para a distinção das espécies. Atualmente, segundo OLIVEIRA (2009) a identificação é elaborada mediante análise bioquímica dos ácidos micólicos da parede da bactéria e de técnicas de biologia molecular (PCR – “polymerase chain reaction” ou reação em cadeia de polimerase).

Tal técnica da PCR é de grande importância para o diagnóstico médico, pois além de necessitar de pequena quantidade de material biológico, suas altas especificidade e sensibilidade auxiliam no diagnóstico vários microorganismos como vírus, bactérias e fungos; de neoplasias; para determinar marcadores genéticos de resistência a drogas e da predisposição genética a várias doenças. Permite, ainda, amplificar milhares de vezes uma sequência-alvo de DNA, em poucas horas e que pode ser obtida a partir de amostras de diferentes materiais que vão desde cortes histológicos “a fresco” a tecidos emblocados, de “per si”, em parafina (AZULAY, 2008).

Em vista de tais fatos, os métodos de diagnóstico, que têm como base a biologia molecular, consistem numa opção quando possível mais rápida e fidedigna relativamente à cultura da micobactéria em si. A amplificação, por PCR, do gene 16S do RNA ribossômico tem demonstrado ser de extrema importância no diagnóstico, também em medicina veterinária, de infecções causadas por distintas espécies de micobactérias. O gene 16S do RNA ribossômico é altamente conservado devido à restrição funcional e morfológica disposta na molécula de RNA ribossômico, no entanto as regiões no gene são altamente variáveis e espécie-específicas para micobactérias (HUGHES et al., 1993).

Pode-se afirmar, segundo Pedro et al. (2008), que, antes da introdução dos métodos moleculares (ano 2000), eram identificadas tão somente as espécies passíveis de identificação nas tabelas fenotípicas, no entanto desde então, não só a frequência de identificação de outras espécies de micobactérias aumentou mas, também, o número de casos diagnosticados sofreu evidente incremento, a exemplo, de micobactérias que não aquelas da tuberculose e de grande importância clínica, como *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. malmoense*.

Portanto, com o advento das novas técnicas de diagnóstico se evidenciou, como consequência o incremento das “novas moléstias” por elas acarretadas ou a diferenciação de várias micobacterioses que compartilham aspectos clínicos similares. Em medicina veterinária, a caracterização molecular tem permitido o estudo mais detalhado da Lepra felina e do Granuloma lepróide canino, uma vez que ambas as enfermidades guardam peculiaridades em comum, a contar da etiologia relacionada à uma espécie de micobactéria filogeneticamente muito semelhante ao *Mycobacterium simiae* (FYFE et al., 2008).

Ressalte-se que as micobactérias não são agentes causais contumazes de enfermidades tegumentares em cães e gatos. Todavia, quando se pressupõe sua ocorrência, é mister que se tente caracterizar a sua etiologia para se interpor o protocolo de terapia mais adequado e exitoso. Dentre as micobacterioses tegumentares arrolam-se quatro grupos de dermatopatias, nos quais se incluem: o Granuloma lepróide canino, a Lepra felina, a Tuberculose cutânea e as micobacterioses cutâneas atípicas (LEMARIE, 1999; TWOMEY; WUERZ; ALLEMAN, 2005; LARSSON; MARUYAMA, 2008).

O Granuloma lepróide canino, enfermidade, aparentemente, cosmopolita, já descrita no Antigo (Europa, Ásia e África), no Novo (América) e Novíssimo Continente (Oceania), foi pela vez primeira diagnosticado nas Américas, em São Paulo (Brasil) em meados da década de 80, do Século XX. Desde sua primeira descrição sempre intrigou clínicos, infectologistas e epidemiologistas veterinários pelos aspectos lesional; topografia; evolução; evidente predisposição racial; impossibilidade em cultivar, nos meios clássicos, seu agente etiológico, embora este pudesse ser perfeitamente evidenciado em citobacterioscopia de decalques ou na tradicional histopatologia de lesões biopsiadas.

Aqueles profissionais dedicados à infectologia ou à epidemiologia mostraram evidente interesse em investigar o patógeno, seu ciclo de vida e a pressuposta transmissibilidade. Pelo fato de, em sua primeira descrição, ter recebido a denominação, por alguns, alcunhada de “lepra canina” criou-se forte expectativa em situá-la como antroponose e saproonose. Quiçá, buscando um elo não aventado, ainda, sobre a etiopatogenia da tão estigmatizada, hanseníase ou lepra humana.

A despeito de alguns avanços obtidos na sua caracterização clínica, em animais criados na Oceania e nos Estados Unidos da América do Norte, pouco está assentado na bibliografia sulamericana sobre a predisposição racial, cortejo mórbido, padrão lesional, diagnose e terapia. Persistem inúmeras dúvidas sobre os aspectos da homologia e variabilidade de cepas dos bacilos aqui evidenciados frente àqueles da casuística norte-americana, neo-zelandesa e australiana. Teriam elas aspectos comuns?

Na tentativa de se aclarar tais pontos duvidosos objetivou-se reunir a casuística paulista, analisá-la epidemiológica e clinicamente e, também, elucidar alguns dos aspectos moleculares do agente causal.

CAPÍTULO II

ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS DO GRANULOMA LEPRÓIDE CANINO EM SÃO PAULO (BRASIL) – ESTUDO RETRO E PROSPECTIVO (1990-2010)

1 INTRODUÇÃO

O, ora denominado, Granuloma lepróide canino foi relatado, pela primeira vez, em 1973, na antiga Rodésia, hoje Zimbábue (SMITH, 1973; FINNIE, 1978; MALIK et al., 1998; SANTORO et al., 2008). Na ocasião, Smith (1973), observou e descreveu a presença de formações nodulares, de distintos tamanhos dispostos no panículo, de cães das raças Boxer e Bullmastiff. Inicialmente, o autor do primo relato, aventou que tais animais pudessem apresentar tuberculose e, portanto por implicações zoonosológicas, os mesmos foram submetidos à eutanásia e, subsequentemente, à necrópsia. No exame *post-mortem*, verificou que não havia comprometimento visceral, destarte à microscopia, foi observado uma plethora de bacilos álcool-ácido resistentes. No entanto, quando o material foi submetido ao exame visando a detecção de bacilos para tuberculose, mostrou-se negativo.

A despeito de um primeiro momento, ter Smith, referido ser quadro típico de tuberculose tegumentar, no mesmo ano, decidiu por refazer o relato considerando-o, então, como uma pressuposta paniculite micobacteriana. A designação sindrômica (Síndrome do Granuloma lepróide canino), sugerida por David Watson (MALIK; HUGHES, 2004), que seguiu a primitiva referência da enfermidade adveio da hipótese de ser ela decorrente da infecção por uma ou mais espécies de micobactérias sapróbias (MALIK et al., 1998; CHARLES et al., 1999), não cultiváveis “in vitro”, tal como o evidenciado nos quadros lepromatosos humanos e animais. Especificamente, pesquisadores australianos (MALIK et al., 1998) descreveram como a “síndrome de presença de granulomas nodulares micobacterianos que acometem o tecido subcutâneo de cães”. No mesmo estudo, os autores propuseram que o aparecimento da doença em cães apresentava particularidades similares à escrofulodermia (tuberculose coliquativa), evidenciada em crianças. Em medicina humana, a escrofulodermia é caracterizada pelo desenvolvimento de linfadenite, conseqüente de proliferação localizada de uma ou mais espécies de micobactérias sapróbias que, eventualmente, tenham sido inoculadas na pele (CHARLES et al., 1999).

1.1 ETIOLOGIA

Na atualidade, o designado Granuloma lepróide canino (GLC) é uma enfermidade aparentemente incomum, de etiologia micobacteriana, ocorrente, mas possivelmente, subdiagnosticada. É ela causada por micobactéria, ainda hoje inominada, que, em termos filogenéticos, parece estar relacionada a proliferação de agentes tais como o *Mycobacterium tilburgi*, *Mycobacterium simiae* e *Mycobacterium genavense* (HUGHES et al., 2000; FOLEY et al., 2002; GROSS et al., 2005).

O agente aparentemente é sapróbio, e de distribuição ubiquitária, já que muitos dos constituintes da família *Mycobacteriaceae* são microorganismos de vida livre, comumente encontrados do solo e bastante favorecidos quanto ao seu crescimento, quando mantidos em tanques d'água, piscinas e outros reservatórios de água natural podendo, a infecção, ser estabelecida pelo contato (imersão, quando do nadar) do animal em tais continentes (BIONDI et al., 2009; COSTA et al., 2007).

1.2 PATOGENIA

De forma presumida, o organismo adentra a pele e daí o tecido subcutâneo por lesões advindas de traumas perfurantes, que acarretem ruptura na barreira epidérmica. Tal hipótese provém de pressuposta inoculação por insetos picadores sugadores (mosquitos etc) que veiculem o agente, com a inoculação deste, quando do ato de picar, na pele do animal (MALIK et al., 1998; GROSS et al., 2005). Com base na sazonalidade dos casos descritos na Austrália, Malik et al. (1998) aventaram que as temperaturas ambientais elevadas, propícias à multiplicação de insetos, se associava à baixa temperatura corpórea das extremidades sugeridas, favoráveis ao crescimento das micobactérias no tecido. Tal teoria, também, poderia explicar a predileção por locais de assentamento das lesões em determinadas áreas corpóreas, tais como a face dorsal de pavilhões auriculares e das extremidades de membros. Outro fator relatado, pelos mesmos autores australianos, é a regressão espontânea das lesões, em alguns casos, o que leva à crença de que a enfermidade é auto-limitante em cães imunocompetentes. Ainda mais, a aparente predileção racial e de porte sugerem uma probabilidade de imunocompetência seletiva daquelas raças mais acometidas. No mesmo estudo australiano, os cães de pelame curto, representaram mais de 90% dos animais acometidos. Dentre estes, aproximadamente, a metade dos casos eram de animais da raça Boxer e mestiços da raça. Em outro trabalho, publicado nos Estados Unidos da América do Norte, de forma insólita, cães de

raças de pelame longo, tal como o Pastor Alemão foram, também, bastante representados (FOLEY et al., 2002; GROSS et al., 2005)

No Brasil, especificamente em São Paulo, as primeiras observações da ocorrência do Granuloma lepróide canino datam de 1984. Na casuística apresentada, no ano de 2000, por ocasião do congresso mundial de dermatologia veterinária, havido em San Francisco (EUA) reuniu-se cerca de 12 casos da enfermidade.

1.3 OCORRÊNCIA

O Granuloma lepróide canino já foi descrito na Austrália, Nova Zelândia, Zimbábue, Brasil, Argentina e Estados Unidos da América do Norte, sendo neste último em estados como Califórnia, Flórida, Nova Iorque e Georgia (LARSSON et al., 1990; MALIK et al., 1998; FOLEY et al., 2002; SANTORO et al., 2008).

No Brasil, há relatos em várias unidades federativas tais como: São Paulo (LARSSON; MARUYAMA, 2008), Minas Gerais (ACHA, 2009), Paraná (FARIAS et al., 2008), Distrito Federal (SEIXAS et al., 2008), Rio de Janeiro (CÁRDIA et al., 2009) e Bahia (TORRES et al., 2006). Em termos de casuística, a maior magnitude de casos diagnosticados envolve as regiões sul e sudeste (LARSSON; MARUYAMA, 2008).

Segundo o estudo, conduzido por Larsson et al. (2006), em São Paulo, a enfermidade é evidenciada com maior frequência em cães de raça definida (83%), de meia idade, qual seja de cães de até cinco anos em 33% da casuística, com amplo intervalo etário (dois a 13 anos) e, principalmente, em fêmeas (66,5%).

Já, na Austrália, o Granuloma lepróide canino é a doença micobacteriana mais comum dentre aquelas de cães. Verifica-se ampla distribuição geográfica dos casos descritos, em vários estados como por exemplo, Nova Gales do Sul, Australia Ocidental, Queensland, Victoria e Tasmânia (MALIK et al., 2006).

Nos Estados Unidos da América do Norte (FOLEY et al., 2002) observaram que nos sete casos reunidos, a doença manteve a similaridade com os relatos australianos e neozelandeses, tanto em aspectos clínicos, como moleculares e bacteriológicos. Enfatize-se que jamais se conseguiu o crescimento micobacteriano dos agentes em quaisquer dos meios de cultivo, a despeito de sua patente presença em material examinado bacterioscópica ou histologicamente.

1.4 APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Na maioria das vezes, os cães acometidos encontram-se em bom estado geral de saúde e não se evidencia o envolvimento de outros órgãos, tais como os linfonodos satélites. (SMITH, 1973; MALIK et al., 1998; LEMARIE, 1999; MALIK et al., 2006).

As lesões tegumentares apresentam-se, primitivamente, como pápulas, nódulos a tumores, firmes à palpação, únicos ou múltiplos, que podem sofrer erosão, necrose central (formações gomosas) ou ulceração. Tais nódulos são indolores à palpação e, na maioria das vezes, estão localizados em região cefálica, mormente na face dorso-lateral dos pavilhões auriculares. De forma menos comum, há o assestamento lesional em regiões distais de membros, base da cauda e da região torácica (LEMARIE, 1999).

Os nódulos micobacterianos podem variar de dois a três centímetros de tamanho, com a possibilidade de evolução para tumores de até cinco centímetros de diâmetro. As formações sólidas menores costumam ser detectadas tão somente como pequenas protuberâncias, enquanto que as maiores tendem evoluir com alopecia, sob a forma de goma e, por vezes, ulceração (MALIK et al., 1998; SCOTT; MILLER JR; GRIFFIN, 2001; FOLEY et al., 2002; SANTORO et al., 2008).

A localização topográfica das lesões tegumentares, assim como a propensão das raças de cães de porte grande e pelame curto, novamente sugerem que insetos possam ser os agentes vetores que inoculam as micobactérias (SMITH, 1973; FOLEY et al., 2002; HUGHES et al., 2004; MALIK et al., 2006; SANTORO et al., 2008).

1.5 DIAGNÓSTICO

A suspeição diagnóstica é bem pressuposta, já durante o exame físico, principalmente, ao se observar a distribuição das lesões e o padrão racial dos animais acometidos. No entanto, recomenda-se que se recorra à consecução dos exames complementares, tais como o citobacterioscópico e o histopatológico cutâneos para a cabal confirmação do diagnóstico (CHARLES et al., 1999).

Embora o diagnóstico etiológico já possa ser pressuposto, quando da realização do exame citobacterioscópico de material aspirado de formações cutâneas, recomenda-se, na maioria das vezes, recorrer-se ao exame histopatológico confirmatório, haja visto a vasta variação do número de bacilos presentes no material obtido (LEMARIE, 1999; TWOMEY; WUERZ; ALLEMAN, 2005).

1.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O diagnóstico diferencial das lesões deve ser estabelecido com várias outras enfermidades pápulo-nódulo-gomosas, sejam de etiologia infecciosa, inflamatória ou neoplásica que acometem o panículo e a pele. A título de exemplo, incluem-se as infecções tegumentares profundas por *Staphylococcus intermedius* ou *Staphylococcus pseudointermedius*, por *Microsporum canis* em pseudomicetomas, por *Sporothrix schenckii* ou *Criptococcus* spp, Síndrome do piogranuloma estéril cutâneo canino e os neoplasmas: histiocitomas, tumores de células basais ou espinhosas e daqueles de mastócitos (MALIK et al., 2001; FOLEY et al., 2002; BIONDI et al., 2009).

