ANDRE LUIS SOARES DA FONSECA

**LEISHMANIOSE VISCERAL:
RAÇA CANINA E PERFIL LIPÍDICO**

**Tese apresentada no Instituto de Medicina
Tropical de São Paulo da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências**

**Área de Concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional.**

Orientadora: Profa. Hiro Goto

**São Paulo
2013**

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Fonseca, André Luis Soares da

Leishmaniose visceral: raça canina e perfil lipídico / André Luis Soares da Fonseca. – São Paulo, 2013.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Hiro Goto

Descritores: 1. LEISHMANIOSE VISCERAL ANIMAL. 2. DOENÇAS INFECCIOSAS EM ANIMAIS. 3. LEISHMANIA INFANTUM. 4. RAÇAS ANIMAIS. 5. LIPÍDEOS

USP/IMTSP/BIB-12/2013.

A DEUS, razão primeira e fundamento da nossa
existência, pelo dom da vida e pela oportunidade
de ser útil.

DEDICO este trabalho aos meus pais, João Gomes (*in memoriam*) e Ieda, pelo exemplo constante, apoio e dedicação presentes em toda a minha formação tanto profissional como humana.

DEDICO este trabalho à minha esposa
JAQUELINE e à minha filha LUISA, amigas e
companheiras no curso desta vida, fundamento
de tudo o que penso ou faço.

AGRADECIMENTOS

O agradecimento que quero prestar está repleto de uma carga de profunda gratidão. Num trabalho como este, a que nos dedicamos durante mais de 5 anos de nossa vida, o resultado que apresentamos não é só nosso. É de todas as pessoas que, de formas diferentes, contribuíram para chegarmos a este ponto.

Por isso, meu reconhecimento e emocionado muito obrigado!

Obrigado à Profa. Dra. Hiro Goto, pela acolhida no IMTSP/USP, pela excelência na orientação e exemplo permanente de brilhante professora e formadora de pesquisadores. Obrigado à Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez, pela amizade fraterna e auxílio incondicional na realização das análises estatísticas.

Obrigado aos amigos do Laboratório DiagnóVet, em Campo Grande/MS, em especial às Dras. Karin Virgínia Kuibida e Thatianna Camillo Pedroso, pela amizade pessoal e auxílio na realização de tantas coletas e exames.

Obrigado às amigas e colegas da disciplina de Imunologia na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, profas. Dras. Inês Aparecida Tozetti, Alda Maria T. Ferreira, e Cacilda T. Junqueira Padovani pelo incentivo e auxílio incondicional em todos os momentos deste trabalho.

A todas vocês também DEDICO este trabalho.

RESUMO

Fonseca ALS. Leishmaniose Visceral: raça canina e perfil lipídico (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2013.

A leishmaniose visceral, causada no Brasil por protozoários da espécie *Leishmania (L.) infantum*, apresenta-se nos canídeos com manifestações similares à doença humana. Diversos trabalhos tem investigado a relação entre raças caninas e suscetibilidade/resistência à doença sendo as alterações lipídicas consideradas também nessa avaliação. Para avaliar o grau de comprometimento conforme a raça e as alterações lipídicas nos cães portadores de leishmaniose visceral, analisamos alterações hematológicas e bioquímicas frente à manifestação da doença em diferentes raças ou grupos raciais. Para tanto, incluímos 162 cães de área endêmica, sem histórico de outras patologias ou de vacinação contra leishmaniose, organizados em grupos de cães naturalmente infectados segundo a raça, quais sejam, Boxer, Labrador, Pit Bull, Sem Raça Definida (SRD) e Outras Raças, e grupo controle não infectados. Na avaliação das manifestações clínicas, dividimos os animais, dentro de cada grupo de cães infectados em assintomáticos (sem nenhum sinal clínico), oligossintomáticos (de 1 a 3 sinais clínicos) e polissintomáticos (acima de 3 sinais clínicos). As raças/grupos formadas pelo total de cães infectados (assintomáticos + oligossintomáticos + polissintomáticos) também foram avaliados segundo o escore de gravidade da infecção. Para analisar as possíveis alterações laboratoriais decorrentes da infecção de cães por *Leishmania (L.) infantum* foram realizados hemograma, leucograma, dosagens de

albumina, globulinas, proteínas plasmáticas totais, creatinina, ureia, alanino aminotransferase (ALT), Fosfatase Alcalina (FA), colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoproteins*, HDL), lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoproteins*, LDL), lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoproteins*, VLDL) e triglicérides. Analisados em conjunto, observamos que os animais assintomáticos, independentemente de raça/grupo, apresentaram parâmetros bioquímicos e hematológicos similares aos valores descritos para o grupo controle não infectado. Não observamos diferença na gravidade das manifestações da doença entre as raças ou grupos raciais para o desenvolvimento da Leishmaniose Visceral Canina. As diversas raças e grupos raciais apresentaram alterações nos parâmetros pesquisados, porém os quadros de hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e anemia foram identificados com maior frequência, sendo correlacionados à gravidade na raça Labrador e nos grupos SRD e Outras Raças. O quadro de anemia foi mais importante na raça Pit Bull. O grupo Outras Raças apresentou o maior número de alterações correlacionadas à gravidade. A raça Labrador apresentou concentração de HDL diminuída em relação às demais raças. As alterações lipídicas, principalmente em HDL, VLDL e triglicérides foram correlacionadas à gravidade no grupo Outras Raças.

Descritores: Leishmaniose Visceral. Leishmania infantum. Cão. Raça. Lipoproteínas. Hemograma. Bioquímica de sangue.

ABSTRACT

Fonseca ALS. Visceral leishmaniasis: canine breeds and lipid profile (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2013.

Visceral leishmaniasis caused in Brazil by protozoa *Leishmania (L.) infantum*, presents in dogs similar manifestations as human disease. Some work has investigated the relationship between dog breeds and susceptibility/resistance to disease and lipid changes has been also considered in this evaluation. To assess the degree of commitment according breed and lipid changes in dogs with visceral leishmaniasis, we analyzed hematological and biochemical parameters and the manifestation of the disease in different breeds or groups. Therefore, we included 162 dogs from an endemic area of Brazil with no history of other diseases or vaccination against leishmaniasis, organized in groups of dogs naturally infected by breed, namely Boxer, Labrador, Pit Bull, Mogrel dogs, Other Breeds and uninfected control group. In the evaluation of the clinical manifestations, we divided the animals in infected asymptomatic (no clinical signs), oligosymptomatic (1-3 clinical signs) and polisymptomatic dogs (above 3 clinical signs). Breeds/groups formed by the total of infected dogs (asymptomatic+oligosymptomatic+polisymptomatic) were also assessed according to the severity of the infection. To analyze the possible laboratory changes resulting from infection of dogs by *Leishmania (L.) infantum* were performed red blood cell count, white blood cell count, evaluation of albumin,

globulin, total plasma protein (TPP), creatinine, urea, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol, high density lipoproteins (HDL), low density lipoproteins (LDL), very low density lipoprotein (VLDL) and triglycerides. Taken together, we observed that asymptomatic animals, regardless of breeds/group, showed biochemical and hematological parameters similar to values reported for the uninfected control group. There were no differences in severity of disease manifestations among breed or racial groups for the development of Canine Visceral Leishmaniasis. The different breeds and racial groups showed changes in the parameters studied, but hypoalbuminemia, hypergammaglobulinemia and anemia were identified more frequently being correlated to the severity in Labrador, mongrel and Other Breeds groups. The anemia was most important in Pit Bull. The group Other Breeds had the largest number of changes correlated to the severity. The Labrador showed decreased HDL levels compared to other breeds. Lipid changes, especially in HDL, VLDL and triglycerides were correlated to the severity in the Other Breeds group.

Descriptors: Visceral Leishmaniasis. Leishmania Infantum. Dog. Breed. Lipoproteins. Count Blood Cell, Blood tests.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanino Aminotransferase
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
COL	Colesterol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FA	Fosfatase Alcanina
HDL	High Density Lipoprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
PPT	Proteínas Plasmáticas Totais
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SRD	Sem Raça Definida
TH1	Linfócitos T auxiliares tipo 1
TH2	Linfócitos T auxiliares tipo 2
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Distribuição do número de cães controle não infectados e de cães de diferentes raças portadores de leishmaniose visceral canina de acordo com a idade.	37
Tabela 2 - Distribuição do número de cães controle não infectados e de cães de diferentes raças portadores de leishmaniose visceral canina de acordo com o sexo.	38
Tabela 3 - Distribuição do número de cães portadores de leishmaniose visceral canina de acordo com a raça e manifestações clínicas.	38
Tabela 4 – Frequência de cães portadores de LVC com resultados de exames laboratoriais alterados em comparação com os valores normais	41

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Escore de gravidade e mediana por raça/grupo de cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos / polissintomáticos).	39
Figura 2.	Concentração de albumina, globulinas e PPT (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.	43
Figura 3.	Concentração de albumina, globulinas e PPT (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.	45
Figura 4.	Concentração de creatinina e ureia (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.	46
Figura 5.	Concentração de creatinina e ureia (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.	48
Figura 6.	Concentração de ALT e fosfatase alcalina (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.	49
Figura 7.	Concentração de ALT e fosfatase alcalina (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.	51
Figura 8.	Concentração de hemácias, leucócitos e plaquetas (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em sangue de cães	53

controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.

Figura 9.	Concentração de hemácias, leucócitos e plaquetas (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em sangue de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.	56
Figura 10.	Concentração de hemoglobina, do VG e CHCM (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.	57
Figura 11.	Concentração de hemoglobina, do VG e CHCM (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.	61
Figura 12.	Concentração de HDL e LDL (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.	62
Figura 13.	Concentração de HDL e LDL (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.	65
Figura 14.	Concentração de VLDL e triglicérides (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.	66
Figura 15.	Concentração de VLDL e triglicérides (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.	68
Figura 16.	Correlação entre o escore de gravidade e as concentrações de albumina, globulina e PPT em soros de cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).	69
Figura 17.	Correlação entre o escore de gravidade e a concentração de creatinina em soros de cães portadores de LVC do grupo Outras Raças (N=43), analisando o total	70

de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).

Figura 18.	Correlação entre o escore de gravidade e as concentrações de ALT e FA em soros de cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).	71
Figura 19.	Correlação entre o escore de gravidade e a concentração de hemácias e leucócitos em sangue de cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).	72
Figura 20.	Correlação entre o escore de gravidade e as concentrações de hemoglobina e CHCM e do VG em cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).	74
Figura 21.	Correlação entre o escore de gravidade e as concentrações de LDL e HDL em soros de cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).	75
Figura 22.	Correlação entre o escore de gravidade e as concentrações de VLDL e triglicérides em soros de cães do grupo Outras Raças portadores de LVC analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	As Leishmanioses	17
1.2	Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	19
1.3	Fatores Predisponentes à Leishmaniose Visceral Canina	21
1.4	O Perfil Lipídico Sérico e as Leishmanioses	26
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAL E METODOS	30
3.1	Cães	30
3.2	Coleta dos Materiais Biológicos e Processamento das Amostras	32
3.3	Punção Aspirativa Por Agulha Fina de Linfonodos	32
3.4	Punção Aspirativa Por Agulha Fina de Medula Óssea	32
3.5	<i>Imprint</i> de Orelha	33
3.6	Coloração do Material Puncionado	34
3.7	Coleta de Amostras de Sangue e Obtenção de Soro	34
3.8	Hemograma	34
3.9	Determinação do Colesterol Total	34
3.10	Determinação do Colesterol HDL Sérico	34
3.11	Determinação dos Triglicérides Séricos	35
3.12	Cálculo das Concentrações de LDL e VLDL	35
3.13	Bioquímica Sérica (PPT, Albumina, Globulinas, ALT, Creatinina e Ureia)	35
3.14	Dosagem de Fosfatase Alcalina (FA) Sérica	36
3.15	Análises Estatísticas	36
4	RESULTADOS	37
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
	APENDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	99
	APENDICE B – Formulário Para Coleta de Dados	101
	ANEXO A – Comitê de Ética do IMTSP/USP	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas não contagiosas e compreendem um grupo de patologias causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, transmitidas por insetos vetores genericamente conhecidos como flebótomos e que pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, no Velho Mundo e Novo Mundo, respectivamente. Estão classificadas entre as principais doenças negligenciadas, segundo a Organização Mundial da Saúde, com cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco e com mais de 2 milhões de casos humanos registrados anualmente (WHO, 2010). Em suas diferentes formas, as leishmanioses são a terceira doença vetorial de maior relevância em termos globais, após a Malária e a Filariose (Reithinger & Davies, 2002). Há relatos de transmissão das leishmanioses em 98 países e 3 territórios em 5 continentes, não havendo relatos somente na Antártica (Bañuls et al. 2007; Alvar et al. 2012).