Caso as lesões sejam múltiplas, presentes em regiões distintas e nas raças referidas e comumente afetadas, a etiologia micobacteriana pode ser considerada como bem provável (MALIK et al., 1998).

1.7 EXAMES COMPLEMENTARES

Exame citobacterioscópico

As amostras obtidas por punção aspirativa de lesões, tipicamente, demonstram numerosos macrófagos com número variável de linfócitos e plasmócitos e discreto infiltrado neutrofílico. De modo usual, de poucos a moderados bacilos de médio tamanho podem ser detectados no interior de macrófagos ou extracelularmente (GREENE, 2006).

Tais bacilos se apresentam em imagem negativa (“não corados” quase que “transparentes”), quando do uso dos panópticos, podendo ser evidenciados no interior de macrófagos ou no meio extracelular, por ocasião da presença de macrófagos rompidos (CHARLES et al., 1999; SANTORO et al., 2008). Tal tipo de evidenciação decorre da dificuldade do corante em adentrar a parede de constituição lipídica do agente (LEMARIE, 1999; TWOMEY; WUERZ; ALLEMAN, 2005).

Exame histopatológico

Segundo Greene (2006), as lesões presentes, no subcutâneo e na derme, consistem em piogranulomas, compostos, basicamente, por macrófagos epitelióides, células gigantes do tipo Langerhans, com permeio de neutrófilos, plasmócitos e pequenos linfócitos.

A quantidade e a morfologia dos bacilos varia, sendo mais evidentes no interior de macrófagos e de células gigantes. Preferencialmente, os cortes histológicos devem ser submetidos à coloração de Ziehl-Neelsen ou Fite-Faraco para melhor evidenciação (CHARLES et al., 1999; FOLEY et al., 2002; GREENE, 2006; SANTORO et al., 2008).

Detalhadamente, Gross et al. (2005) apresentam a seguinte descrição: “ *a derme e sempre o panículo contêm acúmulo de macrófagos, de forma nodular a difusa, além de neutrófilos (inflamação piogranulomatosa), mesclados no, entremeio, com notáveis agrupamentos de linfócitos e/ou plasmócitos*”. Já, os piogranulomas isolados são raros, estando os neutrófilos dispostos em pequenos grupos ou em formações pustulares maiores. Os macrófagos são grandes e possuem citoplasma claro, pálido e estão sempre como que dispostos “em lâminas” ou em arranjo epitelióide. As células gigantes multinucleadas, de Langerhans, estão presentes em pequeno número (CHARLES et al., 1999). Podendo ser as mesmas difíceis de se evidenciar. Em algumas lesões estas, supostamente, vão regredindo, apresentando-se de forma difusa. Um acúmulo maior de linfócitos distribui-se por toda a preparação ou ao longo das margens externas da lesão.

Quanto à visibilização do agente de “per si”, Gross et al.(2005) enfatizam, baseados em sua experiência pessoal, que os organismos ácido-resistentes do Granuloma lepróide canino são clara e facilmente identificados pela coloração de Fite-Faraco, além de propor ainda, como outra opção, a coloração argêntica, tal como a Metenamina Argêntica de Gomori ou Grocott. Segundo estes últimos autores, as micobactérias apresentam-se distribuídas de forma irregular, totalmente dispersas ou então bem localizadas. Podem ser encontradas, ainda, em macrófagos reunidos como grupos de bacilos pleomórficos, variando de curtos e cocóides a longos, filamentosos, por vezes até em conformação de “contas de rosário” ou em globia.

Com base nos aspectos histopatológicos, o diagnóstico diferencial deve incluir o Granuloma estéril e a Síndrome piogranulomatosa, ou qualquer outra lesão histiocitária como o granuloma em paliçada e os nódulos fibro-histiocíticos reativos. Tanto o Granuloma estéril como a Síndrome piogranulomatosa, produzem lesões multifocais (estas são bem menos comuns no Granuloma lepróide canino) que tendem a “traçar um caminho” ao longo dos folículos pilosos, ao contrário do padrão mais difuso do Granuloma lepróide. No GLC, geralmente, incluem-se mais neutrófilos que nódulos fibrohistiocíticos e granulomas em paliçada. Além do que, os exames em que se recorre às colorações álcool-ácido-resistentes, revelarão os organismos em tela. Já, outras enfermidades micobacterianas em cães não são freqüentes, a exemplo, dos casos de presença de micobactérias de crescimento rápido (Grupo

IV de Runyon) onde estas se mostram em “espaços claros” centrais dos piogranulomas, padrão este distinto daquele que se observa no GLC (GROSS et al., 2005).

Cultivo bacteriológico

Torna-se impossível a confirmação do diagnóstico de GLC, ao se utilizar os clássicos critérios microbiológicos, conhecidos atualmente, uma vez que, ainda não se obteve êxito nas tentativas de cultivo de tais micobactérias, envolvidas na enfermidade (MALIK et al., 2006; SANTORO et al., 2008). Portanto, ainda são desconhecidas as características e as condições ideais *in vitro* que possibilitem o desenvolvimento de tais agentes (MALIK et al., 1998; HUGHES et al., 2000; FOLEY et al., 2002; GROSS et al., 2005).

Deteccão do ácido nucléico

Os métodos de PCR (reação em cadeia de polimerase ou *polymerase chain reaction*) para o diagnóstico do GLC consistem em técnicas relativamente novas e, ainda, restritas aos centros de pesquisa. Faz-se o uso de “primers” universais, que têm a finalidade de amplificar regiões do gene 16S do RNA ribossômico, na tentativa de se identificar a espécie da(s) micobactéria(s) envolvida(s) (GREENE, 2006).

Os estudos comparativos, já executados por PCR, demonstraram que não ocorre variação genética na sequência de bases analisadas e ainda, homologia de 99% a 100% do material de doze cães australianos com aqueles provindos de cães neo-zelandeses e norte-americanos. A espécie micobacteriana, tal como o já referido, ainda não foi identificada mas, sabe-se que filogeneticamente parecem estar relacionadas às espécies *Mycobacterium tilburgi*, *Mycobacterium simiae* e *Mycobacterium genavense* (HUGHES et al., 2000; FOLEY et al., 2002; GROSS et al., 2005; LARSSON et al., 2006; LARSSON; MARUYAMA, 2008; BIONDI et al., 2009).

Mais recentemente, Fyfe et al. (2008) relataram que estas novas espécies micobacterianas, tanto aquelas do Granuloma lepróide canino como as espécies envolvidas na etiologia da Lepra felina podem estar compreendidas no grupo relacionado ao *Mycobacterium simiae*.

Em recente comunicação pessoal, Malik (2010), da Universidade de Sidney, recomenda como forma de menção mais adequada, cepa CLG de *Mycobacterium* sp. (*Mycobacterium* sp. “strain” CLG) ou “novel” *Mycobacterium* sp, causadora de CLG.

1.8 TRATAMENTO

Segundo grande parte dos trabalhos compulsados, a maioria dos casos da enfermidade são tratados de forma exitosa pela excisão cirúrgica ou, até mesmo, poder-se-ia observar a resolução espontânea. (MALIK et al., 2004; TWOMEY; WUERZ; ALLEMAN, 2005). Deve-se ressaltar, ainda, que os autores australianos compararam o caráter auto-limitante da enfermidade nos cães como aquele que, também, ocorre em alguns casos de hanseníase humana (MALIK et al., 2001).

Conforme Malik et al. (2006) por se tratar de enfermidade na qual se suspeita que haja envolvimento de micobactérias sapróbias, os protocolos de tratamento correspondem às combinações de antibióticos sistêmicos, efetivos contra micobactérias que não aquelas da tuberculose, dentre os quais cita-se: rifampicina, quinolonas, claritromicina, clofazimina e doxiciclina.

2 OBJETIVOS

A despeito da sabida existência de diagnósticos estabelecidos de Granuloma lepróide canino no Brasil, desde a década de 80, inexistente publicação, em periódicos, de casuística congregando casos evidenciados dentre espécimens caninos, criados nas condições brasileiras. Visando preencher tal lacuna objetivou-se:

- 1) coligir e analisar, retro e prospectivamente, prontuários de casos de Granuloma lepróide canino diagnosticados no Serviço de Dermatologia (SD) do Departamento de Clínica Médica (VCM) e do Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).
- 2) determinar as características epidemiológicas do Granuloma lepróide canino.
- 3) analisar a resultante da terapia interposta, naqueles casos submetidos a pleno seguimento clínico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

A amostragem consistiu de trinta e sete animais da espécie canina, atendidos no decorrer de um vintênio junto ao Serviço de Dermatologia (SD) do Departamento de Clínica Médica (VCM) e do Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ/USP, com diagnóstico estabelecido de Granuloma leproide canino, constatado pelo exame citobacterioscópico e/ou histopatológico tegumentares.

Para a inclusão no estudo não se obedeceu critérios de inclusão ou exclusão pré-determinados afora aquele do cabal diagnóstico estabelecido. Todos os animais foram atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/USP, no período compreendido entre janeiro de 1990 a março de 2010. Os dados obtidos de janeiro de 1990 a dezembro de 2007 constituíram o “grupo retrospectivo”, enquanto que os animais atendidos posteriormente compuseram o “grupo prospectivo”.

3.2 METODOLOGIA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O levantamento baseou-se na análise de prontuários registrados junto ao HOVET, compilando-se os dados dispostos na resenha, anamnese, exames: físico geral, dermatológico e subsidiários (citobacterioscópico cutâneo, histopatológico de biópsia lesional tegumentar) e dos protocolos de terapia empregados.. Os diagnósticos histopatológicos provieram de laboratório de dermatopatologia paulistano¹

¹ Laboratório Paulista de Dermatopatologia, Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 4315, São Paulo-SP.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS COM GRANULOMA LEPRÓIDE CANINO INCLUÍDOS NO ESTUDO RETRO E PROSPECTIVO

Dos 37 animais incluídos no estudo retro e prospectivo, 19 (51,4%) eram machos e os 18 (48,6%) remanescentes tratavam-se de fêmeas.

Quanto à definição racial e a raça, observou-se que 31 (83,7%) daqueles eram cães de raça definida e seis (16,3%) não apresentavam plena definição racial.

Com relação à distribuição de frequência, em número e percentagem dos cães com Granuloma lepróide canino, de acordo com a definição racial, os dados coligidos encontram-se dispostos na tabela 1, permitindo que se evidencie que a raça mais acometida foi a Boxer (19-61,2% dos cães), vindo a seguir as raças Pastor Alemão e Labrador (ambas com dois casos – 6,4%) e as demais oito raças de animais enfermos, cada uma delas com um animal (3,2%) infectado.

Com referência ao comprimento do pelame (Apêndice A), todos os animais reputados como sem raça definida compartilhavam a característica pelame curto. Ao passo que, os animais de precisa definição racial estavam distribuídos da seguinte forma: 27 (87%) apresentavam pelame curto e quatro (13%) eram de pelame longo. Ainda, dentre os cães de raça definida pôde-se constatar 29 (93,5%) eram animais de grande porte e dois (6,5%) de pequeno ou médio porte.

Da totalidade dos animais (37/100%), pôde-se compilar dados relacionados ao local de residência de apenas 29 (78,4%) cães. Foram citados bairros e distritos (Brooklin, Butantã, Interlagos, Jabaquara, Jaguaré, Lapa, Morumbi, Perdizes, Pinheiros, Rio Pequeno e São Miguel) da Grande São Paulo, além de vários municípios como: Bragança Paulista, Carapicuíba, Caucaia do Alto, Embu-Guaçu, Franco da Rocha, Juquitiba, Mairinque, Osasco, São Roque e Ubatuba (Apêndice A).

Tabela 1 – Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a definição racial e raça. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

Definição Racial / Raça		Nº	%
SRD		6	16,3
CRD		31	83,7
Boxer	19 (61,2)		
Pastor Alemão	2 (6,4)		
Labrador	2 (6,4)		
Doberman	1 (3,2)		
Terrier Brasileiro	1 (3,2)		
Mastiff	1 (3,2)		
Fila Brasileiro	1 (3,2)		
Golden Retriever	1 (3,2)		
Cocker Spaniel	1 (3,2)		
Pitbull	1 (3,2)		
Bulldogue	1 (3,2)		
Total		37	100

Em relação à faixa etária dos cães, esta variou de um a 13 anos, sendo que a média, moda e a mediana de idade, quando da primeira consulta, foram de, respectivamente, de 5,5, 04 e 07 anos (Apêndice A). Do total de 37 animais envolvidos no estudo, 20 (54,1%) estavam quando do primeiro atendimento, na faixa etária que correspondia àquela de quatro a seis anos de idade (Tabela2).

Tabela 2 – Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a faixa etária (anos). Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

Faixa etária (anos)	Nº	%
1 a 3	8	21,6
4 a 6	20	54,1
7 a 9	5	13,5
≥ a 10	4	10,8
Total	37	100

O início do quadro lesional referido, era aquele que correspondeu principalmente, ao período que compreende as temperaturas mais altas do ano. Ou seja, entre os meses primaveris e estivais foram observados 23 (62,1%) casos, enquanto que no período de outono e inverno compreendeu 14 (37,9%) dos animais acometidos (Apêndice B).

As lesões tegumentares mais comumente observadas nos cães acometidos foram os nódulos (75,6%), seguindo-se as úlceras (45,9%), ou seja aquelas classificadas como formações sólidas e perdas teciduais. Constatou-se, também, a descrição de presença de alopecia, eritema, hiperpigmentação, pápulas, tumor, crostas e erosão nos dermatogramas dos animais avaliados, estando tais lesões associadas entre si, na maioria das vezes (Apêndice C).

O prurido por sobre as lesões, foi mencionado como ausente em 18 (48,7%) dos cães e presente em 19 (51,3%) deles (Apêndice C). Nestes últimos, na forma discreta em três (15,8%) , intensa em cinco (26,3%). Em 11 (57,9%) casos, os proprietários ou prepostos não conseguiram definir de forma precisa a intensidade do prurido.

Quanto à distribuição das lesões, verificou-se o predomínio destas, por sobre os pavilhões auriculares (86,5%), sendo que em 18 (48,6%) animais o acometimento lesional era unicamente auricular e em 14 (37,9%) as lesões assestavam-se na face dorsal das orelhas e também em outro sítio corpóreo (Tabela 3).

Dentre os que relatavam unicamente lesões auriculares, observou-se unilateralidade em sete (38,9%) e bilateralidade em 11 (61,1%) deles (Tabela 4). Em contrapartida, cinco (13,5%) cães apresentaram lesões somente em áreas do corpo, que não os pavilhões auriculares, identificadas como regiões cefálica (plano nasal), torácica (ventral), podal e abdominal (ventral) (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a topografia lesional. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

Localização das lesões	Nº	%
Somente em pavilhões auriculares	18	48,6
Pavilhões auriculares e outras regiões corpóreas	14	37,9
Regiões corpóreas exceto pavilhões auriculares	5	13,5
Total	37	100

Tabela 4 - Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a distribuição lesional, quando localizada apenas em pavilhões auriculares. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

Pavilhões auriculares	Nº	%
Unilateral	7	38,9
Bilateral	11	61,1
Total	18	100

A evolução do quadro lesional foi referida criteriosamente, pelos proprietários de apenas 29 (78,4%) animais dos 37 incluídos no estudo, uma vez que em oito (21,6%) deles, desconhecia-se o tempo de decurso (Apêndice B). Dentre os 29 cães, a variação oscilou entre sete e 1095 dias, sendo que o período citado, com mais frequência foi aquele de 30 dias, em 8 (28%) animais, configurando-se com tempo evolutivo médio de 111,3 dias (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição (%) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo o tempo de evolução lesional (dias). Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

Pela avaliação dos dados anamnéticos, observou-se que dos 37 animais incluídos no estudo, 20 (54%) haviam sido submetidos a tratamento pretérito, principalmente com cefalosporínico (cefalexina) em sete (35%) deles. Já, os outros 17 (46%) cães remanescentes não haviam sido tratados até então (Tabela 5).

Tabela 5 – Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo tratamento pretérito à primeira consulta e fármaco empregado. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

Tratamento pretérito	Nº	%
Sim	20	54
Cefalexina	7	35
Outros ¹	13	65
Não	17	46
Total	37	100

¹Fármacos de distintas classes e de uso tópico ou sistêmico: esteróides, anti-fúngicos e antissépticos.

Da totalidade dos animais com diagnóstico firmado de Granuloma leproide canino, nenhum apresentava diagnóstico prévio da enfermidade, antes do comparecimento à primeira consulta no HOVET da FMVZ/USP.

No que concerne ao procedimento visando o diagnóstico da doença este foi cabalmente estabelecido apenas com base no exame citobacterioscópico cutâneo (Apêndice D, figuras 1 e 2) em oito (21,6%) animais; somente com o exame histopatológico cutâneo (Apêndice E, figura3) em 21 (56,8%) dos cães e, por ambos os exames em oito (21,6%) deles (Tabela 6).

Tabela 6 – Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma leproide canino, segundo a positividade nos métodos de diagnóstico. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

Positividade	Nº	%
Citobacterioscópico	8	21,6
Histopatologia	21	56,8
Citobacterioscópico e histopatologia	8	21,6
Total	37	100

Da avaliação de 20 laudos histopatológicos cutâneos, na sua totalidade foram evidenciados os bacilos álcool-ácido-resistentes no citoplasma de macrófagos, mediante ao uso da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen. A caracterização do quadro microscópico compreendeu, sumariamente, em solução de continuidade da epiderme, presença de infiltrado inflamatório na derme, composto por histiócitos, plasmócitos, linfócitos e neutrófilos; eventual presença de necrose de coagulação e, por vezes, macrófagos formando granulomas nodulares.

O tratamento sistêmico preconizado, por via oral, seguiu basicamente três tipos de protocolo: a base de ansamicínico (rifampicina), de quinolona (enrofloxacina) e de tetraciclina (doxiciclina). Já, a terapia tópica preconizada, foi a de sabonetes antisséptico de triclosan, sucedida pela aplicação de rifamicina, em “spray”, por sobre as lesões. Somente em um (2,7%) cão utilizou-se de medicação tópica como terapia única (Apêndice B).

A rifampicina foi o pioneiro tratamento preconizado, dito “protocolo brasileiro”, sendo prescrita para 12 (32,4%) animais, até meados dos anos 90. Posteriormente, seguiu-se com a

prescrição da enrofloxacin em 22 (59,5%) cães e, nos anos de 2009 e 2010, dois (5,4%) pacientes foram submetidos à doxiciclina (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequência (Nº e %) de cães com Granuloma lepróide canino, segundo a prescrição medicamentosa. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

Prescrição	Nº	%
Rifampicina	12	32,4
Enrofloxacin	22	59,5
Doxiciclina	2	5,4
Tópico apenas (rifamicina)	1	2,7
Total	37	100

No entanto, verificou-se que da prescrição medicamentosa sistêmica para a totalidade dos animais (37/100%), apenas 22 (59,5%) deles foram submetidos ao tratamento até o estabelecimento da alta clínica.

O período de tratamento, variou conforme o fármaco empregado. No caso da rifampicina oscilou entre 30 e 180 dias, sendo que quatro (50%) dos cães obtiveram a alta clínica já em cerca 30 dias, configurando, em média, 78,3 dias de terapia. Em relação à enrofloxacin, o tempo de terapia oscilou entre 60 a 150 dias, enquanto que em 08 (72,7%) dos casos a cura clínica foi proposta entre o sexagésimo e nonagésimo dia de medicação, ou seja, em média 90 dias de tratamento. Em termos médios, a alta foi interposta após 84 dias de terapia. Já, a doxiciclina, pelo seu uso ainda incipiente na rotina do Serviço, em um animal foi utilizada por 90 dias e um outro, continua (março de 2010) sob tratamento (Apêndice B).

5 DISCUSSÃO

Quanto à caracterização epidemiológica da amostragem ora compilada, em levantamento retro e prospectivo, de período de vinte anos de atendimento, em hospital-veterinário-escola, de casos de Granuloma lepróide canino, evidenciou-se 37 animais acometidos pela enfermidade tegumentar sem reflexos sistêmicos. Dentre eles, foi observada clara predisposição dos animais de raça definida (83,7%), fato já confirmado tanto em trabalhos nacionais como internacionais. Na maior das casuísticas, qual seja, aquela oriunda da Austrália, dentre as raças envolvidas em maior número estão: Boxer, Bull Terrier, Dálmata, Dobermann, Whippet, Rhodesian Ridgeback, Pastor Australiano e Staffordshire Bull Terrier. O Boxer e os animais mestiços de tal raça corresponderam a 48% dos cães com raça definida, além de 41 (93%) dos 44 cães do estudo serem de pelame curto (MALIK et al., 1998; MALIK et al., 2006).

Como se pode depreender pela análise dos dados dispostos na tabela 1, o Boxer correspondeu a 61,2% dos cães de precisa definição racial, seguindo-se do Pastor Alemão e Labrador, ambas representadas por dois (6,4%) exemplares de cada raça. Ou ainda, os animais com raça definida estiveram presentes em 83,7% dos casos.

Segundo Malik e Hughes (2004), os cães da raça Boxer e seus cruzamentos respondem por cerca de metade dos casos australianos por eles reportados, o que indica evidente propensão racial. Na Argentina, Baraboglia e Baraboglia (2009) relataram, em trabalho congregando 08 cães, que apenas um deles não apresentava plena definição racial. Ainda, em outro estudo portenho, Jorge et al. (2009) referiram a ocorrência da enfermidade em três Boxeres.

É notória a prevalência de cães com raça definida e em especial, os Boxeres, o que é referido de forma contumaz em todas as latitudes. Em outras localidades do Brasil como: no interior de São Paulo, em Jaboticabal (COSTA et al., 2007), Distrito Federal (SEIXAS et al., 2008), Rio de Janeiro (CÁRDIA et al., 2009), Minas Gerais (ACHA, 2009) e Paraná (BIONDI et al., 2009; FARIAS et al., 2008), a maioria dos relatos envolvem os cães de precisa definição racial. Na Capital do Estado de São Paulo, em levantamento pretérito, tal predisposição era bastante clara (LARSSON et al., 1990, 1995, 2000). Nos Estados Unidos da América do Norte, na Universidade da Flórida, descreve-se o quadro assestado em cão da raça Labrador (TWOMEY; WUERZ; ALLEMAN, 2005), enquanto que na Universidade da Pensilvânia é descrito o acometimento de cães de distintas raças, tais como Rottweiler, Beagle, Greyhound, Springer Spaniel Inglês, afora em outros sem raça definida (MAULDIN;

GOLDSCHMIDT; RANKIN, 2004). Possivelmente, a predileção observada sobre determinadas raças, esteja relacionada a fatores de imunocompetência (GROSS et al., 2005).

Há que se ressaltar, em termos de ocorrência, que se pôde evidenciar, neste levantamento, o acometimento de caninos da raça Pastor Alemão, raça esta extremamente freqüente em ambulatórios e hospitais veterinários, na segunda metade do século passado. Cães desta raça, bem como os Golden Retriever e Cocker Spaniel, constituíram-se nos animais de raça definida e de espesso e longo manto piloso que secundaram a casuística em termos de freqüência (12,8%).

Tal magnitude de ocorrência é referida em trabalhos congêneres de Foley et al. (2002); Mauldin, Goldschmidt e Rankin (2004); Gross et al. (2005) e Twomey, Wuerz e Alleman (2005).

Nos cães com raça definida, há que se destacar que houve preponderância daqueles de porte mais avantajado (93,5%), uma vez que os de pequeno a médio porte (Terrier brasileiro e Cocker spaniel) representaram tão somente 6,5%, com um exemplar de cada raça. Fato igualmente evidenciado nos trabalhos compulsados nas referências consultadas tanto brasileiros como estrangeiros (ACHA, 2009; FARIAS et al., 2006; FARIAS et al., 2008; LARSSON et al., 1995; LARSSON et al., 2000; MALIK et al., 1998; MALIK et al., 2001).

Em relação ao comprimento do manto piloso, constatou-se que a maioria (87%) dos cães acometidos apresentavam pelame curto, fato evidenciado igualmente por Malik et al. (1998) que referiram percentil da ordem de 93% em seu levantamento de casos da Australásia. Entretanto, em estudos norte-americanos (FOLEY et al., 2002; MAULDIN; GOLDSCHMIDT; RANKIN, 2004) foi constatada participação mais significativa de raças ditas hirsutas, tais como Pastor alemão, Border Collie, Airedale Terrier e Springer Spaniel. Quiçá, retratando o modismo criatório com maior magnitude populacional de animais com comprimento piloso condizente com clima mais adverso, ou seja, de zonas temperadas.

A idade dos cães reunidos neste arrolamento de dados, revelou ampla distribuição em todas as faixas etárias, que variam desde um a 13 anos de vida. No entanto, 54,1% dos animais acometidos, apresentavam, no momento do diagnóstico, idade compreendida entre quatro e seis anos têm entre 04 a 06 anos. Tal média condiz com aquela obtida no primeiro grande levantamento levado a cabo por Malik et al. (1998), na Austrália.

Já, nos Estados Unidos da América do Norte, Foley et al. (2002) descreveram o quadro clínico em sete cães com idade compreendendo cinco a 12 anos. Na América do Sul, na Argentina, Baraboglia e Baraboglia (2009) observaram que dentre sete cães, a média de idade foi de três anos de vida.

Ao comparar a distribuição de frequência segundo as faixas de idade com pretéritos trabalhos brasileiros, que congregaram mais de uma dezena de animais, pode-se verificar a similitude de distribuição com casos paulistanos (70%) e média de sete anos e meio de vida, para os casos curitibanos.

No que tange à variável sexo, não se observou significativa predisposição sexual, uma vez que da totalidade dos animais considerados, 19 (51,4%) eram machos. Tal assertiva já houvera sido referida em clássico tratado (GROSS et al., 2005) em que se destacou os achados de Malik et al. (1998) que, também, não notaram evidente diferenças na distribuição da doença entre os sexos. No entanto, é prudente observar que alguns trabalhos brasileiros envolvendo casuísticas paulista (66,6%) e paranaense (61,5%), há discreta tendência de acometimento de fêmeas (LARSSON et al., 1995; LARSSON et al., 2000; FARIAS et al., 2006; FARIAS et al., 2008).

O fato do surgimento das lesões se concentrar em épocas de temperatura ambiente mais elevada, qual seja na primavera e no verão, envolvendo 62,1% dos animais, corroborou estudo pretérito, realizado por Larsson et al. (2000), no qual se verificou que 60% e 20% dos casos ocorreram no verão e apenas um quinto da casuística (20%) ocorreu no inverno. Já, no Paraná, também em estudo retrospectivo congregando cerca de uma dezena e meia de casos, Farias et al. (2008) observaram que a maioria dos cães manifestou o quadro na primavera.

No hemisfério Norte, Mauldin, Goldschmidt e Rankin (2004) referiram a totalidade de casos ocorrendo nos meses correspondentes àqueles da primavera e verão. Em países da Oceania, por sua vez, a incidência é maior segundo Malik et al. (1998), nos meses outonais e inverniais, a despeito da presunção de maior ocorrência de dípteros picadores e sugadores no decorrer da primavera e verão.

Ainda, segundo os supracitados autores australianos, isto ocorreria pelo fato da micobactéria tornar-se ativa, quando em temperaturas ditas ideais. A guiza de mera especulação, Malik et al. (1998) consideraram que a sazonalidade lesional poderia decorrer do decurso evolutivo necessário à proliferação do agente frente a barreira imune interposta após a inoculação.

O assestamento das lesões, preferencialmente, nos pavilhões auriculares (Apêndice F, figura 4), ora constatado em 86,5% dos animais, corrobora plenamente os dados dispostos na bibliografia internacional. Tal como no estudo conduzido por Mauldin, Goldschmidt e Rankin (2004) nos EUA, onde 84,6% dos cães apresentavam lesões auriculares. Coincidentemente, o percentil de 85%, também, é referido por Malik et al. (1998) na Austrália, ao avaliar 45 cães com lesões presentes em região cefálica e de pavilhões auriculares. Também, em estudo

pregresso de casuística da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conduzido por Larsson et al. (1995) e Larsson et al. (2000) obteve-se, respectivamente, os percentis de 70% e 100%. Afora os pavilhões, há referência no surgimento de lesões em região cefálica próxima às orelhas, qual seja, o plano nasal evidenciado tanto por Twomey, Wuerz e Alleman (2005), como por Baraboglia e Baraboglia (2009). É sabido que muitos dípteros são atraídos pelo ar expirado, rico em dióxido de carbono, que se concentra mormente nas proximidades das narículas.

O tempo de evolução do quadro se mostra bem variável, oscilando entre alguns poucos dias e até meses de evolução, o que denota um assestamento lento das lesões e levando até a um pressuposto prognóstico favorável, devido à baixa virulência do agente etiológico. Trata-se de consenso entre os casos relatados, não só no Brasil como em outros países que, na maioria das vezes, o cão acometido não apresenta sintomas de doença sistêmica ou que afete a sua higidez. Ao contrário, tais animais são referidos como aparentemente saudáveis, sem alterações dignas de nota em outros órgãos e com ausência de comprometimento linfonodal (SMITH, 1973; FINNIE, 1978; LEMARIE, 1999; MALIK et al., 2001; SCOTT, 2001; MALIK e HUGHES, 2004; LARSSON; MARUYAMA, 2008).

No entanto, há que se destacar que em 28% dos animais do presente estudo, os proprietários revelavam o início da manifestação tegumentar há pelo menos 30 dias. Ou seja, naquele interregno a lesão tornava-se perceptível, pois o aspecto macroscópico dos nódulos e úlceras, intrigava e até causava, repulsa levando-os a buscar atendimento médico-veterinário.