As leishmânias são parasitas digenéticos apresentando um estágio extracelular no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado sob a forma promastigota e outro estágio intracelular no hospedeiro vertebrado sob a forma amastigota (Bañuls et al. 2007). Elas se reproduzem dentro de células do sistema monocítico fagocitário dos mamíferos sob forma amastigota, que apresenta aspecto arredondado e sem flagelo externo (Sacks, 1992) e transformam-se em formas promastigotas, de aspecto alongado com flagelo externo no tubo digestivo do inseto vetor. As fêmeas dos flebotomíneos se infectam ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro e uma proporção relativamente baixa de flebotomíneos infectados (0,5 a

3%) é suficiente para a manutenção da doença nas áreas endêmicas. (Solano-Gallego et al. 2011).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, segundo o padrão de desenvolvimento dos parasitas no intestino do vetor (Laison e Shaw, 1987). Atualmente são conhecidas 30 espécies de leishmania e aproximadamente 21 delas são capazes de causar doenças em seres humanos (Bañuls et al. 2007; Sharma & Singh, 2009). Destas, aproximadamente 13 espécies tem características zoonóticas (Gramiccia e Gradoni, 2005).

A infecção determina as formas clínicas tegumentar e visceral (Pearson, 1993). Na espécie humana, as leishmanioses podem apresentar as formas tegumentar (Leishmaniose Tegumentar ou LT), mucocutânea (Leishmaniose Mucocutânea, ou LMC) e visceral (Leishmaniose Visceral ou LV); nos cães, as formas mais comumente identificadas são a tegumentar e a visceral.

A Leishmaniose Visceral Humana (LVH) é endêmica nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Américas Central e do Sul, sendo que no sul da Europa, mais de 70% dos casos de leishmaniose visceral em adultos estão associados à infecção por HIV e mais de 9% dos pacientes com AIDS também sofrem de leishmaniose visceral (Reithinger & Davies. 2002). Na Índia ocorrem metade dos 500.000 casos anuais da doença, que está se disseminando para áreas não endêmicas do mundo devido a co-infecção com o vírus HIV (Sharma & Singh, 2009).

No Brasil, a leishmaniose visceral humana (LVH) é uma doença endêmica. Sua ocorrência que, inicialmente, estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, encontra-se em franca expansão para grandes centros. A LVH está distribuída em 21 unidades da federação, atingindo as cinco regiões brasileiras. Nos últimos dez anos, tem sido registrada média anual de 3.379 casos e a incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes (Brasil, 2009). O período

de incubação é bastante variável no homem, variando de 10 dias a 24 meses, em média, de 2 a 6 meses (Brasil, 2010).

A presença de parasitos do gênero *Leishmania* já foi descrita em várias espécies de mamíferos: tatus, bicho preguiça, cães, gatos, morcego, ratos, lebres, *gerbils*, homens, macacos, gambás, cavalos, morcegos, cabritos, cangurus etc (Ashford, 1996; Saliba et al. 1999; Lampo et al. 2000; Gramiccia e Gradoni, 2005; Molina et al. 2012; Ramirez et al. 2012). Os cães são considerados pela literatura científica como o principal reservatório urbano da doença visceral, a despeito da ausência de estudos criteriosos sobre a importância de outros mamíferos domésticos e sinantrópicos na manutenção do parasita (Costa, 2000) e da carência de estudos sobre os fatores ambientais e biológicos relacionados à doença (Abranches et al. 1991).

A importância dos cães como reservatório da doença deve-se ao relacionamento próximo do homem com estes animais e à alta prevalência da infecção humana onde a prevalência da leishmaniose visceral canina é alta (Dantas-Torres, 2007; Quinnell et al. 2009). No Brasil, com o processo de urbanização, o cão detém maior importância como reservatório do parasita (Dantas-Torres, 2007; Souza et al., 2010).

1.2 A Leishmaniose Visceral Canina

A leishmaniose visceral, causada no Brasil por protozoários da espécie *Leishmania (L.) infantum*, tem nos canídeos um importante reservatório para a transmissão da doença ao homem. A LVC é considerada a doença zoonótica potencialmente fatal mais relevante da Europa, Ásia, África e América (Baneth et al. 2008), sendo endêmica em mais de 70 países (Solano-Gallego et al. 2011). Na Europa, estima-se em 2,5 milhões de cães infectados na Itália, França, Espanha e

Portugal (Moreno & Alvar 2002), e a soroprevalência canina varia entre 5 a 30% na bacia do Mediterrâneo (Fisa et al., 1999; Sideris et al., 1999).

Em um estudo epidemiológico quantitativo analisando dados de cães infectados na América do Sul e na Europa, Quinnell e Courtenay (2009) concluíram que a relação entre infectividade e sinais clínicos eram similares nos dois continentes, mas que a proporção de cães acometidos era maior na Europa (0.86) do que na América do Sul (0.45). Sugeriram, ainda, que um dos principais vetores da leishmaniose visceral na Europa, o *P. perniciosus*, fosse mais suscetível à infecção do que o principal vetor da doença na América do sul, a *L. longipalpis*.

Levantamentos epidemiológicos utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase (*Polimerase Chain Reaction*; PCR) em áreas endêmicas tem confirmado a alta prevalência da infecção em cães numa proporção muito superior àquela que desenvolve a forma sintomática da doença. Um estudo envolvendo 100 cães na ilha de Maiorca, na Espanha, indicou que cerca de 13% dos cães aparentavam a doença clínica, 26% dos cães apresentavam títulos positivos de anticorpos para a doença e que 63% apresentavam PCR positivo (Solano-Gallego et al. (2001). Na Grécia, de 73 cães de caça pesquisados, 12,3% apresentavam sorologia positiva, enquanto que 63% eram positivos pela técnica de PCR (Leontides et al. (2002).

Apesar da importância dos cães como reservatórios da doença estar bem estabelecida, não existe nenhum dado oficial sobre o número de cães acometidos no Brasil ou na América do Sul. No Brasil, estima-se em milhões o número de cães infectados (Baneth et al. 2008). Trabalhos científicos publicados apresentam uma prevalência da LVC entre 1,9% a 51,35% em áreas endêmicas do Brasil (França-Silva et al. 2003, Dantas-Torres et al. 2006, Moraes et al. 2013). Ademais, a prevalência na população canina é maior do que na humana e a

identificação de casos caninos precede os casos humanos (Moura *et al.*, 1999; Feitosa *et al.*, 2000; Bevilacqua *et al.* 2001).

Nem todo cão inoculado com formas promastigotas de leishmania pelo vetor desenvolve a LVC (Berrahal, 1996; Miró 2006). A maioria dos cães que vivem em área endêmica é exposta, mas somente alguns desenvolvem a doença (Leontides *et al.* 2002; Alvar *et al.* 2004). Estudos transversais realizados na Europa sugerem que aproximadamente 50% dos cães soropositivos são assintomáticos (Gradoni *et al.* 1988; Pozio *et al.* 1981). Alguns cães apresentam regressão espontânea da doença (Manzillo *et al.* 2013), comprovada pela observação da redução dos níveis de anticorpos séricos (Fisa *et al.* 1999) e a identificação de cães infectados que apresentem um risco imediato para transmissão da doença não tem sido devidamente avaliada (Verçosa *et al.* 2008).

A LVC é uma doença sistêmica e a manifestação tem um amplo espectro de sinais clínicos e graus de severidade. No hospedeiro mamífero, as leishmanias são microrganismos intracelulares parasitando preferencialmente células do sistema mononuclear fagocítico responsáveis pela resposta imune inata, em especial monócitos e macrófagos, que ao migrarem para os tecidos inflamados carregam em seu interior as formas amastigotas. Por esta circunstância, a leishmaniose visceral é considerada uma doença sistêmica que potencialmente pode comprometer qualquer órgão ou tecido, o que resulta em sinais clínicos não específicos (Solano-Gallego *et al.* 2011; Saridomichelakis *et al.* 2013).

Quanto ao número de sinais clínicos, os animais acometidos são geralmente classificados como assintomáticos (sem sinal clínico), oligossintomáticos (apresentado até 2 sinais clínicos) ou polissintomáticos (três ou mais sinais clínicos). As manifestações clínicas no cão e no homem doentes são similares, apresentando sinais inespecíficos como febre irregular, anemia, perda de peso progressiva e caquexia (Feitosa *et al.*, 2000). Além destes, os principais

sintomas associados à leishmaniose visceral canina são: linfadenomegalia localizada ou generalizada, lesões dérmicas, anemias, leucopenias, epitaxe, onicogrifose, perda de apetite, lesões oculares e perioculares, diarreia, e lesões renais (Ferrer, 1991; Ciaramella et al. 1997; Koutinas et al 1999; Queiroz et al., 2011; Freitas et al. 2012). No cão, os sinais clínicos da doença podem levar desde 3 meses a vários anos com média de 3 a 7 meses para se manifestar (Brasil, 2010), dependendo da virulência do parasita e da suscetibilidade genética do hospedeiro (Reiner & Locksley, 1995; Miró et al. 2006). A frequência e a quantidade cumulativa destes sinais aumentam com a progressão da doença (Foglia Manzillo et al. 2013).

Entretanto, estudos soroepidemiológicos tem demonstrado que um grande número de cães assintomáticos são soropositivos (Sideris *et al.*, 1999, Laurenti et al. 2013) e que a expressiva prevalência de infecções inaparentes e oligossintomáticas nestes animais, associada ao intenso parasitismo cutâneo, podem representar uma importante fonte de infecção para o vetor na transmissão da doença para o homem (Palatnik-de-Souza *et al.*, 2001; Feitosa, 2000). O cão é mais suscetível ao desenvolvimento da doença, mais refratário ao tratamento, frequentemente apresentando recidivas e permanecendo infectado por meses ou até pela vida toda sem apresentar sinais clínicos (Moreno e Alvar, 2002).

1.3 Fatores Predisponentes à Leishmaniose Visceral Canina

Além das características genéticas, a resposta imune contra a *Leishmania* é modulada por vários fatores do hospedeiro como estado nutricional (Cerf et al. 1987; Dye e Williams, 1993; Anstead et al. 2001), idade (Dye e Williams, 1993) e estado imunológico (Barbieri, 2006; McConville, 2007), assim como fatores intrínsecos do parasito, como a espécie e a cepa (Frade, 2011). A maior parte dos seres humanos que se infecta por *Leishmania spp.* visceralizantes nunca desenvolvem a doença (Nylén e Sacks, 2007).

Os cães podem apresentar dois diferentes tipos de resposta imunológica na LVC. Enquanto a maioria dos cães apresenta suscetibilidade, com evolução para a doença, uma pequena porcentagem apresenta resistência, não apresentando a doença ou curando espontaneamente (Martínez-Moreno et al., 1995). Este estado de resistência tem sido associado também ao desenvolvimento de resposta imune celular específica enquanto que a manifestação da doença e a disseminação dos parasitas pelos tecidos estão correlacionadas com a detecção de altos títulos de anticorpos e resposta imune celular diminuída (Pinelli et al 1994; Cabral et al. 1998; Solano-Gallego et al. 2001).

A resposta imunológica exerce um papel decisivo nesta dicotomia infecção versus doença. Os linfócitos T auxiliares CD4⁺ (T CD4) participam da polarização da resposta imune para o desenvolvimento de um perfil TH1, gerador de uma resposta imune celular, ou TH2, que polariza para uma resposta predominantemente humoral. A resistência à doença parece estar associada a uma resposta mista entre TH1 e TH2, tanto no cão como no ser humano, com predominância do perfil TH1, enquanto a suscetibilidade parece estar relacionada ao perfil TH2. A resposta imune celular do tipo TH1, mediada por interleucinas como INF- γ e TNF- α parece predominar em cães assintomáticos que apresentam resistência à manifestação da leishmaniose visceral (Barbieri, 2006). Por outro lado, a função das citocinas relacionadas ao padrão TH2, como a IL-4 e a IL-10, ainda é controverso, apesar de haver evidências da existência da correlação entre estas citocinas e a progressão da doença (Almeida et al. 2005). Ainda, foi encontrada associação entre baixa contagem de linfócitos T helper e uma maior infectividade para flebotomíneos entre cães naturalmente infectados (Guarga et al. 2000).