Por outro lado, por vezes, o tardar de encaminhamento do animal à consulta veterinária, pode ser compreendido justamente pelo caráter auto-limitante da doença, restrito ao quadro tegumentar e sem acometimento sistêmico. Tal premissa é retratada em vários outros estudos nos quais se relatou o longo decurso, associado à uma pretensa remissão espontânea da doença (FOLEY et al., 2002; GROSS et al., 2005; MALIK et al., 1998; MATOUSEK, 2004; SCOTT, 2001). No Brasil, o mesmo não pode ser constatado segundo Larsson e Maruyama (2008), uma vez que nos casos atendidos no HOVET da FMVZ-USP, jamais se optou pela conduta expectante em nenhum deles, até para minimizar a aflição dos proprietários dos animais acometidos que buscavam o atendimento nosocomial.

Ainda devido ao peculiar e, por vezes, longo decurso temporal da enfermidade, previamente à consulta no HOVET da FMVZ-USP, e sem um preciso diagnóstico firmado, ocorreu a interposição terapêutica de medicamentos das mais variadas classes e apresentações. Dentre os animais incluídos no estudo, pela análise dos prontuários pôde-se verificar que a título de terapia pretérita, a antibiose com cefalosporínico foi a mais freqüente,

açambarcando 35% dos casos. A prescrição empírica de antibióticos sugere, a suspeição inicial, de parte dos clínicos que tentavam solucionar o quadro, de que se tratasse de quadro infeccioso, embora, em nenhum dos casos, segundo os dados anamnéticos, houvesse sido aventado a etiologia micobacteriana.

O desconhecimento da ocorrência da enfermidade por muitos clínicos veterinários é, também, referido em outras latitudes, em outros países. Gross et al. (2005) afirmam que, seguramente, há muito mais casos desta micobacteriose pois, ainda hoje, se constitui em dermatopatia pouco conhecida, quiçá por ser paucissintomática e de decurso relativamente benigno.

Embora, à primeira vista, se possa tentar estabelecer o diagnóstico com base nos dados da resenha, decurso evolutivo, topografia e tipo lesional, sempre se deve buscar a consecução do diagnóstico dito etiológico, tanto pelos exames citológico e bacterioscópico como, e principalmente, pelo histopatológico de lesões biopsiadas, já que o desejado êxito no cultivo bacteriológico é, ainda hoje, inalcançável (CHARLES et al., 1999).

Na marcha diagnóstica dos casos ora reunidos e analisados, verificou-se que a grande maioria dos diagnósticos foram estabelecidos com base na histopatologia (56,8%), seguidos daqueles firmados pela citobacterioscopia (21,6%) e por ambos os procedimentos (21,6%). Autores australianos e brasileiros (MALIK et al., 1998, CHARLES et al., 1999; FARIAS et al., 2009), consensualmente, consideram a citobacterioscopia como procedimento prático, exequível de baixo custo. Segundo Malik et al. (1998) a sua praticidade se sobrepõe à acurácia, principalmente naqueles casos em que o proprietário reluta em submeter seu cão a procedimento cruento e bem mais invasivo, segundo sua própria óptica. Charles et al, (1999) consideram-na uma opção atrativa pois, afora a facilidade de execução, se presta como direcionador do protocolo inicial de terapia enquanto se aguarda o laudo histopatológico.

O exame histopatológico respondeu, respectivamente, por 56,8 ou 21,6% dos diagnósticos, quando considerados como procedimento isolado ou associado à citobacterioscopia. Trata-se portanto de exame subsidiário de eleição, em face a já referida impossibilidade de cultivo do agente.

As colorações recomendadas por dermatopatólogos (GROSS et al., 2005; MICHALANY; MICHALANY, 1984²) incluem as argênticas de Gomori ou Grocott, Fite-Faraco e a de Ziehl-Neelsen. Aquelas de Gomori e Ziehl-Neelsen foram as corriqueiramente empregadas em toda casuística ora reunida.

O emprego destas colorações, ditas especiais, é mandatório e de suma importância já que o quadro histológico de base, qual seja, o piogranulomatoso é, também, evidenciado em outras dermatopatias. Segundo Cornegiani et al. (2005), deve haver extremo cuidado na diferenciação do quadro do Granuloma lepróide canino com aquele do piogranuloma estéril, que tem etiologia controvertida, hipoteticamente oriundo de resposta imune do acometido à presença de antígenos geradores de flogose granulomatosa, a exemplo da leishmaniose e do próprio Granuloma lepróide canino. Ressaltaram Santoro et al. (2005) que a PCR deve, quando possível, ser empregada visando a exclusão de presença de eventuais agentes infecciosos em quadros piogranulomatosos ditos estéreis, tendo em vista a grande diferença de classe de drogas recomendadas para uma ou outra enfermidade, qual sejam, os esteróides ou os antibióticos.

Deve-se, tal como o executado, segundo os laudos histopatológicos apenas aos prontuários consultados, sempre diferenciar o Granuloma lepróide canino de quadros neoplásicos, bastante contumazes em Boxeres, do quérion dermatofítico, de micoses intermediárias ou sistêmicas, de quadros histiocitários solitários (granuloma em paliçada ou nódulos fibrohistiocíticos).

Pela compulsão da bibliografia atinente à micobacteriose, é fato notório o predomínio de trabalhos australianos, uma vez que aquele país detém a maior casuística de quadros de Granuloma lepróide canino. Nos protocolos terapêuticos preconizados na Universidade de Sidney, o que se utilizou com maior frequência foram os protocolos em monoterapia ou em terapia associada, com rifampicina, claritromicina e clofazimina (MALIK; HUGHES, 2004). Destarte, Malik et al. (2006) recomendaram o uso das seguintes associações: rifampicina com claritromicina e rifampicina com doxiciclina, sem deixar de alertar para o custo elevado da claritromicina. Já, nos Estados Unidos da América do Norte, Mauldin, Goldschmidt e Rankin (2004) utilizaram-se de monoterapia com doxiciclina ou orbifloxacina, com pleno sucesso.

²Informação verbal fornecida por Michalany e Michalany ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson (FMVZ/USP) em São Paulo, em 1984.

No Brasil, Farias et al. (2009) recomendaram, em esquema de monoterapia ou de associação, os seguintes fármacos: claritromicina, doxiciclina e fluorquinolonas. No entanto, no mesmo estudo, aqueles autores afirmam que em casos refratários quando do uso da enrofloxacin, o emprego subsequente de doxiciclina se mostrou bem mais promissor.

Na Argentina, Baraboglia e Baraboglia (2009) utilizaram tanto protocolos de rifampicina associada à claritromicina, como de enrofloxacin em terapia única, obtendo resultados semelhantes. Naquele mesmo país limítrofe, Jorge et al. (2009) usaram rifampicina com claritromicina em três animais com bons resultados, sendo que em um deles foi necessária a exérese cirúrgica prévia.

Pela análise dos prontuários coligidos verificou-se êxito na terapia do Granuloma leproide canino em 22 (59,5%) animais tratados e que foram submetidos a seguimento clínico até a consecução da alta clínica (Apêndice G, figura 5 e Apêndice H, figura 6). Destes, respectivamente, 11 (50%), oito (36,4%) e apenas dois (9,1%) foram medicados com antibióticos quinolônicos, ansamicínico e tetraciclínico. Com a ressalva que um (4,5%) animal foi tratado somente com medicação tópica à base de rifamicina. Sobre os demais 15 (40,5%) casos medicados, a despeito da sabida resolução com êxito, nada se considerará pois o acompanhamento clínico presencial não ocorreu a contento. É comum nas lides clínicas não se obter os retornos nas datas aprezadas por pura comodidade dos proprietários quando da resolução do quadro clínico que acometia seus animais.

O tempo de tratamento necessário para a obtenção da alta com a terapia ansamicínica oscilou entre 30 e 180 dias, com média de 78,3 dias, já com a quinolona, ocorreu entre 60 e 150 dias, propiciando a média de 90 dias. Ou seja, houve pequena ou quase que inexistiu diferença temporal entre os dois protocolos (média entre os mesmos foi de 84,1 dias), com uma melhora pouco mais rápida com a rifampicina. Pelo exíguo número de casos tratados com tetraciclínico permite-se não cotejá-los com os dois outros esquemas de terapia.

Dos antibióticos empregados, a rifampicina, administrada parenteralmente, foi utilizada nos primeiros casos diagnosticados, por sugestão de dermatólogo hansenólogo, docente da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, nos anos 80. Aquele professor quando instado por Larsson³ que buscava orientação quanto a terapia de enfermidade micobacteriana, ainda não diagnosticada no Brasil, sugeriu-lhe, embasado em experiência profissional, o emprego parenteral do ansamicínico. Tal classe de antibiótico é, ainda hoje, reputada como ativo de primeira linha no tratamento da hanseníase humana. Constitui-se em derivado do piperazínico da rifamicina SV extraída do *Streptomyces mediterranei*, com ação bactericida contra *Mycobacterium leprae*, atuando por inibição da RNA polimerase dependente do DNA (SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

Trata-se de antibiótico rapidamente absorvido quando administrado em jejum, com pico de ação entre duas e quatro horas e com vida média de três a cinco horas em pacientes humanos (SAMPAIO; RIVITTI, 2008). Em pacientes caninos descreve-se a vida média de oito horas. Após sua absorção é metabolizada no fígado em composto diacetilado que também é dotado de ação antibacteriana. Tanto o metabólito como o antibiótico não metabolizado são eliminados pela bile e até 30% através da urina, conferindo à esta, à secreção lacrimal e à saliva coloração vermelho alaranjada (PAPICH, 2007; PLUMB, 1999).

Considera-se droga bem tolerada, tanto por pacientes animais (eqüinos, caprinos, caninos) como em humanos. Como reações adversas refere-se a ocasionais quadros de hepatopatia (hepatite medicamentosa) e purpúricos (trombocitopenia) e, muito raramente, desencadeando as Síndromes de Stevens-Johnson e Lyell. Pode interagir com múltiplas drogas por ser potente indutor da enzima citocromo P450 (PAPICH, 2007; SAMPAIO; RIVITTI, 2008). Até então, somente havia indicação de uso em medicina veterinária em infecções por *Rhodococcus equi* (eqüinos), *Aspergillus* sp e *Histoplasma* sp (caninos e felinos).

O êxito obtido com seu emprego, sem a detecção de efeitos adversos em todos os oito animais tratados, redundou em outros ensaios de eficácia realizados na Austrália e Argentina (MALIK et al., 1998, BARABOGLIA; BARABOGLIA, 2009; JORGE et al., 2009;). Em face ao sucesso de tal conduta de tratamento, de casos de Granuloma lepróide canino, gerou o epônimo de “protocolo brasileiro” de terapia micobacteriana tegumentar.

³Informação verbal fornecida pelo Prof. Dr. Estevam de Almeida Neto (FM/USP) ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson (FMVZ/USP) em São Paulo, em 1984.

No início dos anos 90, com relatos anedóticos de surgimento de efeitos colaterais, retratado por desencadeamento de hepatite medicamentosa em cão tratado em São Paulo⁴, passou-se a empregar, tal como o evidenciado na análise retrospectiva de prontuários de 11 cães, da quinolona, enrofloxacin.

A enrofloxacin constitui-se em antibiótico fluorado, com ação bactericida, inibindo a síntese do DNA bacteriano. O alvo da atividade são as topoisomerasas, quais sejam, enzimas que regulam o superespiralamento (“supercoiling”) do DNA. Destas enzimas, respectivamente, as topoisomerasas II e IV, são as mais sensíveis considerando-se as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Estruturalmente estão relacionadas às ciprofloxacinas, aliás 30 a 40% da enrofloxacin circulante é metabolizada à ciprofloxacina, sendo ambos os metabólitos eliminados pela urina e fezes. Ambas têm espectro de ação similar, agindo sobre cocos e bacilos Gram-negativos, *Mycobacterium* sp, *Brucella* sp, *Staphylococcus* sp (incluindo os betalactamases e metilicilina resistentes) dentre outros (PLUMB, 1999; RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2009). Têm indicação de uso em caninos, felinos, bovinos e aves. A biodisponibilidade da enrofloxacin é superior àquela da ciprofloxacina após a administração “per os”. A vida média em termos de eliminação, diferente da enrofloxacin, oscila entre quatro e seis horas. Os efeitos adversos envolvem o desencadeamento de lesões cartilagueas em animais jovens (dois a oito meses de idade), sintomas gastrintestinais, cristalúria, cambaleios e excitabilidade. Refere-se ainda, interação medicamentosa com antiácidos, sucralfato, teofilina, probenicida e evidente sinergismo com outras classes de antibióticos, tais como aminoglicosídeos e cefalosporínicos (PLUMB, 1999).

Pela compulsão dos prontuários dos 11 cães tratados com enrofloxacin, também não se referiu a ocorrência de efeitos adversos, sistêmicos ou tegumentares.

É consensual segundo, todos os trabalhos até hoje publicados a recomendação de um período mínimo de 30 dias de tratamento, com quaisquer um dos fármacos, isoladamente ou em associação. O período de duração da terapia se mostra bastante variável e, geralmente, deve se prolongar até a plena resolução das lesões, redundando, em média, 84 dias de tratamento.

⁴Informação verbal fornecida pelo Prof. Dr. Ronaldo Lucas (UNISA) ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson (FMVZ/USP) em São Paulo.

Pela análise do arrolamento de bairros de domicílio dos cães acometidos, notou-se que alguns destes incluíam regiões periféricas da cidade de São Paulo, por vezes bem distantes do chamado marco zero da Capital, bairros estes menos urbanizados e, conseqüentemente, dispondo de muita vegetação e bem arborizados. O mesmo se pôde observar nas outras localidades listadas tendo, o fato das residências disporem de quintais e, muitas vezes, estarem situadas em áreas rurais, tais como sítios e chácaras. Soma-se a isso, a presença de mosquitos no ambiente, algo bastante referido por uma significativa parcela dos proprietários. Portanto, tem-se fatos relativos à ambiência que vinculam-se entre si: cães de médio a grande porte, (93,5%) dentre os de raça definida, mantidos portanto em ambientes extradomiciliar, bem mais à mercê de picadas de mosquitos o que poderia permitir a pressuposição de que fossem tais dípteros os vetores da enfermidade. Um fato importante a ressaltar é que as picadas de mosquito, já despertaram tal hipótese, desde os primeiros relatos da doença, por Richard Smith, em 1973 que, com o passar dos anos tal hipótese só vem angariando mais adeptos a ela (MALIK et al., 1998; LEMARIE, 1999; SCOTT; MILLER; GRIFFING, 2001; FOLEY et al., 2002; USLAN et al., 2006; FARIAS et al., 2008; SEIXAS et al., 2008).

Além disso, o surgimento insidioso (111 dias, em média) das lesões, localizados principalmente em pavilhões auriculares (86,5%), áreas corpóreas estas tidas como de temperatura mais baixa, reforça a hipótese de que a micobactéria em tela seja patógeno de crescimento fastidioso, de baixa virulência e que necessita de temperaturas amenas para o seu desenvolvimento, finalmente que a veiculação ocorra por insetos picadores e sugadores, uma vez que as regiões de assentamento lesional são aquelas mais propensas às picadas (MALIK et al., 2001; MALIK; HUGHES, 2004; MALIK et al., 2006), de tais vetores, atraídos que são pelo dióxido de carbono emitido na expiração.

6 CONCLUSÕES

Em função da metodologia proposta e dos resultados obtidos e analisados permite-se concluir que:

- 1) o Granuloma lepróide canino acomete, preponderantemente, caninos de raça definida (83,7%), mormente Boxers (61,2%), de grande porte (93,5%), de pelame curto (87%) e sem evidente predisposição sexual.
- 2) a faixa etária de acometimento varia amplamente (um a treze anos), com maior ocorrência (54,1%) naquela de quatro a seis anos de vida.
- 3) a ocorrência do Granuloma lepróide canino, segundo a sazonalidade, concentra-se na primavera e verão (62,1%).
- 4) o Granuloma lepróide canino constitui-se em dermatopatia por vezes pruriginosa (51,3%), de caráter crônico, com decurso evolutivo médio de 111 dias quando do primo atendimento e desprovida de comprometimento sistêmico.
- 5) a topografia e o aspecto lesional preponderantemente é auricular (86,5%) e de forma bilateral (61,1%), caracterizando-se por formações sólidas (75,6%) e por perdas e reparações teciduais (45,9 %).
- 6) a despeito do diagnóstico de suspeição poder ser proposto com base nos aspectos clínicos, o cabal diagnóstico é estabelecido pelos exames subsidiários, principalmente, pela histopatologia (56,8%), citobacterioscopia (21,6%) e por ambas as metodologias (21,6%).
- 7) o Granuloma lepróide canino trata-se de dermatopatia bacteriana contumaz em distintas unidades federativas brasileiras embora, ainda, subdiagnosticada e submetida a protocolos de tratamento (54%) equivocados.
- 8) os protocolos de terapia sistêmica à base de ansamicínicos ou de quinolônicos, empregados de forma isolada, mostram-se seguros e plenos de êxito, com estabelecimento da alta clínica em tempo médio de 84,1 dias.

REFERÊNCIAS

- ACHA, L. M. R. **Granuloma Lepróide Canino: Aspectos clínicos, epidemiologia, histopatologia e biologia molecular – estudo retrospectivo de 38 casos**. 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009. Disponível em: <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/medicina%20veterinaria/2009/216709f.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2010.
- AZULAY, R. D. **Dermatologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 983 p.
- BARABOGLIA, E. R.; BARABOGLIA, E. R. Enfermedades Infecciosas Micobacteriosis Atípicas (Atypical Mycobacteriosis). **Revista electrónica de Veterinaria**, v. 10, n. 10, 2009. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009/100905.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2010.
- BIONDI, F.; FARIAS, M. R.; WERNER, J.; FRIESEN, R.; FUCHS, T.; COSTA, T.A. Síndrome do granuloma lepróide canino – Relato de caso. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 7, n. 22, p. 309-312, 2009.
- CÁRDIA, A. S.; ANTUNES, P. G.; PLIEGO, C. M.; ALVIM, A. P. V.; MICHALANY, N. S. Micobacteriose no estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 36., 2009, Porto Seguro. **Anais...** Bahia: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2009. n.15.
- CHARLES, J.; MARTIN, P.; WIGNEY, D. I.; MALIK, R.; LOVE, D. N. Cytology and histopatology of canine leproid granuloma syndrome. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 12, p. 799-803, 1999.
- CORNEGLIANI, L.; FONDEVILA, D.; VERCELLI, A.; MANTERO, G.; FONDATI, A. PCR technique detection of *Leishmania* spp. but not *Mycobacterium* spp. in canine cutaneous ‘sterile’ pyogranuloma/granuloma syndrome. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 233-238, 2005.

COSTA, S. S.; D'ANGELO, G. T.; MUNHOZ, T. D.; CHAMPION, T.; JOÃO, C. F.; GALVÃO, A. L.; TINUCCI-COSTA, M. Micobacteriose cutânea em cão: relato de dois casos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. s450-s452, 2007.

FARIAS, M. R.; CASAGRANDE, T. A. C.; WERNER, J.; CAVALCANTE, C.Z. Retrospective study (1998-2007) of canine leproid granuloma syndrome in Curitiba, Brazil. In: WORLD CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, 6., 2008, Hong Kong. **Proceedings...** Hong Kong: The Asian Society of Veterinary Dermatology, 2008, p. 64.

FARIAS, M. R.; WERNER, J.; COSTA, T. A.; CAVALCANTE, C. Z.; SCHENATO JR, L. A. Estudo retrospectivo de 13 casos de Granuloma Lepróide Canino em Curitiba – Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 27., 2006, Vitória. **Anais...** Espírito Santo: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 2006, p. 48.

FINNIE, J. W. Micobacterial skin granuloma in a dog. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, p. 506, 1978.

FOLEY, J. E.; BORHESSON, D.; GROSS, T. L.; RAND, M.; NEEDHAM, M.; POLAND, A. Clinical, microscopic and molecular aspects of canine leproid granuloma in the United States. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 234-239, 2002.

FYFE, J. A.; McCOWAN, C.; O'BRIEN, C. R.; GLOBAN, M.; BIRCH, C.; REVILL, P.; BARRS, V. R. D.; WAYNE, J.; HUGHES, M. S.; HOLLOWAY, S.; MALIK, R. Molecular characterization of a novel fastidious mycobacterium causing lepromatous lesions of the skin, subcutis, cornea, and conjunctiva of cats living in Victoria, Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 618-626, 2008.

FYFE, J. A. M.; LAVENDER, C. J.; JOHNSON, P. D. R.; GLOBAN, M.; SIEVERS, A.; AZUOLAS, J.; STINEAR, P. T. Development and Application of Two Multiplex Real-Time PCR Assays for the Detection of *Mycobacterium ulcerans* in Clinical and Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 15, p. 4733-4740, 2007.

GREENE, C. E. Mycobacterial Infections. In: _____. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Saint Louis: Saunders Elsevier. 3. ed. 2006.p. 462-488.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. 2. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 932 p.

HUGHES, M. S.; JAMES, G.; BALL, N.; SCALLY, M.; MALIK, R.; WIGNEY, D. I.; MARTIN, P.; CHEN, S.; MITCHELL, D.; LOVE, D. N. Identification by 16S rRNA gene analysis of a potential novel mycobacterial species as an etiological agent of canine leproid granuloma syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 953-959, 2000.

JORGE, M. C.; TRAVERSA, M. J.; FRESNEDA, K. C.; BELSITO, J.; PASSUCCI, J.; CARADUJE, N. V. Tres caos de síndrome granuloma leproide canino en Tandil, Buenos Aires, Argentina. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, n. 39, p. 159-167, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.org.ar/pdf/cdyt/n39/n39a09.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

LARSSON, C. E.; DELAYTE, E. H.; BALDA, A. C.; MICHALANY, N. S.; PINHEIRO, S. R.; OTSUKA, M.; ROXO, E. Dermatite micobacteriana atípica em gato: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 58, n. 6, p. 1092-1098, 2006.

LARSSON, C. E.; MARUYAMA, S. Micobacterioses. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 72, p. 36-44, 2008.

LARSSON, C. E.; MICHALANY, N. S.; PINHEIRO, S. R.; LEDON, A. L. B. P.; VASCONCELOS, S. A. Micobacteriosis atípicas en caninos domésticos – relato de casos en São Paulo, Brasil. In: CONGRESO DE LA SOCIEDAD VENEZOLANA DE MEDICOS VETERINARIOS,1., 1990, Maracay. **Proceedings...** Venezuela: Sociedad Venezoelana de Medicos Veterinarios, 1990. p. 71.

LARSSON, C. E.; MICHALANY, N. S.; PINHEIRO, S. R.; OTSUKA, M.; LEDON, A. L. B. P.; NAHAS, C. R.; LUCAS, R. Controversia en dermatologia – úlceras micobacterianas del perro. In: CONGRESO PANAMERICANO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EN CINOLOGIA, 3., 1995, Buenos Aires. **Proceedings...** Argentina, 1995, p. 19.

LARSSON, C. E.; OTSUKA, M.; MICHALANY, N. S.; PINHEIRO, S. R.; SAKAMOTO, S. M.; PEDRO, C. R. Canine leproid granuloma syndrome (CLGS) in Brazil (São Paulo). In: WORLD CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, 4., 2000, San Francisco. **Proceedings...** California: The American College of Veterinary Dermatology, 2000, p. 44.

LEMARIE, S. L. Mycobacterial dermatitis. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 1291-1301, 1999.

MALIK, R. **Publicação eletrônica** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <simonivet@gmail.com> em 13 maio.2010.

MALIK, R.; HUGHES, S. Leproid granulomas: a unique mycobacterial infection of dogs. **Microbiology Australia**, 2004. Disponível em: <http://www.theasm.org.au/uploads/pdf/107_MA_Nov_04.pdf#page=38>. Acesso em: 20 jan. 2010.

MALIK, R.; HUGHES, M. S.; MARTIN, P.; WIGNEY, D. Canine leproid granuloma syndrome (Canine leprosy). In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Saint Louis: Saunders Elsevier. 3. ed. 2006. p. 480-482.

MALIK, R.; LOVE, D.N.; WIGNEY, D. I.; MARTIN, P. Mycobacterial nodular granulomas affecting the subcutis and skin of dogs (canine leproid granuloma syndrome). **Australian Veterinary Journal**. v. 76, n. 6, p. 403-407, 1998.

MALIK, R.; MARTIN, P.; WIGNEY, D.; SWAM, D.; SATTTLER, P. S.; CIBILIC, D.; ALLEN, J.; MITCHELL, D. H.; CHEN, S. C. A.; HUGHES, M. S.; LOVE, D. N. Treatment of canine leproid granuloma syndrome: preliminary findings in seven dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 1, p. 30-36, 2001.

MATOUSEK, J. L. Diseases of the ear pinna. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 34, p. 511-540, 2004.

MAULDIN, E. A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; RANKIN, S. C. Canine leproid granuloma in the northeastern United States. **Veterinary Dermatology**, v. 15, n. 1, p. 70-71, 2004.

OLIVEIRA, M. L. W. Infecções por micobactérias. In: RAMOS-E-SILVA, M. R.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de dermatologia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009. p. 907-936.

PAPICH, M.G. **Saunders handbook of veterinary drugs**. 2.ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2007. 740 p.

PLUMB, D.C. **Veterinary drug handbook**. 3.ed. Minnesota: Pharma Vet Publishing, 1999. 750 p.

RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de dermatologia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009. 2500 p.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas, 2008. 1585 p.

SANTORO, D.; PRISCO, M.; CIARAMELLA, P. Cutaneous sterile granulomas/pyogranulomas, leishmaniasis and mycobacterial infections. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, p. 552-561, 2008.

SCOTT, D.W.; MILLER JR., W.H.; GRIFFING, C.E. Bacterial skin diseases. In: _____. **Muller and Kirk's small animal dermatology**. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. 1528 p.

SEIXAS, G.; SALES, J. A.; OLIVEIRA, C. D.; MARUYAMA, S.; TABOADA, P. Granuloma Lepróide Canino: primeiras descrições no Centro-Oeste brasileiro. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 8., 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais-SP, 2008, p. 74-75.

SMITH, R. I. E. Canine skin tuberculosis. **Rhodesian Veterinary Journal**, v. 3, p. 63-64, 1973.

TORRES, H. M. O.; MACEDO, C. L.; MICHALANY, N. S.; LARSSON JÚNIOR, C. E.; ZANUTTO, M. S.; LARSSON, C. E. Granuloma Lepróide Canino – primo relato de caso no Nordeste brasileiro. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 2006, Gramado. **Anais...** Rio Grande do Sul: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais-RS, 2006.

TWOMEY, L. N.; WUERZ, J. A.; ALLEMAN, E. R. A “down under” lesion on the muzzle of a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p.161-163, 2005.

USLAN, D.Z.; KOWALSKI, T.J.; WENGENACK, N.L.; VIRK, A.; WILSON, J.W. Skin and Soft Tissue Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. **Archives of Dermatology**, v. 142, p. 1287-1292, 2006.

CAPÍTULO III

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO GRANULOMA LEPRÓIDE CANINO, A PARTIR DE CORTES HISTOLÓGICOS EMBLOCADOS EM PARAFINA, PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) – ESTUDO RETROSPECTIVO (2002-2009)

1 INTRODUÇÃO

O Granuloma lepróide canino se constitui em enfermidade tegumentar que acomete cães, causada por bacilos álcool-ácido-resistentes, Gram positivos, aeróbios estritos, não formadores de esporos, imóveis, não capsulados, pertencentes à família Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales, gênero *Mycobacterium* (GREENE, 2006; MALIK et al., 2006) ou, ainda, segundo Fyfe et al. (2008) de espécie relacionada ao *Mycobacterium simiae* ou *Mycobacterium* sp. CLGS (“canine leproid granuloma syndrome”). Outras designações para o agente etiológico, também, estão dispostas na bibliografia, tais como *Mycobacterium* sp. cepa CLGS ou “nova” espécie de micobactéria que causa o Granuloma lepróide canino (MALIK et al., 2006) e, finalmente, *Mycobacterium murphy*, segundo Acha (2009), uma vez que Hughes et al. (2000) e Foley et al. (2002) concluíram que o fragmento sequenciado e disposto no banco de dados do Genbank é intitulado “*Mycobacterium* sp. Murphy 16S ribosomal RNA”.

Como característica toda especial da(s) micobactéria(s) envolvida(s), ressalta-se a impossibilidade de seu cultivo nos meios clássicos e especiais ora empregados (LEMARIE, 1999; GREENE, 2006; MALIK et al., 2006). Tal aspecto insólito é, também, compartilhado pelo agente etiológico da lepra felina (“Micobactéria relacionada ao *Mycobacterium simiae*”), que ocasiona granulomas na pele e panículo em gatos, à semelhança do agente do Granuloma lepróide canino (FYFE et al., 2008).

Historicamente, tais bactérias têm sido subdivididas em diversos grupos e espécies individualizadas, de acordo com particularidades bioquímicas e fatos relacionados ao seu cultivo. Portanto, com o advento das técnicas de biologia molecular, os estudos referentes ao sequenciamento genético têm ampliado e propiciado maior precisão à classificação taxonômica. Hoje, pode-se dizer que diagnósticos estabelecidos pela biologia molecular, segundo as características genéticas da micobactéria em tela, tem demonstrado mais viabilidade relativamente ao diagnóstico embasado em suas propriedades fenotípicas (GREENE, 2006). Ou seja, a classificação de acordo com a formação de pigmento e o tempo

necessário ao crescimento em cultivo– lento e rápido – embora didática, mas já não é mais considerada como precisa na distinção das espécies. A atual identificação é executada mediante análise bioquímica dos ácidos micólicos da parede da bactéria e pelas técnicas de biologia molecular (AZULAY, 2008; OLIVEIRA, 2009).

O diagnóstico do Granuloma lepróide canino, de forma usual e corriqueira, na clínica de pequenos animais, é estabelecido tanto pelo exame citobacterioscópico das lesões cutâneas, bem como pelo exame histopatológico de fragmentos obtidos por biópsia (MALIK e al., 2006). Mas com o advento de técnicas moleculares mais acessíveis, tem permitido, principalmente, em laboratórios especializados, o uso da reação em cadeia de polimerase (PCR) em vários âmbitos na medicina veterinária.