Evidências obtidas de cães portadores de LVC demonstram que a presença da resposta imune mediada por anticorpos IgG1 apresenta associação

com a progressão da doença (cães sintomáticos e não ou mal respondedores ao tratamento) enquanto que a presença de anticorpos IgG2 está relacionada com infecções assintomáticas e até mesmo a resistência à doença (Deplazes et al, 1995), ou seja, a presença de anticorpos IgG1 está associada a resposta imune tipo TH1 e anticorpos IgG2 associam-se a resposta TH2 (de Oliveira Mendes, 2003).

Outros fatores relacionados ao aparecimento da manifestação clínica da doença nos cães são pouco conhecidos. Em humanos, a faixa etária infantil e indivíduos com algum grau de deficiência imunológica (por exemplo, devido a desnutrição ou subnutrição, ou em pacientes HIV positivos são condições predisponentes (Alvar *et al.* 1997; Cerf *et al.* 1987; Dye and Williams 1993), mas a sua importância ainda está sendo investigada em relação aos cães.

A importância do perfil genético nas leishmanioses está bem caracterizada em modelos murinos em que genes do complexo de histocompatibilidade murina (H-2) e genes não relacionados ao H-2 estão implicados na susceptibilidade ou resistência à doença. Sabe-se também que há fatores genéticos envolvidos na susceptibilidade dos seres humanos à doença (Feitosa et al. 1999; Peacock et al. 2001). O gene *Slc11a1* (anteriormente designado *Nramp1*), que está relacionado à capacidade do macrófago em limitar a replicação intracelular de patógenos, foi identificado como estando relacionado à susceptibilidade no camundongo e o seu equivalente nos cães também à susceptibilidade à LVC (Altet *et al.* 2002; Sanchez-Robert *et al.* 2005). Também foi demonstrada correlação entre o gene *Slc11a1* e a manifestação da leishmaniose tegumentar assim como correlação entre o receptor de quimiocina CXCR1 (IL8RA) e a infecção por *L. braziliensis* em seres humanos, sugerindo-se a possibilidade de efeito sinérgico nesta associação (Castellucci et al. 2010).

A susceptibilidade genética à leishmaniose tem sido apontada em vários trabalhos científicos e esta pode variar entre as diferentes raças caninas (Sanchez-

Robert et al. 2005). Quinnell & Courtenay (2009), comparando dados de infecção e infectividade entre cães na América do Sul e Europa, sugerem que o fator racial canino possa estar implicado nesta suscetibilidade. O tipo de raça canina tem sido identificado como um fator que interfere na resposta terapêutica sugerindo a existência de fatores genéticos raciais que modulam a progressão da doença e, consequentemente, o seu prognóstico.

Doberman e Pastor Alemão foram identificados por Abranches et al. (1991) como as raças mais suscetíveis num estudo feito em Portugal. Cães sem raça definida (SRD), cães de caça e Pastor Alemão foram os mais identificados num estudo com 150 cães naturalmente infectados na Itália (Ciaramella, 1997). Miranda et al (2005) identificaram Pastor Alemão, Rotweiller e Boxer como as raças mais representadas dentre os animais infectados num estudo na Espanha. Boraschi e Nunes, (2007) descreveram maior acometimento dos cães de pêlo curto associado a baixa barreira mecânica fornecida ao vetor.

Solano-Gallego *et al.* (2000) descreveram resistência da raça Ibizian hound à infecção por *Leishmania* por apresentar uma resposta imune celular efetiva ao parasito.

A LVC foi diagnosticada em 41% dos cães da raça Foxhound em um canil do estado de Nova York, EUA, mas em nenhum dos cães das raças Beagle ou Basset Hound do mesmo local (Gaskin et al. 2002). Entretanto, se se considerar que a possibilidade de transmissão vertical seja a principal via de transmissão nestes cães, então a característica genética poderá não ser absolutamente necessária para a disseminação da doença (Petersen & Barr 2009). A descrição da LVC em determinadas famílias de Foxhound e o relato da existência de cães que são resistentes ao desenvolvimento da doença sugerem que fatores genéticos possam pelo menos em parte determinar qual animal irá desenvolver a doença e qual irá ficar clinicamente normal.

Outros trabalhos, contudo, não encontraram correlação entre a manifestação da doença e predisposição sexual, racial ou etária (Slappendel, 1988; Fisa et al. 1999; Noli, 1999; Feitosa et al., 2000; Gontijo e Melo, 2004; de Almeida Ado et al. 2012)

1.4 O Perfil Lipídico Sérico e as Leishmanioses

Os lipídeos são um grupo heterogêneo de compostos que exercem diversas funções orgânicas como armazenamento de energia, atuam como cofatores e mensageiros intracelulares e são componentes estruturais de hormônios e de membranas celulares (Rifai et al. 1999).

Várias infecções e processos inflamatórios estão associados com alterações marcantes no metabolismo de lipídeos e lipoproteínas (Garbagnati, 1993; Bekaert et al. 1989, 1992). Na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foram relatados níveis de triglicérides aumentados e níveis de High Density Lipoproteins (HDL) diminuídos (Fessel *et al.*, 2002). Chisari (1977) demonstrou que VLDL extraída do plasma humano era capaz de inibir a síntese de DNA em monócitos de sangue periférico humano (PBMC) mesmo após diferentes estímulos mitogênicos e alogênicos. Curtis (1992) relata que o LDL exerce capacidade imunossupressiva na proliferação de linfócitos induzida por mitógeno. Pacientes com linfocitose eritrocítica foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos *in vitro* e este efeito foi correlacionado à concentração aumentada de triglicérides (Ladish et al. 1978).

Utilizando modelos murinos com diferentes padrões genéticos e modelo de dislipidemia induzida por dieta rica em gorduras e colesterol, Shamshiev *et al.* (2007) observaram uma inibição significativa da produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por receptores do tipo toll (TLR) além de uma importante diminuição da ativação de células dendríticas, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Observaram, ainda, uma diminuição da resposta do tipo TH1 e uma polarização da resposta imune celular do tipo TH2, a qual comprometia a resistência frente a infecção por *L. major*. Na leishmaniose visceral ativa tanto humana como canina também são descritas alterações no metabolismo lipídico (Nieto *et al.*; 1992; Liberopoulos *et al.*, 2002; Soares *et al.* 2010).

Entretanto, ainda é pouco compreendida a relação entre níveis de colesterol e a infecção de células hospedeiras por protozoários como *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.* e *Toxoplasma gondii* (Bansal *et al.* 2005). Soares *et al.* (2010) demonstraram que a adição de LDL e HDL a culturas *in vitro* de macrófagos parasitados ou não por *Leishmania sp.* aumentava a produção de IL-6, IL-10, mas não de IL-12.

Os níveis de triglicérides encontrados por Barral *et al.* (1986) no soro de 10 pacientes portadores de leishmaniose visceral foi de $217 \pm 50\text{mg}/100\text{ ml}$, enquanto que nos soros controle pareados foi de $100 \pm 25\text{ mg}/100\text{ ml}$ ($P < 0.05$). Bekaert *et al.* (1989, 1992) descreveram uma redução na concentração de HDL-colesterol e aumento marcante na concentração de triglicérides em crianças portadoras de leishmaniose visceral. De forma semelhante, Soares *et al.* (2010) identificaram níveis aumentados de triglicérides e VLDL em pacientes com leishmaniose visceral, e níveis de LDL e HDL diminuídos quando comparado aos controles.

Liberopoulos *et al.* (2002) relataram o caso de um paciente portador de leishmaniose visceral com acentuada hipocolesterolemia, discreta hipertrigliceridemia e acentuada diminuição de LDL e HDL. Quadro semelhante foi descrito por Lal *et al.* (2007) em quatro casos pediátricos de leishmania visceral causada por *L. donovani* em que foi constatada hipocolesterolemia, hipertrigliceridemia, concentrações reduzidas de LDL e HDL e aumento de VLDL.

Soares *et al.* (2010) encontraram níveis aumentados de triglicérides e de VLDL e níveis diminuídos de colesterol total, LDL e HDL em vinte e seis pacientes infectados por *L. (L.) chagasi*.

Alterações nas concentrações plasmáticas de lipídeos e nas lipoproteínas também foram observadas em cães portadores de leishmaniose visceral (Gascón *et al.* 1988). Nieto *et al.*, (1992) analisaram dezesseis cães acometidos de LVC e constataram uma alteração no metabolismo lipídico com aumento na concentração de triacilglicerol (TAG), aumento moderado no colesterol total e diminuição de HDL (High Density Lipoprotein), sugerindo um possível papel dos lipídeos na evolução da LVC. Ramos *et al.* (1994), em 15 cães do Rio de Janeiro, encontraram valores de colesterol total acima do normal e triglicérides dentro da normalidade.

Em face destas observações, procuramos avaliar as alterações clínico/laboratoriais em cães portadores de LVC correlacionando os diferentes padrões raciais (Boxer, Labrador, Pit Bull, SRD (sem raça definida) e Outras Raças), frente ao número de sinais clínicos (assintomático, oligossintomático e polissintomático) e à gravidade dos sinais, analisando padrões hematológicos e bioquímicos de maior relevância, com ênfase ao perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicérides)

2 OBJETIVOS

- Avaliar a implicação do fator racial canino na evolução da LVC causada por *L (L.) infantum*;
- Analisar o perfil lipídico plasmático de cães portadores de LVC e correlacioná-lo à raça e à suscetibilidade/manifestação clínica diversificada da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cães

Foram utilizados 162 cães, de ambos os sexos, entre 5 e 156 meses de idade, sem histórico ou diagnóstico de outras infecções, não vacinados contra leishmânia, oriundos da cidade de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, área endêmica para leishmaniose visceral canina. Para o diagnóstico de leishmaniose utilizaram-se os testes sorológicos Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), exames parasitológicos diretos de material de punção de linfonodo poplíteo e medula óssea, assim como de *imprint* de pele de lóbulo de orelha. Foram considerados infectados por leishmânia aqueles que apresentassem resultado positivo em qualquer destes exames. Os cento e cinquenta e dois cães considerados infectados eram de propriedade particular, sendo que cento e cinquenta vieram por encaminhamento para coleta de sangue para exame de contraprova após resultado sorológico positivo realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS e dois cães foram encaminhados para eutanásia no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Foram incluídos 10 cães não infectados (grupo controle), sendo que sete animais pertenciam à Companhia Independente de Gerenciamento de Crises e Operações Especiais (CIGCOE) da Polícia Militar do estado de Mato Grosso do Sul e três cães eram de propriedade particular.

Os proprietários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do IMTUSP (APENDICE I)

Os grupos experimentais de cães infectados foram organizados segundo a quantidade de sinais clínicos em Grupo Assintomático (sem nenhum sinal clínico),

Grupo Oligossintomático (com 1 até 3 sinais clínicos) e Grupo Polissintomático (com mais de 3 sinais clínicos). Os sinais clínicos mais relacionados a cães com LVC foram: aumento do tamanho de baço, fígado e linfonodos, lesões de pele e anexos (alopecias, dermatites, hiperpigmentação, hiperqueratinização, úlceras, escaras, nódulos, onicogribose etc), lesões oculares (conjuntivites, ceratites, uveítes, glaucoma etc), perda de peso, hipertermia e alterações em mucosas (palidez, cianose, hemorragias, ulceração em cavidade oral e nasal, etc) e alterações musculoesqueléticas (paresias, parestesias, etc).

Os grupos experimentais foram também estruturados segundo as raças Boxer, Labrador, Pit Bull, SRD (Sem Raça Definida) e Outras Raças (somatória das demais raças sem expressão numérica).

Os cães infectados também foram avaliados segundo a gravidade da infecção utilizando-se a somatória das variáveis (principais sinais clínicos) a seguir listadas e às quais foram atribuídos pesos ponderais:

- Onicogribose = 2
- Lesão de pele = 1
- Alteração de mucosa = 2
- Hipertermia = 2
- Lesão ocular = 2
- Aumento do Linfonodo Poplíteo = 3
- Perda de peso = 3
- Aumento do fígado = 4
- Aumento do baço = 4

Os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados em formulário (APENDICE II) e todos os animais foram fotografados.

3. 2 Coleta dos Materiais Biológicos e Processamento das Amostras

Os materiais biológicos de todos os cães foram coletados na Sala de Coleta do Laboratório Veterinário DiagnoVet, em Campo Grande/MS, onde também foram realizados os exames bioquímicos, hematológicos e parasitológicos. Os testes sorológicos RIFI e ELISA foram realizados no laboratório Hermes Pardini, em Belo Horizonte/MG.

3.3 Punção Aspirativa por Agulha Fina de Linfonodos

Foi realizada punção aspirativa por agulha fina do linfonodo poplíteo dos cães dos grupos controle não infectados e grupos infectados utilizando-se seringas de 3ml e agulhas estéreis 25x8 mm. Os animais foram adequadamente contidos e não houve necessidade de sedação ou anestesia. A antisepsia da pele sobreposta ao linfonodo foi feita com álcool iodado a 2% e material coletado realizando-se 10 movimentos aspirativos. O material foi transferido para 2 lâminas de microscopia estéreis e fixado a temperatura ambiente por 2 minutos sob agitação manual. As lâminas foram armazenadas enroladas em folha de papel higiênico até coloração. O material residual da coleta foi ressuspenso em 25 µl de EDTA e armazenado em tubo Eppendorf estéreis a -80°C.

3.4 Punção Aspirativa por Agulha Fina de Medula Óssea

A punção aspirativa por agulha fina de medula óssea por punção do osso externo na altura das 3ª e 4ª costelas foi realizada com descrito acima, com a introdução da agulha acoplada à seringa de 3ml na porção mais macia do osso externo, realizando-se 10 movimentos aspirativos para a sucção de conteúdo medular até o volume de aproximado de 100µl. Confeccionaram-se dois esfregaços em lâminas de microscopia estéreis que foram secos e fixados em temperatura

ambiente por 2 minutos sob agitação manual e posteriormente armazenados em folha de papel higiênico até coloração. O material residual da seringa foi ressuspenso em 25ul de EDTA e armazenado em tubo Eppendorf estéreis a -80°C.

3.5 *Imprint* de Pele de Orelha

Um pequeno pedaço de pele da orelha esquerda de aproximadamente 3mm² referente à região da dobra foi coletada após contenção física do animal, antissepsia regional com álcool iodado a 2%, bloqueio anestésico local com 300 µl de lidocaína a 2% com vasoconstrictor (Lidovet[®]), pinçamento da pele com pinça curva de 20cm, exereses da pele com bisturi cabo 24 e *imprint* do tecido em lâmina de microscopia estéril, seguida da secagem em temperatura ambiente por 2 minutos sob agitação manual. O *imprint* foi armazenado em folha de papel higiênico até coloração e a pele obtida foi dividida em 2 partes, cada uma delas armazenada em 1 tubo eppendorf estéril contendo ou álcool absoluto ou formalina a 10% como conservantes.

3.6 Coloração do Material Puncionado

Para coloração das lâminas contendo o material puncionado dos linfonodos e do *imprint* de tecido de orelha foi utilizado o sistema de coloração panótica (INSTANT PROV[®], New Prov), conforme recomendação do fabricante. A leitura foi realizada em objetiva de imersão em microscópio Nikon Eclipse E200[®] por pesquisa de toda a lâmina.

3.7 Coleta de Amostras de Sangue e Obtenção de Soro

Após a devida contenção física, foram coletados 10 ml de sangue por punção venosa asséptica das veias cefálica e ou jugular de cada cão, sendo 5 ml

armazenados em tubo sem anticoagulante e 5 ml armazenados em tubo contendo EDTA. O soro sanguíneo foi obtido após coagulação do sangue em Banho Maria por 37°C por 60 minutos, armazenados em alíquotas de 200 µl em tubos eppendorf esterilizados e mantidos em geladeira até seu processamento. As alíquotas não utilizadas foram armazenadas em freezer -80°C. O sangue de todos os animais foi coletado após prévio jejum de 12 a 14 horas.

3.8 Hemograma

As amostras de sangue colhidas em EDTA foram homogeneizadas e submetidas a contagem de células sanguíneas em analisador veterinário automático POCH-100iv DIFF® (Sysmex® Roche®) assim como a determinação do teor de hemoglobina. A contagem diferencial de leucócitos foi feita em 200 células a partir de esfregaço sanguíneo corado (INSTANT PROV®, New Prov). A leitura foi realizada em objetiva de imersão utilizando-se microscópio Nikon Eclipse E200®.

3.9 Determinação de Colesterol Total

A determinação do colesterol total foi realizada em amostras de soro utilizando-se o kit Colesterol Liquiform® (Labtest) através de sistema enzimático por reação por ponto final conforme recomendação do fabricante. A leitura foi feita por colorimetria no analisador Cobas C111®. O cálculo dos valores encontrados foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 200$$

3.10 Determinação do Colesterol HDL (High Density Lipoprotein)

Sérico

A determinação do colesterol HDL foi realizada utilizando-se o kit comercial Colesterol HDL® (Labtest) por precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e

muito baixa densidade (LDL e VLDL) em reação de ponto final em amostra de soro sendo que, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) foi determinado no sobrenadante, conforme recomendação do fabricante. A leitura foi feita por colorimetria no analisador Bioplus Bio200L[®]. O cálculo dos valores encontrados foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 40$$

3.11 Determinação dos Triglicérides Séricos

A determinação de triglicérides foi realizada utilizando-se o kit comercial Triglicérides Liquiform[®] (Labtest) por reação de ponto final em amostra de soro conforme recomendação do fabricante. A leitura foi feita por colorimetria no analisador automático Cobas C111[®]. O cálculo dos valores encontrados foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 200$$

3.12 Cálculos das Concentrações de LDL e VLDL

As concentrações de VLDL e LDL foram calculadas utilizando-se a equação de Friedewald:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

$$\text{Colesterol VLDL} = \text{Triglicerídeos} / 5$$

3.13 Bioquímica Sérica (PPT, Albumina, Globulinas, ALT, Creatinina e Uréia)

Parte da dosagem bioquímica sérica foi realizada utilizando-se ensaio colorimétrico e leitura em analisador automatizado Cobas C111[®] com os seguintes kits

reagentes, conforme recomendação do fabricante: proteínas plasmáticas totais (PPT) (TP2[®]), albumina (ALB2[®]); alanino aminotransferase (ALT) (ALTL[®]); creatinina (CREJ2[®]) e ureia (UREAL[®]). Os valores de globulinas foram obtidos aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Globulinas} = \text{Proteínas Séricas Totais} - \text{Albumina}$$

A relação entre Albumina e Globulina (A/G) foi obtida aplicando-se a fórmula:

$$\frac{\text{Albumina}}{\text{Globulina}} = \text{A/G}$$

3.14 Dosagem de Fosfatase Alcalina (FA) Sérica

A determinação da FA sérica foi realizada em amostras de soro utilizando-se o kit Fosfatase Alcalina (Labtest) por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final segundo orientação do fabricante. A leitura foi realizada determinando-se as absorbâncias do teste e do padrão no analisador Bioplus 200L[®] e o cálculo dos valores encontrados foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Fosfatase Alcalina (U/L)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 45$$

3.15 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando os programas GraphPad Prism[®] 6.02, Sigma Stat[®] 3.5 e Microsoft Excel[®]. Os níveis de significância dos testes foram fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha=0,05$).

Para a comparação entre proporções empregaram-se os testes exato de Fisher ou χ^2 , conforme indicado. A comparação entre três ou mais grupos de dados foi realizada empregando-se a análise de variância de Kruskal-Wallis. A verificação das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste de Dunn. A associação entre os parâmetros estudados e o escore de gravidade foi avaliada pela correlação de Spearman.

4 RESULTADOS

No presente estudo foram incluídos 162 cães sem histórico de outras patologias ou de vacinação contra leishmaniose, organizados em grupos de cães infectados segundo a raça e grupo controle não infectado. Os grupos de cães infectados foram organizados segundo as raças em Boxer (20 cães), Labrador (30 cães), Pit Bull (18 cães), sem raça definida (SRD) (41 cães) e outras raças com menor expressão numérica (Outras Raças) (43 cães). O grupo controle não infectado foi composto por 10 cães de diferentes raças (5 cães Labrador, 1 Pastor Alemão, 1 Pit Bull, 1 Pastor de Malinois, 1 Schnauzer miniatura e 1 Cocker Spaniel).

Para se avaliar a uniformidade da amostragem segundo a idade, os grupos de estudo foram estratificados em animais jovens (até 23 meses de idade) animais adultos (entre 24 e 84 meses de idade) e animais seniores (acima de 84 meses) conforme apresentado na Tabela 1. Observou-se que a maioria dos animais infectados tinha até 84 meses de idade, não tendo sido identificada diferença estatisticamente significativa na distribuição nas diferentes faixas etárias entre os grupos analisados ($P=0,177$ com controle; $P=0,123$ sem controle).

Tabela 1 - Distribuição do número de cães controle não infectados e de cães de diferentes raças portadores de leishmaniose visceral canina de acordo com a idade.

Raça	Total	≤23 meses	≥24≤84 meses	>84 meses
Controle	10	2 (20,0)*	7 (70,0)	1 (10,0)
Boxer	20	11 (55,0)	9 (45,0)	0 (0,0)
Labrador	30	15 (50,0)	15 (50,0)	0 (0,0)
Pit Bull	18	4 (22,2)	12 (66,7)	2 (11,1)
SRD	41	15 (36,6)	21 (51,2)	5 (12,2)
Outras Raças	43	12 (27,9)	28 (65,1)	3 (7,0)

* = porcentagem

$P=0,177$ – com controle, $P=0,123$ – sem controle (Teste χ^2)

A Tabela 2 apresenta a distribuição do número de cães nos diferentes grupos de estudo de acordo com o sexo. A maioria dos grupos formados por cães infectados apresentou maior quantidade de machos acometidos do que fêmeas, não se observando diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ($P=0,823$), o que demonstra uniformidade da amostragem também quanto ao sexo dos animais.

Tabela 2 - Distribuição do número de cães controle não infectados e de cães de diferentes raças portadores de leishmaniose visceral canina de acordo com o sexo.

Raça	Total	Macho	Fêmea
Controle	10	5 (50,0)*	5 (50,0)
Boxer	20	11 (55,0)	9 (45,0)
Labrador	30	16 (53,3)	14 (46,7)
Pit Bull	18	13 (72,2)	7 (38,8)
SRD	41	25 (61,0)	16 (39,0)
Outras Raças	43	21 (48,9)	22 (51,1)

* = porcentagem

$P=0,823$ – com controle (Teste χ^2)

Na avaliação das manifestações clínicas, dividimos os animais, dentro de cada grupo de cães infectados, em assintomáticos (sem nenhum sinal clínico), oligossintomáticos (de 1 a 3 sinais clínicos) e polissintomáticos (acima de 3 sinais clínicos). Os resultados apresentados na Tabela 3 também demonstraram uniformidade da amostragem, não tendo sido encontrada diferença estatisticamente significativa na distribuição entre os grupos analisados ($P=0,727$).

Tabela 3 - Distribuição do número de cães portadores de leishmaniose visceral canina de acordo com a raça e manifestações clínicas.

Raça	Total	Assintomáticos	Oligossintomáticos	Polissintomáticos
Boxer	20	1 (5,0)*	13 (65,0)	6 (30,0)
Labrador	30	3 (10,0)	17 (56,7)	10 (33,3)
Pit Bull	18	1 (5,6)	11 (61,1)	6 (33,3)
SRD	41	6 (14,6)	23 (51,2)	12 (29,2)
Outras Raças	43	9 (20,9)	20 (46,5)	14 (32,6)

* = porcentagem

$P=0,727$ (Teste χ^2)

Analisados em conjunto, os dados apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3 demonstram homogeneidade da distribuição quanto à idade, sexo e sinais clínicos dos cães das diferentes raças/grupos.

As raças/grupos formados pelo total de cães infectados (assintomáticos + oligossintomáticos + polissintomáticos) também foram avaliados segundo o escore de gravidade da infecção, o qual foi elaborado utilizando-se a somatória dos principais sinais clínicos ponderados como descrito em Material e Métodos. Não observamos diferença estatisticamente significativa do escore de gravidade entre os grupos (Fig. 1).

Figura 1. Escore de gravidade e mediana por raça/grupo de cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos / polissintomáticos).