Em medicina humana, tal metodologia permite a investigação diagnóstica de distintas amostras biológicas, mesmo quando o DNA está presente em diminutas quantidades. Resquícios de saliva, esfregaço de mucosa oral, sangue, bulbos capilares, tecidos emblocados em parafina, fragmentos ósseos, gotas de sêmen, dentre outros, propiciam informações importantes pois, rotineiramente, amostras de tecidos são removidas do corpo humano para análise, com vistas ao diagnóstico de doenças e os fragmentos oriundo desses materiais, fixados em formol, incluídos em parafina podem ser mantidos em laboratórios, uma vez que tais espécimens representam importante material biológico para investigação médico legal para fins de pesquisa acadêmica. Assim sendo, o aperfeiçoamento dos métodos de extração de DNA, a partir de tecido parafinado, de forma a torná-los de execução simples e de menor custo, facilita enormemente a utilização desses materiais em estudos retrospectivos, trazendo grande contribuição para a investigação da etiologia e da epidemiologia das enfermidades (JACKSON et al., 1990; SIMONATO et al., 2007).

2 OBJETIVOS

O presente estudo objetivou a confirmação do diagnóstico do Granuloma lepróide canino, a partir de amostras de tecido cutâneo, fixados em formol e emblocados em parafina, pela técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR), afora verificar se a sequência gênica da micobactéria encontrada nas lesões de cães brasileiros corresponderia àquela dos casos dispostos em estudos estrangeiros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados cortes histológicos, provenientes de treze animais da espécie canina, atendidos, no decorrer dos anos de 2002 a 2009, junto ao Serviço de Dermatologia (SD) do Departamento de Clínica Médica (VCM) e do Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), com diagnóstico clínico estabelecido de Granuloma lepróide canino, confirmado pelo exame histopatológico cutâneo.

Os cortes histológicos, fixados em formol a 10% e emblocados em parafina, foram obtidos junto ao acervo do Laboratório Paulista de Dermatopatologia, para onde são encaminhadas as amostras de todos os animais submetidos à biópsia no Serviço de Dermatologia do HOVET da FMVZ/USP.

3.2 AMOSTRAS

Obtidos os blocos parafinados, contendo as amostras biopsiadas e diagnosticadas histologicamente, estes foram seccionados, utilizando-se de micrótomo, previamente higienizado, dispondo de lâminas descartáveis utilizadas para cada um dos blocos. Os cortes, com espessura de 10 a 20 μm , foram acondicionados, individualmente, em tubos plásticos, identificados, vedados, com capacidade de 1,5 mL.

Posteriormente, em acordo e em anuência a todos os requisitos legais, sanitários e alfandegários de exportação, de material biológico para pesquisa, as amostras foram enviadas ao Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory¹, para a realização das técnicas de diagnóstico molecular.

¹ Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, Mycobacterium Reference Laboratory, 10 Wreckyn Street, North Melbourne 3051, Victoria, Australia.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras que foram processadas segundo a metodologia proposta por Fyfe et al. (2008) para o protocolo de PCR “nested” e por Fyfe et al. (2007) para o protocolo de PCR em tempo real, seguem descritas abaixo:

Extração do DNA

Iniciou-se com a retirada da parafina e com a adição de histolene (Fronine Pty.Ltd.) aos tubos, contendo as amostras, seguida da adição de 1mL de etanol absoluto e submissão à centrifugação a 13.000 rpm, por 5 minutos, em microcentrífuga (Heracus). O DNA foi extraído, do “pellet” de tecido, usando o minikit QIAamp DNA (Qiagen Inc., Valencia, CA) seguido do protocolo de recuperação do DNA, precedido por incubação de 24 horas, a 56°C, em solução tampão (50mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10mM de EDTA, 0,5% [p/vol] de dodecil sulfato de sódio, 50mM de Na Cl, 300 µg/mL de proteinase K)

PCR “nested”

O procedimento foi executado, segundo o descrito por Fyfe et al. (2008): os “primers” utilizados, para a amplificação por PCR das regiões variáveis do genoma, neste estudo foram os seguintes: Ec 16S.1390p (TTG TAC ACA CCG CCC GTC A), Mb23S.44n (TCT CGA TGC CAA GGC ATC CAC C) para a primeira reação para o gene ITS1, respectivamente, senso e anti-senso. Já os “primers” para a segunda reação do gene ITS1 foram: SP1 (ACC TCC TTT CTA AGG AGC ACC) e SP2 (GAT GCT CGC AAC CAC TAT CCA), respectivamente, senso e anti-senso.

A amplificação da região ITS1 foi concretizada usando um protocolo de PCR “nested”, onde se aplicam: 0,5 µL de DNA extraído a 20µL da mistura de PCR com o volume final de 25µL do tampão de PCR com 1,5 mM Mg Cl₂ (Qiagen Inc., Valencia, CA), 200 µM de trifosfato deoxinucleosídeos (dNTPs), “primers” Ec 16S.1390p e Mb23S.44n (2µM de cada), e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Qiagen). Tal amplificação foi realizada no termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf) com uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95°C por 5 minutos, seguida de 38 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 62°C por 1 minuto para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, 72°C por 1 minuto para a extensão das fitas e um ciclo final de 72°C por 5 minutos para extensão final.

Para a segunda amplificação (PCR “nested”) utilizou-se de 2,5µL dos produtos da primeira PCR, em volume final de 50µL, contendo tampão de PCR com 1,5 mM de MgCl₂ (Qiagen), 200µM de dNTPs, primers SP1 e SP2 (2µM de cada) e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Qiagen). Esta amplificação foi realizada no mesmo termociclador com uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 59°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos para extensão final.

O método incluiu um processo de extração com controle negativo, um controle negativo para a PCR, um controle positivo contendo 100 fg de DNA, extraído de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, e, finalmente, controles para inibição, contendo DNA extraído (100 fg) de *M. tuberculosis*.

Análise dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e os tamanhos dos fragmentos foram estimados em comparação com um DNA ladder Gene Ruler 1 – Kb (MBI Fermentas, Amherst, NY) ou *pUC19/MspI* marker 23 (MBI Fermentas). Os fragmentos foram purificados a partir dos cortes de gel de agarose, usando o kit High Pure PCR product purification (Roche), de acordo com as instruções do fabricante.

Análise da sequência de DNA

A análise das sequências dos produtos purificados da PCR “nested”, 224bp, num total de 5 amostras, foram realizadas usando o kit de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 cycle (Applied Biosystems, Foster City, CA), segundo as instruções do fabricante. Os “primers” empregados foram os mesmos que aqueles descritos na amplificação pela PCR. As reações foram analisadas no 3730S Genetic analyzer (Applied Biosystems), os dados sequenciais foram editados usando Bionumerics v4.0 (Applied Maths, Gent, Belgium) e as buscas nas bases de dados do GenBank foram feitas usando o algoritmo BLASTN.

Análise filogenética

As cinco sequências foram alinhadas e comparadas (1000 replicações de *bootstraps*) com as sequências disponíveis no Genbank da região ITS1 usando ClustalX e a análise de máxima verossimilhança foi feita usando BioEdit (HALL, 1999; THOMPSON et al., 1997).

Número de acesso da sequência de nucleotídeos

A sequência determinada para *Mycobacterium* sp. cepa CLGS, região parcial ITS1 (183 nt) está depositada no Genbank; cujo número de acesso é EF611177.

PCR em tempo real

O protocolo desta técnica foi realizado com base no trabalho descrito por Fyfe et al. (2007), com algumas poucas variações, já que os “primers” utilizados, no presente estudo, foram desenhados e direcionados especificamente para a região ITS1 do gene do *Mycobacterium* relacionado ao Granuloma lepróide canino (CLGS) : CAC TAT TGG GCC CTG AGA (senso) e AAG ACG GAG GGA CAC CAC TTC (anti-senso). Outra modificação foi aquela relativa ao uso do marcador fluorogênico, já que se optou pelo SYBRGreen e não pela sonda Taqman. As reações de 25µL como volume final foram compostas, em cada uma, por: 12,5µL de SYBRGreen PCR Mastermix (Applied Biosystems), 1µL do primer senso (com 200nM na concentração final), 1µL do primer anti-senso (com 200nM na concentração final), 9,5µL de água deionizada e 1µL de DNA extraído.

4 RESULTADOS

Em nove (69,2%) das 13 amostras de pele, com diagnóstico histopatológico e clínico previamente estabelecido de Granuloma lepróide canino, detectou-se DNA de *Mycobacterium* sp cepa CLGS pela PCR em tempo real . No entanto, quando da realização da PCR “nested”, em apenas três (18,7%) dos animais se confirmou a presença do DNA do agente etiológico da enfermidade (Quadro 1).

Animal/prontuário	Raça	Sexo	Idade (anos)	PCR “nested”	PCR em tempo real	DNA GLC
123344	Golden Retriever	F	3	N	N	não
90417	Labrador	M	4	N	D	sim
136959	Boxer	M	2	D	D	sim
143919	Labrador	F	4	N	N	não
156754	Cocker Spaniel	M	4	N	D	sim
157828	SRD	F	9	N	D	sim
162712	Boxer	F	4	D	D	sim
175041	Boxer	M	8	N	D	sim
140913	Boxer	M	8	N	D	sim
171272	Boxer	M	6	N	D	sim
194037	Boxer	F	3	N	N	não
182591	Pitbull	M	5	N	N	não
188318	Boxer	M	5	D	D	sim

Quadro 1 Caracterização dos cães com Granuloma lepróide canino, segundo a identificação, definição racial, sexo e idade submetidos aos protocolos de PCR “nested”, PCR em tempo real e presença de DNA relativa ao GLC. Serviço de Dermatologia do HOVET – FMVZ/USP –2002 a 2009. São Paulo (2010)

SRD= sem raça definida, F= fêmea, M=macho, N= DNA não detectado, D= DNA detectado.

Em relação à análise filogenética, verificou-se identidade dos produtos obtidos, uma vez que o sequenciamento do DNA foi confirmado com a equivalência de 100% com a sequência disposta no acesso EF611177 do Genbank.

5 DISCUSSÃO

Em relação às amostras negativas na PCR “nested”, observou-se que estas apresentaram o mesmo resultado na PCR em tempo real, ou seja a capacidade de detecção neste último método foi superior e, portanto, o número de falso-negativos, menor.

Foi evidenciado, ainda, que em várias amostras, pressupostamente negativas, provavelmente houve a degradação do DNA, de maneira que impossibilitasse a sua detecção. Dentre as causas prováveis envolvidas, a título de exemplo, enumeram-se: o tempo de fixação da peça em formol e as técnicas empregadas para retirada da parafina que se utiliza de solventes, por vezes, orgânicos. A possibilidade do DNA ter-se-à desintegrado, talvez devido à fixação em formol, foi aventada em trabalho de Acha (2009) que se deparou, também, com algumas amostras negativas na PCR. Deve-se considerar, ainda, que, no caso destas amostras negativas pela PCR convencional e por aquela em tempo real, outras etiologias podem ser atribuídas às lesões que não micobacterianas, a exemplo de outros quadros tegumentares infecciosos, neoplásicos e degenerativos.

A fixação de tecidos com formol a 10% trata-se de método prático e eficiente para sua preservação sendo, portanto, amplamente utilizado em anatomia patológica. Contudo esse tipo de fixação resulta, habitualmente, no enovelamento de proteínas nucleares, na formação de ligações entre proteínas e DNA e, ainda, na fragmentação do mesmo, o que dificulta, sobremaneira, a extração dessa classe de moléculas de tecidos previamente fixados. Além disso, vários outros passos podem influenciar a obtenção de amplificações positivas, a começar pela forma de obtenção dos cortes e a desparafinização que, além de ser opcional, pode ser realizada através de calor ou lavagens com solventes, tal como o xilol; o tempo de digestão em proteinase K e a concentração desta última no tampão de digestão (SIMONATO et al., 2007). Hughes et al. (2000) verificaram diferenças entre os resultados da PCR de DNA, extraído de amostras de tecido “a fresco” e de material oriundo de tecidos emblocados em parafina. Possivelmente, houve, segundo os autores, a degradação de DNA devido à presença residual de formalina, levando a uma quantidade menor de material genético, se comparado com o tecido não fixado.

Dentre os exames de alta sensibilidade e especificidade, a reação em cadeia da polimerase (PCR), método este da biologia molecular, destaca-se pela possibilidade de amplificar ou multiplicar fragmentos ou vestígios de DNA de células, incluídas as bacterianas, permitindo, assim, sua fácil detecção. Esse método vem sendo hoje aplicado, frequentemente, em pesquisas de doenças infecciosas de variada etiologia (SANTOS et al.,

2007). Em relação à investigação de dermatoses tropicais, em medicina humana, muito se tem adquirido com a utilização da biologia molecular, sendo que o objetivo mais atual se volta para o auxílio no desenvolvimento de fármacos e de vacinas para o seu controle, em especial no caso da hanseníase (ROSELINO, 2008).

A importância na realização da PCR reside, justamente, no fato de ser uma técnica bastante sensível e específica, principalmente, para a identificação de patógenos presentes em lesões às vezes tidas, como “estéreis”, tal como no piogranuloma estéril, onde se deve considerar o diagnóstico diferencial tanto para leishmaniose como para micobacteriose (ROURA; SANCHEZ; FERRER, 1999; CORNEGLIANI et al., 2005).

Na Irlanda, Hughes et al. (2000) concluíram que a partir do produto da PCR (16S do RNA ribossômico) de material oriundo de 12 cães, a micobactéria presente demonstrou similaridade gênica com *M. tilburgii*, *M. simiae* e *M. genavense*, além da homologia de 99 a 100% com aquela de cães australianos e neozelandeses (MALIK et al., 1998). Já, Foley et al. (2002) constataram que cães criados no vale central da Califórnia, também, compartilhavam os mesmos aspectos clínicos e genéticos relativos ao Granuloma leproide canino, comparativamente àqueles da Austrália e Nova Zelândia.

Recentemente, no Brasil, Acha (2009) conduziu, em trabalho de pós-graduação, estudo acerca do Granuloma leproide canino, com cães oriundos dos estados de Minas Gerais e São Paulo. A partir da realização da PCR e do sequenciamento gênico parcial da região 16S do RNA ribossômico, identificou-se o *Mycobacterium murphy*, também descrito por Hughes et al. (2000) e Foley et al. (2002), como um dos principais agentes envolvidos na etiologia da enfermidade.

No presente trabalho, evidenciou-se que houve similaridade entre as amostras oriundas de cães brasileiros atendidos no HOVET da FMVZ/USP e aqueles oriundos da Austrália, de sequência gênica determinada para *Mycobacterium* sp. cepa CLGS, região parcial ITS1 (número de acesso no Genbank EF611177). Porém, as pesquisas para tal região gênica ainda são escassas, o que indica a necessidade de estudos futuros para um maior detalhamento dos resultados obtidos.