LVC – leishmaniose visceral canina

Boxer (N=20)

Labrador (N=30)

Pit Bull (N=18)

SRD (N=41)

Outras (N=43)

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

A LVC é uma patologia caracterizada por acometimento visceral importante que pode ser verificado através de exames hematológicos e

bioquímicos. A Tabela 4 apresenta a frequência de cães portadores de LVC com resultados de exames laboratoriais alterados em comparação com os valores normais de referência. Devido ao número amostral pequeno de cães assintomáticos, as análises de alguns parâmetros nestes grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Analisados em conjunto, observamos que os animais assintomáticos, independentemente de raça/grupo, apresentaram poucas alterações nos parâmetros laboratoriais avaliados, aproximando-se mais dos valores descritos para o grupo controle não infectado. Considerando todos os cães assintomáticos, as principais alterações observadas foram em plaquetas, PPT, globulinas e colesterol LDL, mas sem ser observada diferença estatisticamente significativa.

O total dos cães oligossintomáticos/polissintomáticos apresentou maior número de alterações nos parâmetros pesquisados, principalmente nos valores de globulinas, albumina, volume globular, hemoglobina, e hemácias, em que observamos diferença estatisticamente significativa. A partir dessa análise inicial, procedemos análises detalhadas dos diferentes parâmetros.

Tabela 4 – Frequência de cães portadores de LVC com resultados de exames laboratoriais alterados em comparação com os valores normais

N	BOXER		LABRADOR		PIT BULL		SRD		OUTRAS RAÇAS		TODOS	
	Assintomático	Oligo/Poli	Assintomático	Oligo/Poli	Assintomático	Oligo/Poli	Assintomático	Oligo/Poli	Assintomático	Oligo/Poli	Assintomático	Oligo/Poli
	1	19	3	27	1	17	6	35	9	34	20	132
	Alterado (%)	Alterado (%)	Alterado (%)	Alterado (%)	Alterado (%)	Alterado (%)	Alterado (%)	Alterado (%)	Alterado (%)	Alterado (%)	Alterado (%)	Alterado (%)
Albumina	0 (0,0)	10 (52,6)	0 (0,0)	14 (51,9)	0 (0,0)	11 (64,70)	0 (0,0)	*19 (54,3)	1 (11,1)	*21 (61,8)	1 (5,0)	*75 (56,8)
Globulina	0 (0,0)	11 (57,9)	0 (0,0)	15 (55,6)	1 (100,0)	15 (88,2)	0 (0,0)	*21 (60,0)	5 (55,6)	19 (55,9)	6 (30,0)	*81 (61,6)
PPT	0 (0,0)	11 (57,9)	1 (33,3)	14 (51,9)	1 (100,0)	17 (100,0)	1 (16,7)	22 (62,9)	5 (55,6)	17 (50,0)	8 (40,0)	81 (61,4)
Creatinina	0 (0,0)	2 (10,5)	0 (0,0)	3 (11,1)	0 (0,0)	4 (23,5)	0 (0,0)	4 (11,4)	0 (0,0)	3 (8,8)	0 (0,0)	16 (12,1)
Ureia	0 (0,0)	2 (10,5)	0 (0,0)	2 (7,4)	0 (0,0)	6 (35,3)	0 (0,0)	7 (20,0)	0 (0,0)	4 (11,8)	0 (0,0)	21 (15,9)
ALT	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	2 (7,4)	0 (0,0)	1 (5,9)	0 (0,0)	3 (8,6)	0 (0,0)	1 (2,9)	0 (0,0)	8 (6,0)
FA	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	1 (3,9)	0 (0,0)	4 (11,4)	0 (0,0)	3 (8,8)	0 (0,0)	10 (7,5)
Hemácias	0 (0,0)	10 (52,6)	0 (0,0)	13 (48,1)	0 (0,0)	12 (70,6)	0 (0,0)	13 (37,1)	1 (11,1)	18 (52,9)	1 (5,0)	*66 (50,0)
Plaquetas	1 (100,0)	10 (52,6)	1 (33,3)	12 (44,4)	1 (100,0)	13 (76,5)	4 (66,7)	22 (62,9)	5 (55,6)	15 (44,1)	12 (60,0)	72 (54,6)
Leucócitos	0 (0,0)	3 (15,8)	0 (0,0)	8 (29,6)	0 (0,0)	3 (17,6)	0 (0,0)	8 (22,9)	1 (11,1)	6 (17,6)	1 (5,0)	28 (21,2)
VG	0 (0,0)	8 (42,1)	0 (0,0)	15 (55,6)	0 (0,0)	13 (76,5)	0 (0,0)	16 (45,7)	1 (11,1)	17 (50,0)	1 (5,0)	*69 (52,3)
Hemoglobina	0 (0,0)	8 (42,1)	0 (0,0)	14 (51,9)	0 (0,0)	13 (76,5)	0 (0,0)	15 (42,9)	1 (11,1)	17 (50,0)	1 (5,0)	*67 (50,8)
CHCM	0 (0,0)	5 (26,3)	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	5 (29,4)	0 (0,0)	5 (14,3)	0 (0,0)	6 (17,60)	0 (0,0)	22 (16,7)
HDL	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	3 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (8,6)	0 (0,0)	2 (5,9)	0 (0,0)	9 (6,8)
LDL	0 (0,0)	13 (68,4)	2 (66,7)	13 (48,1)	0 (0,0)	10 (58,8)	1 (16,7)	11 (31,4)	2 (22,2)	18 (52,9)	5 (25,0)	65 (49,2)
VLDL	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	4 (14,8)	0 (0,0)	2 (11,8)	1 (16,7)	4 (11,4)	0 (0,0)	6 (17,6)	2 (10,0)	16 (12,1)
Triglicérides	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	2 (7,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,9)	1 (5,0)	3 (2,2)

LVC – leishmaniose visceral canina; SRD – sem raça definida; Oligo/Poli – oligossintomático/polissintomático

ALT – alanino aminotransferase; FA – fosfatase alcalina; HDL – high density lipoprotein; LDL – low density lipoprotein; VLDL – very low density lipoprotein;

VG – volume globular; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; PPT Proteínas Plasmáticas Totais

* - P < 0,05 em relação ao assintomático (Teste exato de Fisher)

Para analisar as possíveis alterações laboratoriais decorrentes da infecção de cães por *L. chagasi*, foram realizados hemograma, leucograma, dosagens de albumina, globulinas, proteínas plasmáticas totais (PPT), creatinina, ureia, alanino aminotransferase (ALT), colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoproteins*, HDL), lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoproteins*, LDL), lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoproteins*, VLDL) e triglicérides. Inicialmente as análises foram realizadas considerando-se o grupo total de cães infectados, divididos por raça, e controles não infectados residentes em área endêmica. Na sequência, analisamos os grupos de animais infectados, separados por raça, assintomáticos em relação ao controle. Analisamos depois os grupos oligossintomáticos e polissintomáticos (oligo/poli) conjuntamente em relação ao grupo controle não infectado.

Ao analisarmos as concentrações de albumina, globulinas e PPT os animais infectados, independentemente da raça, em geral, apresentaram alterações quando comparadas ao grupo controle não infectado. (Fig. 2A, 2D e 2G). Quando separamos os assintomáticos e os sintomáticos, os animais assintomáticos não apresentaram diferenças significantes desses parâmetros frente ao grupo controle não infectado (Fig. 2B, 2E e 2H). Nos grupos infectados oligossintomáticos/polissintomáticos (Fig. 2C, 2F e 2I), foram observadas alterações significantes em relação ao controle: diminuição nos valores de albumina (Fig. 2C) e aumento de globulinas (Fig. 2F).

Para prosseguir na análise das concentrações de albumina, globulinas e PPT dos animais oligossintomáticos/polissintomáticos, elegemos cada raça e comparamos com as demais, por exemplo, comparando o Boxer com o Não Boxer. Nessas análises, não observamos diferenças significantes entre o grupo de uma raça em relação às outras (Fig. 3). Esses grupos apresentaram diferenças

estatisticamente significantes em relação ao grupo controle conforme esperado pelas análises anteriores.

Figura 2. Concentração de albumina, globulinas e PPT (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.

A, D e G – controle e total de infectados (N). Controle (9), Boxer (20), Labrador (30), Pit Bull (18), SRD (41) e outras (43)

B, E e H – controle e assintomáticos (N). Controle (9), Boxer (1), Labrador (3), Pit Bull (1), SRD (6) e outras (9)

C, F e I – controle e oligossintomáticos/polissintomáticos (N). Controle (9), Boxer (19), Labrador (27), Pit Bull (17), SRD (35) e outras (34)

§ - $P < 0,05$ em relação ao controle (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

PPT – proteínas plasmáticas totais

N – número de animais por grupo

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

▨ - animais não infectados

□ - animais infectados

Figura 3. Concentração de albumina, globulinas e PPT (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.

A, B e C – controle, Boxer e não Boxer (N). Controle (9), Boxer (19), não Boxer (113)

D, E e F – controle, Labrador e não Labrador (N). Controle (9), Labrador (27) e não Labrador (105)

G, H e I – controle, Pit Bull e não Pit Bull (N). Controle (9), Pit Bull (17) e não Pit Bull (115)

J, K e L – controle, SRD e não SRD (N). Controle (9), SRD (35), não SRD (97)

M, N e O – controle, outras e não outras (N). Controle (9), outras (34), não outras (98)

§ - $P < 0,05$ em relação ao controle (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

PPT – proteínas plasmáticas totais

N – número de animais por grupo

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

- animais não infectados

- animais infectados

Figura 3

Ao analisarmos as concentrações de creatinina e ureia séricas, os animais infectados, independentemente da raça ou da quantidade de sinais clínicos, não observamos alterações quando comparadas ao grupo controle não infectado (Fig. 4).

Figura 4. Concentração de creatinina e ureia (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.

A e D – controle e total de infectados (N). Controle (10), Boxer (20), Labrador (30), Pit Bull (18), SRD (41) e outras (43)

B e E – controle e assintomáticos (N). Controle (10), Boxer (1), Labrador (3), Pit Bull (1), SRD (6) e outras (9)

C e F – controle e oligossintomáticos/polissintomáticos (N). Controle (10), Boxer (19), Labrador (27), Pit Bull (17), SRD (35) e outras (34)

N – número de animais por grupo

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

■ - animais não infectados

□ - animais infectados

Prosseguindo na análise das concentrações de creatinina e ureia séricas dos animais oligossintomáticos/polissintomáticos, em que cada raça foi comparada com as demais (Fig. 5), não observamos diferenças significantes entre elas e também em relação ao grupo controle, conforme esperado pelas análises anteriores.

Figura 5. Concentração de creatinina e ureia (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.

A e B – controle, Boxer e não Boxer (N). Controle (10), Boxer (19), não Boxer (113)

C e D – controle, Labrador e não Labrador (N). Controle (10), Labrador (27) e não Labrador (105)

E e F – controle, Pit Bull e não Pit Bull (N). Controle (10), Pit Bull (17) e não Pit Bull (115)

G e H - controle, SRD e não SRD (N). Controle (10), SRD (35), não SRD (97)

I e J - controle, outras e não outras (N). Controle (10), outras (34), não outras (98)

N – número de animais por grupo

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

- animais não infectados

- animais infectados

Figura 5

Nas análises das concentrações de ALT e Fosfatase Alcalina nos animais infectados, independentemente da raça ou da quantidade de sinais clínicos, não observamos alterações quando comparados ao grupo controle não infectado (Fig. 6). No entanto, nas análises dos animais oligossintomáticos/polissintomáticos em que cada raça foi comparada com as demais (Fig. 7), observamos aumento significativo na concentração de Fosfatase Alcalina nas raças Boxer e Labrador em relação ao grupo controle.

Figura 6. Concentração de ALT e fosfatase alcalina (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.

A e D – controle e total de infectados (N). Controle (8), Boxer (20), Labrador (30), Pit Bull (18), SRD (41) e outras (43)

B e E – controle e assintomáticos (N). Controle (8), Boxer (1), Labrador (3), Pit Bull (1), SRD (6) e outras (9)

C e F – controle e oligossintomáticos/polissintomáticos (N). Controle (8), Boxer (19), Labrador (27), Pit Bull (17), SRD (35) e outras (34)

N – número de animais por grupo

ALT – alanino aminotransferase

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

■ - animais não infectados

□ - animais infectados

Figura 7. Concentração de ALT e fosfatase alcalina (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.

A e B – controle, Boxer e não Boxer (N). Controle (8), Boxer (19), não Boxer (113)

C e D – controle, Labrador e não Labrador (N). Controle (8), Labrador (27) e não Labrador (105)

E e F – controle, Pit Bull e não Pit Bull (N). Controle (8), Pit Bull (17) e não Pit Bull (115)

G e H - controle, SRD e não SRD (N). Controle (8), SRD (35), não SRD (97)

I e J - controle, outras e não outras (N). Controle (8), outras (34), não outras (98)

§ - $P < 0,05$ em relação ao controle (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

N – número de animais por grupo

ALT – alanino aminotransferase

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

- animais não infectados

- animais infectados

Figura 7

As análises da concentração de hemácias/mm³, os animais infectados das raças Labrador e Pit Bull apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo controle não infectado. (Fig. 8A). Separados os assintomáticos e os sintomáticos, os animais assintomáticos não apresentaram diferenças significantes desses parâmetros frente ao grupo controle não infectado (Fig. 8B). Nos grupos infectados oligossintomáticos/polissintomáticos (Fig. 14C), foram observadas concentrações significativamente menores nos grupos Labrador, Pit Bull e Outras Raças em relação ao controle (Fig.8C).

Ao analisarmos a concentração de leucócitos/mm³, os animais infectados, independentemente da raça, assim como os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos não apresentaram alterações quando comparados ao grupo controle não infectado. (Fig. 8D, E e F).

A concentração de plaquetas/mm³ dos animais infectados dos grupos Pit Bull e SRD apresentava significativamente mais baixa quando comparada ao grupo controle não infectado. (Fig. 8G). Quando separamos os assintomáticos e os sintomáticos, os animais assintomáticos não apresentaram diferenças significantes desses parâmetros em relação ao controle (Fig. 8H). Nos grupos oligossintomáticos/polissintomáticos foram observadas alterações significantes somente no grupo SRD em relação ao controle, com diminuição na concentração de plaquetas/mm³ (Fig. 8I).

Figura 8. Concentração de hemácias, leucócitos e plaquetas (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em sangue de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.

A, D e G – controle e total de infectados (N). Controle **A** e **D** (10), Controle **G** (7), Boxer (20), Labrador (30), Pit Bull (18), SRD (41) e outras (43)

B, E e H – controle e assintomáticos (N). Controle **B** e **E** (10), Controle **H** (7), Boxer (1), Labrador (3), Pit Bull (1), SRD (6) e outras (9)

C, F e I – controle e oligossintomáticos/polissintomáticos (N). Controle **C** e **F** (10), Controle **I** (7), Boxer (19), Labrador (27), Pit Bull (17), SRD (35) e outras (34)

§ - $P < 0,05$ em relação ao controle (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

N – número de animais por grupo

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

■ - animais não infectados

□ - animais infectados

Prosseguindo na análise da concentração de hemácias/mm³ dos animais oligossintomáticos/polissintomáticos comparando cada raça com as demais, observamos diferenças significantes apenas entre Pit Bull e Não Pit Bull, com o Pit Bull apresentando níveis mais baixos (Fig. 9G). Todos os grupos apresentaram valores significantemente menores em relação ao grupo controle, diferentemente do observado nas análises anteriores em apenas os animais oligossintomáticos/polissintomáticos dos grupos Labrador, Pit Bull e Outras Raças em relação ao grupo controle apresentaram diferenças significantes.

Analisando a concentração de leucócitos/mm³ dos animais oligossintomáticos /polissintomáticos comparando cada raça com as demais não observamos diferenças significantes entre eles ou em relação ao grupo controle (Fig. 9B, 9E, 9H, 9K e 9N), conforme esperado pelas análises anteriores.

Na análise da concentração de plaquetas/mm³ dos animais oligossintomáticos /polissintomáticos, comparando cada raça com as demais, não observamos diferenças significantes entre os grupos. Comparando cada raça frente ao grupo controle não infectado, as raças Boxer, Pit Bull e o grupo SRD apresentaram concentrações de plaquetas/mm³ significantemente menores. (Fig. 9C, 9F, 9I, 9L e 9O)

Figura 9. Concentração de hemácias, leucócitos e plaquetas (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em sangue de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.

A, B e C – controle, Boxer e não Boxer (N). Controle **A** e **B** (10), Controle **C** (7), Boxer (19), não Boxer (113)

D, E e F – controle, Labrador e não Labrador (N). Controle **D** e **E** (10), Controle **F** (7), Labrador (27) e não Labrador (105)

G, H e I – controle, Pit Bull e não Pit Bull (N). Controle **G** e **H** (10), Controle **I** (7), Pit Bull (17) e não Pit Bull (115).

J, K e L - controle, SRD e não SRD (N). Controle **J** e **K** (10), Controle **L** (7), SRD (35), não SRD (97)

M, N e O - controle, outras e não outras (N). Controle **M** e **N** (10), Controle **O** (7), outras (34), não outras (98)

§ - $P < 0,05$ em relação ao controle (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

- $P < 0,05$ em relação ao não Pit Bull (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

N – número de animais por grupo

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

- animais não infectados

- animais infectados

Figura 9

Ao analisarmos a concentração de hemoglobina, os animais infectados dos grupos Labrador, Pit Bull, SRD e Outras Raças apresentaram diminuição significativa no seu nível quando comparados ao grupo controle não infectado. (Fig.

10A). Quando separamos os assintomáticos e os sintomáticos, os animais assintomáticos não apresentaram diferenças desses parâmetros frente ao grupo controle não infectado em relação ao controle (Fig. 10B). Os cães infectados oligossintomáticos/ polissintomáticos dos grupos Labrador, Pit Bull, SRD e Outras Raças apresentaram diminuição significativa nos valores de hemoglobina quando comparados ao grupo controle não infectado (Fig. 10C).

Nas análises do volume globular (VG) do total dos animais infectados, as raças Labrador e Pit Bull apresentaram alterações significantes quando comparados ao grupo controle não infectado. (Fig. 10D). Separados os assintomáticos e os sintomáticos, os animais assintomáticos não apresentaram diferenças desses parâmetros frente ao grupo controle não infectado em relação ao controle (Fig. 10E). Os cães infectados oligossintomáticos/polissintomáticos dos grupos Labrador, Pit Bull, SRD e Outras Raças apresentaram alterações significantes quando comparados ao grupo controle não infectado, apresentando diminuição no volume globular (Fig. 10F).

As concentrações de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos animais infectados, independentemente da raça, não apresentaram alterações quando comparadas ao grupo controle não infectado (Fig. 10G, 10H e 10I).

Figura 10. Concentração de hemoglobina, do VG e CHCM (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.

A, D e G – controle e total de infectados (N). Controle (10), Boxer (20), Labrador (30), Pit Bull (18), SRD (41) e outras (43)

B, E e H – controle e assintomáticos (N). Controle (10), Boxer (1), Labrador (3), Pit Bull (1), SRD (6) e outras (9)

C, F e I – controle e oligossintomáticos/polissintomáticos (N). Controle (10), Boxer (19), Labrador (27), Pit Bull (17), SRD (35) e outras (34)

§ - $P < 0,05$ em relação ao controle (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

N – número de animais por grupo

VG – volume globular

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

■ - animais não infectados

□ - animais infectados

Nas análises das concentrações de hemoglobina, comparando cada raça com as demais (Fig. 11A, 11D, 11G, 11J e 11M), observamos diferenças significantes somente entre Pit Bull e Não Pit Bull, com o Pit Bull apresentando concentrações menores (Fig. 11G). Todos os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, inclusive no grupo da raça Boxer em que não haviam sido observadas diferenças nas análises anteriores (Fig. 11A). Em relação às análises do VG, comparando cada raça com as demais (Fig. 11B, 11E, 11H, 11K e 11N), observamos diferenças significantes novamente entre Pit Bull e Não Pit Bull, com o Pit Bull apresentando valores menores (Fig. 11H). Todos os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, inclusive no grupo da raça Boxer em que não haviam sido observadas diferenças nas análises anteriores (Fig. 11B).

Nas análises da CHGM, comparando cada raça com as demais (Fig. 11C, 11F, 11I, 11L e 11O), observamos diferenças significantes somente entre Labrador e Não Labrador, com o Labrador apresentando nível similar ao controle e mais elevado em relação ao Não Labrador (Fig. 11F). Os grupos que apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo controle foram o Não Boxer (Fig. 11C), Não Labrador (Fig. 11F), Pit Bull (Fig. 11I), SRD e Não SRD (Fig. 11L), Outras Raças e Não Outras Raças (Fig. 11O)

Figura 11. Concentração de hemoglobina, do VG e CHCM (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.

A, B e C – controle, Boxer e não Boxer (N). Controle (10), Boxer (19), não Boxer (113)

D, E e F – controle, Labrador e não Labrador (N). Controle (10), Labrador (27) e não Labrador (105)

G, H e I – controle, Pit Bull e não Pit Bull (N). Controle (10), Pit Bull (17) e não Pit Bull (115)

J, K e L - controle, SRD e não SRD (N). Controle (10), SRD (35), não SRD (97)

M, N e O - controle, outras e não outras (N). Controle (10), outras (34), não outras (98)

§ - $P < 0,05$ em relação ao controle (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

- $P < 0,05$ em relação ao não Pit Bull (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

& - $P < 0,05$ em relação ao não Labrador (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

VG – volume globular

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

- animais não infectados

- animais infectados

Figura 11

Ao analisarmos as concentrações de HDL, considerando todos os animais, o Labrador e SRD apresentaram níveis significativamente mais baixos em relação ao grupo controle não infectado. (Fig. 12A). Separados os assintomáticos e os

sintomáticos, os animais assintomáticos não apresentaram diferenças significantes desses parâmetros em relação ao controle (Fig. 12B). Nos grupos infectados oligossintomáticos/polissintomáticos (Fig. 12C), foram observados níveis significativamente mais baixos em relação ao controle novamente nos grupos Labrador e SRD. Nas análises das concentrações de LDL, não foram observadas diferenças em nenhum os grupos (Fig. 12D, 12E e 12F).

Figura 12. Concentração de HDL e LDL (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.

A e D – controle e total de infectados (N). Controle (10), Boxer (20), Labrador (30), Pit Bull (18), SRD (41) e outras (43)

B e E – controle e assintomáticos (N). Controle (10), Boxer (1), Labrador (3), Pit Bull (1), SRD (6) e outras (9)

C e F – controle e oligossintomáticos/polissintomáticos (N). Controle (10), Boxer (19), Labrador (27), Pit Bull (17), SRD (35) e outras (34)

§ - $P < 0,05$ em relação ao controle (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

N – número de animais por grupo

HDL – high density lipoprotein

LDL – low density lipoprotein

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

▨ - animais não infectados

□ - animais infectados

Prosseguindo nas análises das concentrações de HDL dos animais oligossintomáticos/polissintomáticos, comparando cada raça com as demais, observamos diferenças significantes somente entre Labrador e Não Labrador, com o Labrador apresentando níveis significantemente mais baixos que Não Labrador (Fig. 13C). Os grupos que apresentaram valores significantemente menores em relação ao grupo controle foram o Não Boxer (Fig. 13A), Labrador e Não Labrador (Fig. 13C), Não Pit Bull (Fig. 13E), SRD e Não SRD (Fig. 13G) e Não Outras Raças (Fig. 13I)

Não observamos diferenças significantes nas análises das concentrações de LDL de cães oligossintomáticos/polissintomáticos comparando cada raça com as demais conforme esperado pelas análises anteriores (Fig. 13B, 13D, 13F, 13H e 13J).

Figura 13. Concentração de HDL e LDL (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.

A e B – controle, Boxer e não Boxer (N). Controle (10), Boxer (19), não Boxer (113)

C e D – controle, Labrador e não Labrador (N). Controle (10), Labrador (27) e não Labrador (105)

E e F – controle, Pit Bull e não Pit Bull (N). Controle (10), Pit Bull (17) e não Pit Bull (115).

G e H - controle, SRD e não SRD (N). Controle (10), SRD (35), não SRD (97)

I e J - controle, outras e não outras (N). Controle (10), outras (34), não outras (98)

§ - $P < 0,05$ em relação ao controle (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

- $P < 0,05$ em relação ao não Labrador (Testes de Kruskal Wallis e Dunn)

N – número de animais por grupo

HDL – high density lipoprotein

LDL – low density lipoprotein

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

- animais não infectados

- animais infectados

Figura 13

Figura 14. Concentração de VLDL e triglicérides (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC, analisando o total de animais, os assintomáticos e os oligossintomáticos/polissintomáticos, segundo raça/grupo.