Da casuística brasileira permanecem, ainda, várias lacunas a ser esclarecidas e, uma delas seria a indagação se os resultados do material provindo de cães, provenientes das outras regiões do Brasil, coincidiriam com os dados estabelecidos no presente trabalho e naquele de Acha (2009), de Minas Gerais e São Paulo, uma vez que ambos estão somente restritos à região sudeste brasileira. Sabe-se que, em análises preliminares de outras localidades a exemplo do Paraná (FARIAS et al., 2008), Rio de Janeiro (CÁRDIA et al., 2009), Distrito

Federal (SEIXAS et al., 2008) e Bahia (TORRES et al., 2006), algumas informações relacionadas somente aos aspectos clínicos, epidemiológicos e de resposta à terapia guardam correspondência entre si.

6 CONCLUSÕES

Em função da metodologia empregada no presente trabalho, pôde-se concluir que:

- 1) a PCR em tempo real permitiu o diagnóstico de confirmação do Granuloma lepróide canino a partir de cortes histológicos emblocados em parafina.
- 2) o método da PCR em tempo real apresentou maior sensibilidade relativamente ao método da PCR “nested”.
- 3) a micobactéria causadora do Granuloma lepróide canino nos cães brasileiros, da casuística de atendimento no HOVET da FMVZ/USP, apresentou homologia de 100% frente ao *Mycobacterium* sp. cepa CLGS de amostras isoladas de cães australianos.

REFERÊNCIAS

- ACHA, L.M.R. **Granuloma Lepróide Canino: Aspectos clínicos, epidemiologia, histopatologia e biologia molecular – estudo retrospectivo de 38 casos**. 2009. 55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009. Disponível em: < <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/medicina%20veterinaria/2009/216709f.pdf> >. Acesso em: 20 jan. 2010.
- AZULAY, R.D. **Dermatologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 983 p.
- CÁRDIA, A. S.; ANTUNES, P. G.; PLIEGO, C. M.; ALVIM, A. P. V.; MICHALANY, N. S. Micobacteriose no estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 36., 2009, Porto Seguro. **Anais...** Bahia: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2009, n. 15.
- CORNEGLIANI, L.; FONDEVILA, D.; VERCELLI, A.; MANTERO, G.; FONDATI, A. PCR technique detection of *Leishmania* spp. but not *Mycobacterium* spp. in canine cutaneous ‘sterile’ pyogranuloma/granuloma syndrome. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 233-238, 2005.
- FARIAS, M. R.; CASAGRANDE, T. A. C.; WERNER, J.; CAVALCANTE, C. Z. Retrospective study (1998-2007) of canine leproid granuloma syndrome in Curitiba, Brazil. In: WORLD CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, 6., 2008, Hong Kong. **Proceedings...** Hong Kong: The Asian Society of Veterinary Dermatology, 2008, p. 64.
- FOLEY, J.E.; BORHESSON, D.; GROSS, T.L.; RAND, M.; NEEDHAM, M.; POLAND, A. Clinical, microscopic and molecular aspects of canine leproid granuloma in the United States. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 234-239, 2002.

FYFE, J. A.; McCOWAN, C.; O'BRIEN, C. R.; GLOBAN, M.; BIRCH, C.; REVILL, P.; BARRS, V. R. D.; WAYNE, J.; HUGHES, M. S.; HOLLOWAY, S.; MALIK, R. Molecular characterization of a novel fastidious mycobacterium causing lepromatous lesions of the skin, subcutis, cornea, and conjunctiva of cats living in Victoria, Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 618-626, 2008.

FYFE, J. A. M.; LAVENDER, C. J.; JOHNSON, P. D. R.; GLOBAN, M.; SIEVERS, A.; AZUOLAS, J.; STINEAR, P. T. Development and Application of Two Multiplex Real-Time PCR Assays for the Detection of *Mycobacterium ulcerans* in Clinical and Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 15, p. 4733-4740, 2007.

GREENE, C. E. Mycobacterial Infections. In: _____. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Saint Louis: Saunders Elsevier. 3.ed. 2006. 1387 p.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HUGHES, M. S.; JAMES, G.; BALL, N.; SCALLY, M.; MALIK, R.; WIGNEY, D. I.; MARTIN, P.; CHEN, S.; MITCHELL, D.; LOVE, D. N. Identification by 16S rRNA gene analysis of a potential novel mycobacterial species as an etiological agent of canine leproid granuloma syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 953-959, 2000.

JACKSON, D. P.; LEWIS, F. A.; TAYLOR, G. R.; BOYLSTON, A. W.; QUIRKE, P. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology**, v. 43, n. 6, p. 499-504, 1990.

LEMARIE, S. L. Mycobacterial dermatitis. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 1291-1301, 1999.

MALIK, R.; HUGHES, M. S.; MARTIN, P.; WIGNEY, D. Canine leproid granuloma syndrome (Canine leprosy). In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Saint Louis: Saunders Elsevier. 3. ed. 2006. p. 480-482.

OLIVEIRA, M. L. W. Infecções por micobactérias. In: RAMOS-E –SILVA, M.R.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de dermatologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009. p. 907-936.

ROSELINO, A.M. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 83, n. 3, p. 187-203, 2008.

ROURA, X.; SANCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, v. 144, p. 262-264, 1999.

SANTOS, G. G.; MARCUCCI, G.; GUIMARÃES JR, J.; MARGARIDO, L. C.; LOPES, L.H.C. Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em biópsias de mucosa ora por meio da reação em cadeia da polimerase. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 82, n. 3, p.245-249, 2007.

SEIXAS, G.; SALES, J. A.; OLIVEIRA, C. D.; MARUYAMA, S.; TABOADA, P. Granuloma Lepróide Canino: primeiras descrições no Centro-Oeste brasileiro. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 8., 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais-SP, 2008, p. 74-75.

SIMONATO, L. E.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; MIYAHARA, G. I. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 2, p. 121-127, 2007.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TORRES, H. M. O.; MACEDO, C. L.; MICHALANY, N. S.; LARSSON JÚNIOR, C. E.; ZANUTTO, M. S.; LARSSON, C. E. Granuloma Lepróide Canino – primo relato de caso no Nordeste brasileiro. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 2006, Gramado. **Anais...** Rio Grande do Sul: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais-RS, 2006.

LISTA GERAL DE REFERÊNCIAS

- ACHA, L.M.R. **Granuloma Lepróide Canino: Aspectos clínicos, epidemiologia, histopatologia e biologia molecular – estudo retrospectivo de 38 casos**. 2009. 55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009. Disponível em: < <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/medicina%20veterinaria/2009/216709f.pdf> >. Acesso em: 20 jan. 2010.
- AZULAY, R.D. **Dermatologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 983p.
- BARABOGLIA, E. R.; BARABOGLIA, E. R. Enfermedades Infecciosas Micobacteriosis Atípicas (Atypical Mycobacteriosis). **Revista electrónica de Veterinaria**, v. 10, n. 10, 2009. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009/100905.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2010.
- BIONDI, F.; FARIAS, M. R.; WERNER, J.; FRIESEN, R.; FUCHS, T.; COSTA, T. A. Síndrome do granuloma lepróide canino – Relato de caso. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 7, n. 22, p. 309-312, 2009.
- CÁRDIA, A. S.; ANTUNES, P. G.; PLIEGO, C. M.; ALVIM, A. P. V.; MICHALANY, N. S. Micobacteriose no estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 36., 2009, Porto Seguro. **Anais...** Bahia: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2009, n. 15.
- CHARLES, J.; MARTIN, P.; WIGNEY, D. I.; MALIK, R.; LOVE, D. N. Cytology and histopathology of canine leproid granuloma syndrome. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 12, p. 799-803, 1999.

CORNEGLIANI, L.; FONDEVILA, D.; VERCELLI, A.; MANTERO, G.; FONDATI, A. PCR technique detection of *Leishmania* spp. but not *Mycobacterium* spp. in canine cutaneous 'sterile' pyogranuloma/granuloma syndrome. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 233-238, 2005.

COSTA, S. S.; D'ANGELO, G. T.; MUNHOZ, T. D.; CHAMPION, T.; JOÃO, C. F.; GALVÃO, A. L.; TINUCCI-COSTA, M. Micobacteriose cutânea em cão: relato de dois casos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. s450-s452, 2007.

FARIAS, M. R.; WERNER, J.; COSTA, T. A.; CAVALCANTE, C. Z.; SCHENATO JR, L. A. Estudo retrospectivo de 13 casos de Granuloma Lepróide Canino em Curitiba – Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 27., 2006, Vitória. **Anais...** Espírito Santo: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 2006, p.48.

FARIAS, M. R.; CASAGRANDE, T. A. C.; WERNER, J.; CAVALCANTE, C.Z. Retrospective study (1998-2007) of canine leproid granuloma syndrome in Curitiba, Brazil. In: WORLD CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, 6., 2008, Hong Kong. **Proceedings...** Hong Kong: The Asian Society of Veterinary Dermatology, 2008, p. 64.

FINNIE, J. W. Micobacterial skin granuloma in a dog. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, p. 506, 1978.

FOLEY, J. E.; BORHESSON, D.; GROSS, T. L.; RAND, M.; NEEDHAM, M.; POLAND, A. Clinical, microscopic and molecular aspects of canine leproid granuloma in the United States. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 234-239, 2002.

FYFE, J. A.; McCOWAN, C.; O'BRIEN, C. R.; GLOBAN, M.; BIRCH, C.; REVILL, P.; BARRS, V. R. D.; WAYNE, J.; HUGHES, M. S.; HOLLOWAY, S.; MALIK, R. Molecular characterization of a novel fastidious mycobacterium causing lepromatous lesions of the skin, subcutis, cornea, and conjunctiva of cats living in Victoria, Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 618-626, 2008.

FYFE, J. A. M.; LAVENDER, C. J.; JOHNSON, P. D. R.; GLOBAN, M.; SIEVERS, A.; AZUOLAS, J.; STINEAR, P. T. Development and Application of Two Multiplex Real-Time

PCR Assays for the Detection of *Mycobacterium ulcerans* in Clinical and Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 15, p. 4733-4740, 2007.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. 2. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 932 p.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Saint Louis: Saunders Elsevier. 3. ed. 2006. 1387 p.

GREENE, C. E. Mycobacterial Infections. In: _____. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Saint Louis: Saunders Elsevier. 3. ed. 2006.p. 462-488.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HUGHES, M. S.; JAMES, G.; BALL, N.; SCALLY, M.; MALIK, R.; WIGNEY, D. I.; MARTIN, P.; CHEN, S.; MITCHELL, D.; LOVE, D. N. Identification by 16S rRNA gene analysis of a potential novel mycobacterial species as an etiological agent of canine leproid granuloma syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 953-959, 2000.

JACKSON, D. P.; LEWIS, F. A.; TAYLOR, G. R.; BOYLSTON, A. W.; QUIRKE, P. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology**, v. 43, n. 6, p. 499-504, 1990.

JORGE, M. C.; TRAVERSA, M. J.; FRESNEDA, K. C.; BELSITO, J.; PASSUCCI, J.; CARADUJE, N. V. Tres casos de síndrome granuloma leproide canino en Tandil, Buenos Aires, Argentina. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, n. 39, p. 159-167, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.org.ar/pdf/cdyt/n39/n39a09.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

LARSSON, C. E.; DELAYTE, E. H.; BALDA, A. C.; MICHALANY, N. S.; PINHEIRO, S. R.; OTSUKA, M.; ROXO, E. Dermatite micobacteriana atípica em gato: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 58, n. 6, p. 1092-1098, 2006.

LARSSON, C. E.; MARUYAMA, S. Micobacterioses. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 72, p. 36-44, 2008.

LARSSON, C. E.; MICHALANY, N. S.; PINHEIRO, S. R.; LEDON, A. L. B. P.; VASCONCELOS, S. A. Micobacteriosis atípicas en caninos domésticos – relato de casos en São Paulo, Brasil. In: CONGRESO DE LA SOCIEDAD VENEZOLANA DE MEDICOS VETERINARIOS, 1., 1990, Maracay. **Proceedings...** Venezuela: Sociedad Venezolana de Medicos Veterinarios, 1990. p. 71.

LARSSON, C. E.; MICHALANY, N. S.; PINHEIRO, S. R.; OTSUKA, M.; LEDON, A. L. B. P.; NAHAS, C. R.; LUCAS, R. Controversia en dermatologia – úlceras micobacterianas del perro. In: CONGRESO PANAMERICANO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EN CINOLOGIA, 3., 1995, Buenos Aires. **Proceedings...** Argentina, 1995, p. 19.

LARSSON, C. E.; OTSUKA, M.; MICHALANY, N. S.; PINHEIRO, S. R.; SAKAMOTO, S. M.; PEDRO, C. R. Canine leproid granuloma syndrome (CLGS) in Brazil (São Paulo). In: WORLD CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, 4., 2000, San Francisco. **Proceedings...** California: The American College of Veterinary Dermatology, 2000, p. 44.

LEMARIE, S. L. Mycobacterial dermatitis. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 1291-1301, 1999.

MALIK, R. **Publicação eletrônica** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <simonivet@gmail.com> em 13 maio.2010.

MALIK, R.; HUGHES, S. Leproid granulomas: a unique mycobacterial infection of dogs. **Microbiology Australia**, 2004. Disponível em: <http://www.theasm.org.au/uploads/pdf/107_MA_Nov_04.pdf#page=38>. Acesso em: 20 jan. 2010.

MALIK, R.; HUGHES, M. S.; MARTIN, P.; WIGNEY, D. Canine leproid granuloma syndrome (Canine leprosy). In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Saint Louis: Saunders Elsevier. 3. ed. 2006. p. 480-482.

MALIK, R.; LOVE, D.N.; WIGNEY, D. I.; MARTIN, P. Mycobacterial nodular granulomas affecting the subcutis and skin of dogs (canine leproid granuloma syndrome). **Australian Veterinary Journal**. v. 76, n. 6, p. 403-407, 1998.

MALIK, R.; MARTIN, P.; WIGNEY, D.; SWAM, D.; SATTLER, P. S.; CIBILIC, D.; ALLEN, J.; MITCHELL, D. H.; CHEN, S. C. A.; HUGHES, M. S.; LOVE, D. N. Treatment of canine leproid granuloma syndrome: preliminary findings in seven dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 1, p. 30-36, 2001.

MATOUSEK, J. L. Diseases of the ear pinna. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 34, p. 511-540, 2004.

MAULDIN, E. A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; RANKIN, S. C. Canine leproid granuloma in the northeastern United States. **Veterinary Dermatology**, v. 15, n. 1, p. 70-71, 2004.

OLIVEIRA, M. L. W. Infecções por micobactérias. In: RAMOS-E-SILVA, M. R.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de Dermatologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009. p. 907-936.

PAPICH, M.G. **Saunders handbook of veterinary drugs**. 2. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2007. 740 p.

PEDRO, H. S. P.; PEREIRA, M. I. F.; GOLONI, M. R. A.; UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 11, p. 950-955, 2008.

PLUMB, D. C. **Veterinary drug handbook**. 3. ed. Minnesota: Pharma Vet Publishing, 1999. 750 p.

RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de dermatologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009. 2500 p.

ROSELINO, A. M. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 83, n. 3, p. 187-203, 2008.

ROURA, X.; SANCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, v. 144, p. 262-264, 1999.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2008. 1585 p.