A e D – controle e total de infectados (N). Controle (10), Boxer (20), Labrador (30), Pit Bull (18), SRD (41) e outras (43)

B e E – controle e assintomáticos (N). Controle (10), Boxer (1), Labrador (3), Pit Bull (1), SRD (6) e outras (9)

C e F – controle e oligossintomáticos/polissintomáticos (N). Controle (10), Boxer (19), Labrador (27), Pit Bull (17), SRD (35) e outras (34)

N – número de animais por grupo

VLDL – very low density lipoprotein

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

▨ - animais não infectados

□ - animais infectados

Ao analisarmos as concentrações de VLDL e Triglicérides, os animais infectados, independentemente da raça ou da quantidade de sinais clínicos, não apresentaram alterações em relação ao grupo controle não infectado (Fig. 14). Na análise dos animais oligossintomáticos/polissintomáticos, em que cada raça foi comparada com as demais (Fig. 15), também não foram observadas diferenças entre elas ou em relação ao grupo controle, conforme esperado pelas análises anteriores.

Figura 15. Concentração de VLDL e triglicérides (mediana, percentis 5, 25, 75 e 95) em soros de cães controle não infectados e portadores de LVC oligossintomáticos/polissintomáticos, analisando cada raça/grupo em relação aos demais.

A e B – controle, Boxer e não Boxer (N). Controle (10), Boxer (19), não Boxer (113)

C e D – controle, Labrador e não Labrador (N). Controle (10), Labrador (27) e não Labrador (105)

E e F – controle, Pit Bull e não Pit Bull (N). Controle (10), Pit Bull (17) e não Pit Bull (115).

G e H - controle, SRD e não SRD (N). Controle (10), SRD (35), não SRD (97)

I e J - controle, outras e não outras (N). Controle (10), outras (34), não outras (98)

N – número de animais por grupo

VLDL – very low density lipoprotein

SRD – sem raça definida

Outras – outras raças

LVC - leishmaniose visceral canina

- animais não infectados

- animais infectados

Figura 15

Até este ponto foram apresentados os resultados das análises dos parâmetros hematológicos e bioquímicos destacando as alterações nas diferentes raças. Na sequência, realizamos as análises das correlações entre os parâmetros laboratoriais e os escores de gravidade das manifestações clínicas do total de animais (assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos) das diferentes raças/grupos. Os resultados a seguir referem-se às figuras 16 a 22.

Figura 16. Correlação entre o escore de gravidade e as concentrações de albumina, globulina e PPT em soros de cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).

A, B e C – Labrador (N=30)

D e E – SRD (N=41)

F, G e H – Outras raças (N=43)

PPT – proteínas plasmáticas totais

LVC – leishmaniose visceral canina

SRD – sem raça definida

$P < 0,05$ (Teste de Correlação de Spearman)

A concentração de albumina sérica apresentou correlação negativa com o escore de gravidade na raça Labrador (Fig. 16A) e nos grupos SRD e Outras Raças

(Fig. 16D e 16F); a concentração de globulinas apresentou correlação positiva na raça Labrador (Fig. 16 B), e nos grupos SRD e Outras Raças (Fig. 16E e 16G); a concentração de PPT, correlação positiva, na raça Labrador e grupo Outras Raças (Fig. 16C e 16H). A concentração de creatinina apresentou correlação negativa com o escore de gravidade no grupo Outras Raças (Fig. 17).

Figura 17. Correlação entre o escore de gravidade e a concentração de creatinina em soros de cães portadores de LVC do grupo Outras Raças (N=43), analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos). $P < 0,05$ (Teste de Correlação de Spearman)

Figura 18. Correlação entre o escore de gravidade e as concentrações de ALT e FA em soros de cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).

A – Labrador (N=30)

B – SRD (N=41)

ALT – alanino transferase

FA – fosfatase alcalina

LVC – leishmaniose visceral canina

SRD – sem raça definida

$P < 0,05$ (Teste de Correlação de Spearman)

A concentração de ALT apresentou correlação negativa na raça Labrador

(Fig. 18A); a concentração de FA, correlação positiva, no grupo SRD (Fig. 18B).

Figura 19. Correlação entre o escore de gravidade e a concentração de hemácias e leucócitos em sangue de cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).

A e B – Boxer (N=20)

C – Labrador (N=30)

D – Outras raças (N= 43)

LVC – leishmaniose visceral canina

P < 0,05 (Teste de Correlação de Spearman)

Em relação aos parâmetros hematológicos, a concentração de hemácias apresentou correlação negativa nas raças Boxer e Labrador (Fig. 19A e 19C) e no grupo Outras Raças (Fig. 19D); a concentração de leucócitos, correlação negativa na raça Boxer (Fig. 19B). A concentração de hemoglobina e o VG apresentaram correlação negativa nas raças Boxer, Labrador, Pit Bull (Fig. 20A, 20B, 20C, 20D, 20E e 20F) e nos grupos SRD e outras raças (Fig. 20G, 20H, 20J e 20K); a concentração CHCM, correlação negativa, no grupo SRD (Fig. 20I).

Figura 20. Correlação entre o escore de gravidade e as concentrações de hemoglobina e CHCM e do VG em cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).

A e B – Boxer (N=20)

C e D – Labrador (N=30)

E e F – Pit Bull (N=18)

G, H e I – SRD (N=41)

J e K – Outras raças (N=43)

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

VG – volume globular

LVC – leishmaniose visceral canina

SRD – sem raça definida

$P < 0,05$ (Teste de Correlação de Spearman)

Figura 20

Figura 21. Correlação entre o escore de gravidade e as concentrações de LDL e HDL em soros de cães portadores de LVC, analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos/polissintomáticos).

A – SRD (N=41)

B – Outras raças (N=43)

HDL – high density lipoprotein

LDL – low density lipoprotein

LVC – leishmaniose visceral canina

SRD – sem raça definida

P < 0,05 (Teste de Correlação de Spearman)

Em relação às frações lipídicas, a concentração de LDL apresentou correlação positiva com o escore de gravidade no grupo SRD (Fig. 21A); a concentração de HDL, correlação negativa no grupo Outras Raças (Fig. 21B). As concentrações de VLDL e triglicérides apresentaram correlação positiva no grupo Outras Raças (Fig. 22A e 22B).

Figura 22. Correlação entre o escore de gravidade e as concentrações de VLDL e triglicérides em soros de cães do grupo Outras Raças portadores de LVC (N=43) analisando o total de animais (assintomáticos e oligossintomáticos / polissintomáticos).

VLDL – very low density lipoprotein

LVC – leishmaniose visceral canina

P < 0,05 (Teste de Correlação de Spearman)

5 DISCUSSÃO

Inicialmente, é importante destacar que os animais infectados utilizados em nosso trabalho foram encaminhados para nós para a realização de exames sorológicos de contraprova, haja vista todos terem sido previamente diagnosticados por sorologia RIFI e ELISA para Leishmânia em exames preventivos realizados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS, que realiza a eutanásia de cães para controle da LVC, como preconizado pelo Ministério da Saúde. Já a maioria dos trabalhos cujos dados utilizamos nesta discussão foram realizados na Europa, em cães doentes de proprietários, encaminhados aos serviços médico veterinários para tratamento. Isso faz pressupor que o quadro geral dos cães europeus pudesse ser mais grave em virtude de manifestarem um quadro clínico mais evoluído quando comparado aos animais do nosso experimento, encaminhados sem queixa clínica por parte dos proprietários. Esta diferença de origem recomenda certa reserva na análise de alguns parâmetros.

Na leishmaniose visceral canina (LVC), há algumas referências sobre a suscetibilidade à infecção ou gravidade da doença, dependendo da raça (Abranches et al. 1991; Pinelli et al. 1994; Solano-Gallego, 2000). Mais recentemente tem crescido o número de investigações científicas que vem abordando a relevância dos lípidos no metabolismo das leishmânias (Zhang et al. 2010a, 2010b; Andrade-Neto et al, 2011; De Cicco et al. 2012; Chattopadhyay & Jafurulla, 2012; Ramakrishnan et al. 2013; Descoteaux et al. 2013) e na suscetibilidade à infecção por *Leishmania* tanto no homem quanto no cão (Nieto et al. 1992; Soares et al. 2010; Lal et al. 2010). A importância das alterações lipídicas

na clínica da leishmaniose visceral canina no sentido de verificar estas alterações nos cães portadores LVC nas diversas raças não está totalmente esclarecida.

Como forma de abordagem desta questão, analisamos alterações hematológicas e bioquímicas frente à manifestação da doença em diferentes raças ou grupos raciais. Para tanto, incluímos 162 cães de área endêmica, sem histórico de outras patologias ou de vacinação contra leishmaniose, organizados em grupos de cães naturalmente infectados segundo a raça e grupo controle não infectado. Todos os cães possuíam proprietários e alimentavam-se de ração industrializada, sem aparente comprometimento do estado nutricional prévio à doença.

As análises laboratoriais abrangeram as principais frações lipídicas séricas como colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicerídeos e também albumina, globulina, PPT, creatinina, ureia, ALT, fosfatase alcalina, hemácias, leucócitos, CHCM, hemoglobina e volume globular.

O grupo experimental demonstrou homogeneidade da distribuição quanto à idade, sexo e sinais clínicos dos cães das diferentes raças/grupos. A frequência de animais assintomáticos na amostra foi pequena, refletindo o que se observa na rotina clínica, em que os animais infectados com leishmânia geralmente apresentam pelo menos um sinal clínico (Kontos & Koutinas, 1993)

Os animais assintomáticos apresentaram parâmetros hematológicos e bioquímicos semelhantes aos cães controle não infectados. Os grupos oligossintomáticos e polissintomáticos apresentaram alterações semelhantes entre si e por isso foram estudados como um grupo único (oligossintomático/polissintomático).

Apesar das raças e grupos raciais não terem apresentado diferenças entre si em relação ao escore de gravidade da doença, os parâmetros hematológicos e bioquímicos apresentaram variações entre os grupos.

Dentre os 17 parâmetros analisados segundo a gravidade, o grupo Outras Raças apresentou a maior quantidade de alterações com 10 dos parâmetros fora da normalidade, a raça Labrador e o grupo SRD apresentaram alterações em 7 , a raça Boxer em 4 e a raça Pit Bull em 2 parâmetros.

Dentre os componentes bioquímicos, a concentração de albumina sérica se apresentou diminuída e a concentração de globulinas estava aumentada nos cães sintomáticos, com destaque para a raça Labrador e os grupos SRD e Outras Raças. Estes dados estão em concordância com a literatura que relata hipoalbuminemia e hiperglobulinemia como alterações presentes nos casos de leishmaniose visceral tanto humana como canina (Tryphonas et al. 1977; Barral et al. 1986; Slappendel, 1988; Ciaramella et al. 1997; Koutinas et al. 1999; Juttner et al. 2001; Solano-Gallego et al. 2011). A diminuição na concentração de albumina sérica pode ser reflexo tanto da menor síntese destas proteínas pelo fígado ocasionada por lesões hepáticas decorrentes do parasitismo (Giunchetti et al. 2008) como da lesão glomerular envolvendo a participação de imunoglobulinas mas principalmente linfócitos T CD4⁺ e comprometimento do processo de apoptose (Costa et al. 2000) o que levaria a uma maior excreção destas proteínas (Slappendel, 1988; Ferrer, 1999; Alves et al. 2013) ou ainda devida a subnutrição (Noli, 1999). Já a hipergamaglobulinemia identificada nestes casos corresponde a uma maior síntese de imunoglobulinas por ativação policlonal de linfócitos B (Galvão-Castro et al. 1984) que tem implicação na suscetibilidade à doença (Ferrer 1992; Pinelli et al. 1994; Koutinas, 1999; Noli, 1999)

As análises dos parâmetros de creatinina e ureia, utilizados para avaliar a função renal, não apresentaram alterações significantes em nenhum dos grupos estudados. Estes dados corroboram a conclusão de Solano-Gallego et al (2011) de que apesar da alta prevalência de doença renal em cães, os achados laboratoriais são relativamente raros.

Em relação aos parâmetros indicadores de função hepática, não se observaram alterações na análise da ALT em nenhum dos grupos, porém os níveis de Fosfatase Alcalina estavam significativamente aumentados nas raças Boxer e Labrador quando comparadas ao grupo controle não infectado. Na análise pelo escore de gravidade, o grupo SRD apresentou correlação positiva com as concentrações de Fosfatase Alcalina.