SANTORO, D.; PRISCO, M.; CIARAMELLA, P. Cutaneous sterile granulomas/pyogranulomas, leishmaniasis and mycobacterial infections. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, p. 552-561, 2008.

SANTOS, G. G; MARCUCCI, G.; GUIMARÃES JR, J.; MARGARIDO, L. C.; LOPES, L. H. C. Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em biópsias de mucosa ora por meio da reação em cadeia da polimerase. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 82, n. 3, p. 245-249, 2007.

SCOTT, D. W.; MILLER JR., W. H.; GRIFFING, C. E. Bacterial skin diseases. In: _____. **Muller and Kirk's small animal dermatology**. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. 1528 p.

SEIXAS, G.; SALES, J. A.; OLIVEIRA, C. D.; MARUYAMA, S.; TABOADA, P. Granuloma Lepróide Canino: primeiras descrições no Centro-Oeste brasileiro. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 8., 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais-SP, 2008, p. 74-75.

SIMONATO, L. E.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; MIYAHARA, G. I. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 2, p. 121-127, 2007.

SMITH, R. I. E. Canine skin tuberculosis. **Rhodesian Veterinary Journal**, v. 3, p. 63-64, 1973.

TORRES, H. M. O.; MACEDO, C. L.; MICHALANY, N. S.; LARSSON JÚNIOR, C. E.; ZANUTTO, M. S.; LARSSON, C. E. Granuloma Lepróide Canino – primo relato de caso no Nordeste brasileiro. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 2006, Gramado. **Anais...** Rio Grande do Sul: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais-RS, 2006.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TWOMEY, L. N.; WUERZ, J. A.; ALLEMAN, E. R. A “down under” lesion on the muzzle of a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 161-163, 2005.

USLAN, D. Z.; KOWALSKI, T. J.; WENGENACK, N. L.; VIRK, A.; WILSON, J. W. Skin and Soft Tissue Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. **Archives of Dermatology**, v. 142, p. 1287-1292, 2006.

APÊNDICE A - Caracterização dos cães com Granuloma lepróide canino, segundo o ano da consulta, identificação, localidade de residência, definição racial, comprimento do pelame, sexo e faixa etária (anos). Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

Ano da consulta	Prontuário	Localidade de residência	Definição racial	Comprimento do pelame	Sexo	Idade (anos)
1990	169020	...	Pastor Alemão	longo	F	5
1990	166064	...	Doberman	curto	F	6
1991	197315	...	Boxer	curto	F	8
1992	174	...	Boxer	curto	F	2
1992	6492	Interlagos	SRD	curto	M	5
1993	22711	São Roque	Boxer	curto	F	4
1993	18692	Morumbi	Terrier Brasileiro	curto	M	13
1993	17896	...	Boxer	curto	F	3
1994	32655	...	Boxer	curto	F	5
1995	49978	Jabaquara	Mastiff	curto	M	4
1995	48597	...	Boxer	curto	M	4
1996	62361	Rio Pequeno	SRD	curto	F	5
1997	75475	...	Boxer	curto	M	3
1999	104517	Parelheiros	Fila	curto	F	10
1999	98810	Embu-Guaçu	Boxer	curto	F	6
2001	123344	Brooklin	Golden Retriever	longo	F	3
2002	90417	Butantã	Labrador	curto	M	4
2002	136959	Ubatuba	Boxer	curto	M	2
2003	143919	Osasco	Labrador	curto	F	4
2003	142633	Franco da Rocha	SRD	curto	F	6
2003	22173	Perdizes	Pastor Alemão	longo	M	11
2004	152557	Juquitiba	SRD	curto	M	1
2004	156754	São Miguel	Cocker Spaniel	longo	M	4
2005	162712	Morumbi	Boxer	curto	F	4
2005	143717	Butantã	Boxer	curto	M	3
2005	157828	Rio Pequeno	SRD	curto	F	9
2006	156178	Mairinque	SRD	curto	F	6
2006	171272	Lapa	Boxer	curto	M	6
2006	140913	Caucaia do Alto	Boxer	curto	M	8
2007	175041	Jaguapé	Boxer	curto	M	8
2008	194037	Bragança Paulista	Boxer	curto	F	3
2008	190612	Osasco	Boxer	curto	F	4
2008	182591	Carapicuíba	Pitbull	curto	M	5
2008	68561	Butantã	Boxer	curto	M	12
2009	188318	Interlagos	Boxer	curto	M	5
2009	199387	Pinheiros	Bulldogue	curto	M	9
2010	207908	Lapa	Boxer	curto	M	5
					Média	5,5
					Moda	4
					Mediana	7

... = dado não disponível, SRD= sem raça definida, F= fêmea, M= macho

APÊNDICE B - Caracterização dos cães com Granuloma lepróide canino, segundo o ano da consulta, identificação, início do quadro lesional (estação do ano), evolução do quadro (dias), tratamento pretérito, exames complementares e resultado diagnóstico, tratamento instituído, continuidade da terapia até a alta clínica, alta clínica (dias). Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

(continua)

Ano da consulta	Prontuário	Início do quadro lesional (estação do ano)	Evolução do quadro (dias)	Tratamento pretérito (sim/não)	Exames complementares (resultado/diagnóstico)	Tratamento instituído (fármaco sistêmico)	Continuidade da terapia até a alta clínica	Alta clínica (dias)
1990	169020	primavera	10	sim	CITO(+)/HTP(+)	rifampicina	sim	30
1990	166064	primavera	30	não	CITO(+)/HTP(+)	rifampicina	sim	30
1991	197315	primavera	730	sim	CITO(+)/HTP(+)	rifampicina	não	...
1992	174	verão	?	não	CITO(+)/HTP(-)	rifampicina	sim	30
1992	6492	inverno	7	sim	CITO(+)/HTP(-)	rifampicina	não	...
1993	22711	verão	180	sim	HTP(+)	-	sim	90
1993	18692	verão	90	sim	CITO(+)/HTP(+)	rifampicina	sim	120
1993	17896	verão	?	não	CITO(+)/HTP(-)	rifampicina	sim	180
1994	32655	verão	60	sim	HTP(+)	rifampicina	sim	35
1995	49978	outono	45	sim	HTP(+)	rifampicina	sim	52
1995	48597	verão	365	sim	HTP(+)	rifampicina	não	...
1996	62361	inverno	45	não	HTP(+)	rifampicina	não	...
1997	75475	outono	30	não	CITO(-)/HTP(+)	rifampicina	sim	60
1999	104517	primavera	90	sim	CITO(+)/HTP(+)	enrofloxacina	não	...
1999	98810	outono	45	sim	CITO(-)/HTP(+)	enrofloxacina	não	...
2001	123344	primavera	?	não	HTP(+)	enrofloxacina	sim	120
2002	90417	outono	60	não	HTP(+)	enrofloxacina	sim	150
2002	136959	verão	?	não	HTP(+)	enrofloxacina	sim	90
2003	143919	inverno	30	sim	HTP(+)	enrofloxacina	não	...
2003	142633	inverno	?	sim	CITO(+)/HTP(-)	enrofloxacina	não	...
2003	22173	inverno	1095	não	HTP(+)	enrofloxacina	sim	60

?= dúvidas quanto à exatidão do valor dado, CITO= exame citobacterioscópico cutâneo, HTP= exame histopatológico cutâneo, (+)= positivo, (-)= negativo, - = ausente, ...= dado indisponível em face do não comparecimento nos retornos aprazados, *= tratamento em curso

APÊNDICE B - Caracterização dos cães com Granuloma lepróide canino, segundo o ano da consulta, identificação, início do quadro lesional (estação do ano), evolução do quadro (dias), tratamento pretérito, exames complementares e resultado diagnóstico, tratamento instituído, continuidade da terapia até a alta clínica, alta clínica (dias). Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

(conclusão)

Ano da consulta	Prontuário	Início do quadro lesional (estação do ano)	Evolução do quadro (dias)	Tratamento pretérito (sim/não)	Exames complementares (resultado/diagnóstico)	Tratamento instituído (fármaco sistêmico)	Continuidade da terapia até a alta clínica	Alta clínica (dias)
2004	152557	primavera	20	sim	CITO(+)/HTP(-)	enrofloxacina	sim	60
2004	156754	primavera	90	sim	HTP(+)	enrofloxacina	não	...
2005	162712	inverno	15	sim	CITO(+)/HTP(+)	enrofloxacina	sim	90
2005	143717	verão	30	sim	HTP(+)	enrofloxacina	sim	90
2005	157828	verão	?	não	HTP(+)	enrofloxacina	não	...
2006	156178	verão	?	não	CITO(+)/HTP(-)	enrofloxacina	não	...
2006	171272	verão	?	sim	HTP(+)	enrofloxacina	sim	90
2006	140913	verão	30	não	HTP(+)	enrofloxacina	sim	60
2007	175041	primavera	30	não	HTP(+)	enrofloxacina	sim	120
2008	194037	inverno	30	não	HTP(+)	enrofloxacina	não	...
2008	190612	outono	10	não	CITO(+)/HTP(-)	enrofloxacina	não	...
2008	182591	inverno	7	não	HTP(+)	enrofloxacina	não	...
2008	68561	primavera	10	sim	CITO(+)	enrofloxacina	sim	60
2009	188318	inverno	15	sim	CITO(+)/HTP(+)	doxiciclina	sim	90
2009	199387	verão	45	não	HTP(+)	enrofloxacina	não	...
2010	207908	verão	30	sim	CITO(+)/HTP(+)	doxiciclina	sim	90*

?= dúvidas quanto à exatidão do valor dado, CITO= exame citobacterioscópico cutâneo, HTP= exame histopatológico cutâneo, (+)= positivo, (-)= negativo, - = ausente, ...= dado indisponível em face do não comparecimento nos retornos aprazados, *= tratamento em curso.

APÊNDICE C - Caracterização dos cães com Granuloma lepróide canino, segundo a identificação, definição racial, presença de prurido, região corpórea acometida/distribuição e tipo lesional. Serviço de Dermatologia do HOVET-FMVZ/USP – Janeiro 1990 / março 2010. São Paulo (2010)

(continua)

Prontuário	Definição racial	Prurido	Região corpórea acometida e distribuição lesional	Tipo lesional
169020	Pastor Alemão	não	p.auricular (B) e interdigital	úlceras e crostas hemorrágicas
166064	Doberman	sim	p.auricular (B)	úlceras, nódulos e crostas hemorrágicas
197315	Boxer	sim	p.auricular (U)	nódulo,tumor e exulceração
174	Boxer	sim	p.auricular (B) e torácica	Alopecia, úlcera e eritema
6492	SRD	sim	p.auricular (U), esternal e interdigital	úlceras
22711	Boxer	não	p.auricular (B) e sacro-coccígea	nódulos e crostas melicéricas
18692	Terrier Brasileiro	sim	p.auricular (B)	alopecia, nódulos e úlceras
17896	Boxer	sim	p.auricular (B)	alopecia, úlceras, crostas, e hiperpigmentação
32655	Boxer	não	p.auricular (U) e nasal	nódulos e úlceras
49978	Mastiff	não	p.auricular (B) e torácica	úlceras, crostas hemáticas, pápulas, nódulos e alopecia
48597	Boxer	sim	p.auricular (B)	erosão e crostas hemáticas
62361	SRD	não	p.auricular (U)	Nódulo
75475	Boxer	sim	p.auricular (B)	Exulceração

Prontuário	Definição racial	Prurido	Região corpórea acometida e distribuição lesional	Tipo lesional
104517	Fila	sim	p.auricular (B) e torácica	úlceras, crostas melicéricas, nódulo e alopecia
98810	Boxer	sim	p.auricular (B), caudal e m.pélvicos	úlceras e nódulos
123344	Golden Retriever	sim	nasal	pápulas
90417	Labrador	não	p.auricular (B)	nódulos
136959	Boxer	sim	p.auricular (B)	nódulos
143919	Labrador	não	p.auricular (U)	erosão
142633	SRD	não	torácica	nódulos e úlceras
22173	Pastor Alemão	não	interdigital	nódulos
152557	SRD	não	p.auricular (U)	alopecia e crostas
156754	Cocker Spaniel	não	nasal	nódulo e alopecia
162712	Boxer	sim	p.auricular (B) e dorso-lombar	pápulas, nódulos, tumores e úlceras
143717	Boxer	não	p.auricular (B)	pápulas, nódulos, úlceras e crostas
157828	SRD	não	p.auricular (B)	nódulos e úlceras
156178	SRD	não	abdominal	pápulas, nódulos e exulceração
171272	Boxer	sim	p.auricular (B) e caudal	nódulos, erosão e úlceras
140913	Boxer	não	p.auricular (U)	nódulos

(conclusão)

Prontuário	Definição racial	Prurido	Região corpórea acometida e distribuição lesional	Tipo lesional
175041	Boxer	sim	p.auricular (B) e cefálica frontal	nódulos e úlceras
194037	Boxer	não	p.auricular (U), torácica e caudal	nódulo e alopecia
190612	Boxer	sim	p.auricular (U) e cefálica frontal	nódulos e tumor
182591	Pitbull	não	p.auricular (B)	nódulos e úlceras
68561	Boxer	não	p.auricular (B)	nódulos, erosão e alopecia
188318	Boxer	sim	p.auricular (B) e caudal	pápulas e nódulos
199387	Bulldogue	sim	p.auricular (U)	nódulo e alopecia
207908	Boxer	sim	p.auricular (U)	nódulos, alopecia, erosão, exulceração e crostas hemáticas

p.= pavilhões, B= bilateral, U= unilateral, m= membros

APÊNDICE D

Figura 1 - Citobacterioscopia cutânea do animal de prontuário nº 207908, Boxer, 5 anos, macho. Pré-terapia. Bacilos, em imagem negativa, no citoplasma de macrófago. Coloração panóptica, 1000X. Acervo: Serviço de Dermatologia HOVET-FMVZ/USP (2010).

Figura 2 - Citobacterioscopia cutânea do animal de prontuário nº 188318, Boxer, 5 anos, macho. Pré-terapia. Bacilos em imagem negativa no citoplasma de macrófago. Coloração panóptica, 1000X. Acervo: Serviço de Dermatologia HOVET-FMVZ/USP (2009).

APÊNDICE E

Figura 3 - Exame histopatológico com bacilos álcool-ácido-resistentes evidenciados. Coloração de Ziehl-Neelsen, 1000X. Acervo : LARSSON, C.E. (2008).

APÊNDICE F

Figura 4 - Animal de prontuário nº 19471, Pitbull, macho, 5 anos. Pré-terapia. Lesões em pavilhão auricular direito, com crostas hemorrágicas, formações nodulares erosadas e encimada por crosta hemática. Acervo: Serviço de Dermatologia HOVET-FMVZ/USP (2008)

APÊNDICE G

Figura 5 - Animal de prontuário nº 188318, Boxer, macho, 5 anos. Pré-terapia. Lesão nódulo-tumoral, erosada em pavilhão auricular esquerdo. Acervo: Serviço de Dermatologia HOVET-FMVZ/USP (2009)

APÊNDICE H

Figura 6 - Animal de prontuário nº 188318, Boxer, macho, 5 anos. Pós-terapia. Lesão alopécica e cicatriz residual. Acervo: Serviço de Dermatologia HOVET-FMVZ/USP (2009)