No fígado, a Fosfatase Alcalina corresponde a um conjunto de enzimas intracelulares que aparecem nas bordas sinusoidais e canaliculares, (Lopes et al. 2006). Hill & Sammons (1967) relatam que os aumentos séricos da Fosfatase Alcalina resultam do aumento da liberação desta enzima a parti da superfície dos sinusóides, e da regurgitação das enzimas biliares para o soro. Giunchetti et al. (2008) observaram reatividade das células de Kupffer, inflamação capsular e portal e presença de granulomas intralobular em cães sintomáticos infectados naturalmente por *L. chagasi*, o que poderia explicar as alterações identificadas nos níveis de Fosfatase Alcalina. Slappendel (1988) descreveu aumento nas concentrações de ALT e Fosfatase Alcalina em 61% e 51% de cães infectados, respectivamente. Ciaramella et al. (1997) em 150 cães com LVC, encontraram 16% com níveis plasmáticos aumentados para ALT e Fosfatase Alcalina. Entretanto, Castro et al. (2012) que não encontraram alterações nos parâmetros de ALT e Fosfatase Alcalina em nenhum dos 40 cães com LVC.

A concentração de hemácias apresentou-se significativamente diminuída nos animais sintomáticos das raças Labrador e Pit Bull e no grupo Outras Raças, assim como as concentrações de hemoglobina, nas raças Labrador, Pit Bull e nos grupos SRD e Outras Raças. O volume globular também estava diminuído em todos os grupos quando comparados ao controle não infectado e também a CHCM apresentou concentrações reduzidas no Pit Bull, SRD e Outras Raças em relação ao controle, o que sugere um quadro de anemia hipocrômica. Na análise global

pelo escore de gravidade observamos que todas as raças apresentaram anemia como uma alteração laboratorial importante. Estas observações estão em concordância com o descrito por Ciaramella et al. (1997) e Mattos Jr. et al. (2004). O quadro de anemia pode ser considerado a principal alteração laboratorial na raça Pit Bull.

Anemia frequentemente normocítica normocrômica foi observada em 116/158 (73,4%) dos cães por Koutinas et al. (1999). Em seres humanos foram descritos achados semelhantes (Oliveira et al. 2006; Rigo et al. 2009). A causa da anemia vista nos pacientes humanos não está totalmente esclarecida e pode ser devida tanto ao sequestro e destruição dos eritrócitos no baço, como causada por mecanismos imunológicos (Varma & Naseem, 2010). A hemólise pode ser uma das causas de anemia na leishmaniose visceral. Os níveis plasmáticos reduzidos e o aumento dos estoques intracelulares de ferro sugerem que a hiperplasia reticuloendotelial seja acompanhada por retenção anormal de ferro pelos macrófagos que, por consequência, limitam a resposta da medula óssea à hemólise (Varma & Naseem, 2010).

As concentrações de leucócitos não se mostraram alteradas. Já Ciaramella et al. (1997) encontraram neutrofilia em 24% dos cães analisados. Slappendel (1988) descreveu leucopenia em 22% e leucocitose em 8% dos cães infectados. Oliveira et al. (2006) e Rigo et al. (2009) descreveram leucopenia em seres humanos. Varma & Naseem (2010) entendem que a leucopenia observada em seres humanos é devida ao hiperesplenismo.

As concentrações de plaquetas estavam diminuídas significativamente em Boxer, Pit Bull e SRD quando comparados ao grupo controle não infectado. Slappendel (1988) e Ciaramella et al. (1997) descreveram trombocitopenia em 50% e 29,3% dos cães naturalmente infectados, respectivamente. A diminuição na concentração de plaquetas também é relatada em seres humanos acometidos por

leishmaniose visceral (Dube et al. 1995; Oliveira et al. 2006; Rigo et al. 2009). Varma & Naseem (2010) também sugerem que o sequestro esplênico seja a principal causa da trombocitopenia e que os mecanismos imunológicos não sejam importantes por não terem sido encontrados anticorpos anti-plaquetas na leishmaniose visceral.

A fração lipídica com maior frequência de alterações foi o colesterol HDL, observando-se níveis reduzidos em todos os grupos, mas apresentando-se significativamente diminuída em Labrador e SRD quando comparado ao grupo controle. A raça Labrador apresentou diferença significativa não só em relação ao grupo controle não infectado, mas também em relação às demais raças. As concentrações de colesterol VLDL e triglicérides não apresentam alterações relevantes. Estes dados são parcialmente concordantes com a literatura.

Analisando os parâmetros laboratoriais, podemos destacar a raça Pitbull como tendo alteração mais acentuada quanto ao quadro de anemia e o Boxer e o Labrador, nos parâmetros indicativos de alteração hepática. Em relação às frações lipídicas, o Labrador apresenta-se como a raça com nível mais baixo de HDL.

Na leishmaniose visceral ativa são descritas alterações no metabolismo lipídico (Nieto et al.; 1992; Liberopoulos et al., 2002; De Cicco et al. 2012). Liberopoulos *et al.* (2002) relataram o caso de um paciente portador de leishmaniose visceral humana com acentuada hipocolesterolemia, discreta hipertrigliceridemia e acentuada diminuição de LDL e HDL. Quadro semelhante foi descrito por Lal *et al.* (2007) em quatro casos pediátricos de leishmania visceral causada por *L. donovani* em que foi constatada hipocolesterolemia, hipertrigliceridemia, concentrações reduzidas de LDL e HDL e aumento de VLDL.

Barral *et al.* (1986) observaram níveis aumentados de triglicérides em pacientes portadores de leishmaniose visceral quando comparados com indivíduos normais. Bekaert *et al.* (1989, 1992) descreveram uma redução na concentração de

colesterol HDL e aumento marcante na concentração de triglicérides em crianças portadoras de leishmaniose visceral. Em humanos portadores de leishmaniose visceral a diminuição nos níveis séricos de colesterol está correlacionada à carga parasitária esplênica.

Mudanças nas concentrações plasmáticas de lipídeos e nas lipoproteínas também foram observadas em cães portadores de leishmaniose visceral (Gascón *et al.* 1988). Gomez-Nieto (1990) descreveu um aumento na concentração total de lipídeos nestes animais. Nieto *et al.*, (1992) analisaram dezesseis cães acometidos de LVC e constataram uma alteração no metabolismo lipídico com aumento na concentração de TAG, aumento moderado no colesterol total e diminuição de HDL, sugerindo um possível papel dos lipídeos na evolução da LVC. Mattos Jr. *et al.* (2004) não observaram alterações nos perfis de colesterol e triglicérides em 18 cães soropositivos no município de Niterói, RJ.

O colesterol é o principal componente das membranas dos eucariotos e tem um papel relevante na organização, dinâmica e função das membranas citoplasmáticas (Bansal, 2005). Por ser um lípide anfipático, é um dos mais importantes componentes das membranas celulares, presente principalmente em caveolas e em “lipid rafts”, os quais tem função relevante na transdução de sinais e na entrada de patógenos na célula hospedeira (Simons & Toomre, 2000; Pucadyl & Chattopadhyay, 2007).

Entretanto, ainda é pouco compreendida a relação entre níveis de colesterol e a infecção de células hospedeiras por protozoários como *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.* e *Toxoplasma gondii* (Bansal *et al.* 2005). O metabolismo de lipídeos nos tripanossomatídeos é comprometido pela deficiência na produção pela via *de novo* que desta forma precisam retirar os lipídeos do ambiente do hospedeiro. Estudos realizados *in vitro* demonstraram que *Giardia* e *Entamoeba* crescem em meios ricos em lipídeos e na ausência de soro (Bansal *et al.* 2005). Coopens *et al.*

(2000) demonstraram que o *T. gondii* assimila o LDL da célula hospedeira e que a interferência na via endocítica de LDL reduz sua sobrevivência dentro da célula. Em pacientes com Malária foram identificados níveis plasmáticos elevados de HDL, LDL e colesterol total (Faucher et al. 2002).

Pucadyil et al. (2004) demonstraram que a presença de colesterol nas membranas citoplasmáticas é necessária para a adesão e a penetração da leishmânia em macrófagos. A *Leishmania donovani* extrai colesterol da membrana de macrófagos rompendo os “lipids rafts” levando à incapacidade de estimular os linfócitos T. Recentemente observaram-se dados sugestivos de mudança na necessidade metabólica em amastigota quando comparada à de promastigota, passando a maior dependência de proteína e lípidos na forma intracelular (Rosenzweig et al. 2008).

As alterações lipídicas na Leishmaniose Visceral podem ser consequência do processo infeccioso, mas podem ser um fator contribuinte da suscetibilidade à infecção (Liberopoluos et al. 2002). A hipercolesterolemia induzida intrinsecamente ou extrinsecamente pode modular a resposta imune favorável ao hospedeiro. Shamshiev et al. (2007) demonstraram que a dislipidemia altera a produção de citocinas próinflamatórias induzidas por receptor do tipo Toll (TLR), incluindo interleucina 12 (IL-12), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), o que levaria à diminuição na ativação de células dendríticas, com intensa diminuição na resposta imune do tipo TH1 e aumento na resposta imune do tipo TH2, identificando o LDL oxidado (oxLDL) como o principal fator desencadeante deste mecanismo.

Estes diferentes resultados da literatura refletem a complexidade do metabolismo lipídico que também pode ser influenciado por fatores genéticos, metabólicos e dietários.

Após essas análises, passamos à observação das correlações com a gravidade do quadro clínico que mostram resultados interessantes em relação a algumas raças.

Embora os níveis de frações proteicas não fossem diferentes entre as raças, as alterações se correlacionaram à gravidade nos grupos Labrador, SRD e Outras Raças, o mesmo ocorrendo com o nível de creatinina que se correlacionou com a gravidade no grupo Outras Raças e a concentração de Fosfatase Alcalina no grupo SRD. A contagem de Leucócitos também não apresentou alterações entre os grupos, mas as alterações se correlacionaram à gravidade na raça Boxer.

A contagem de hemácias e o VG apresentaram diferenças somente na raça Pit Bull quando comparado às outras raças. O VG se correlacionou à gravidade, mas a contagem de hemácias não apresentou esta correlação. Para os demais grupos, a contagem de hemácias e o VG não apresentaram diferenças entre eles, mas nas raças Boxer, Labrador e no grupo Outras Raças a contagem de hemácias se correlacionou à gravidade assim com as alterações no VG se correlacionaram à gravidade em todas elas.

A CHCM apresentou níveis diferentes somente na raça Labrador em relação às demais raças, mas foi o grupo SRD em que estas alterações se correlacionaram à gravidade.

Em relação às frações lipídicas, a concentração de HDL estava reduzida na raça Labrador em relação às demais raças, mas o grupo SRD foi quem apresentou correlação com esta alteração. Os níveis de LDL, VLDL e triglicérides não se apresentaram diferentes entre as raças, mas a alteração de LDL apresentou correlação de gravidade no grupo SRD assim como VLDL e triglicérides no grupo Outras Raças.

Pela análise global dos dados apresentados, não observamos diferenças de suscetibilidade entre as raças em relação à Leishmaniose Visceral Canina. Os diferentes grupos raciais apresentaram alterações significantes principalmente em relação ao grupo controle não infectado e os parâmetros de proteínas séricas e hematológicos foram os que se apresentaram alterados com mais frequência, em concordância ao descrito na literatura.

O grupo Outras Raças foi aquele que apresentou o maior número de parâmetros alterados que se correlacionaram a gravidade, seguido do grupo SRD e das raças Labrador e Boxer. A raça Pit Bull foi a que apresentou o menor número de alterações correlacionadas a gravidade.

As alterações mais relevantes no perfil lipídico que apresentaram correlação com a gravidade ocorreram no grupo Outras Raças.

6 CONCLUSÕES

- A raça Labrador apresentou concentração de HDL diminuída em relação às demais raças. As alterações dos níveis de HDL, VLDL e triglicérides foram correlacionadas à gravidade no grupo Outras Raças.
- Não observamos diferença na gravidade das manifestações clínicas entre as raças ou grupos raciais para a Leishmaniose Visceral Canina.
- As diversas raças e grupos raciais apresentaram alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos pesquisados, porém os quadros de hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e anemia foram identificados com maior frequência, sendo estes parâmetros correlacionados à gravidade da doença na raça Labrador e nos grupos SRD e Outras Raças.
- O quadro de anemia foi mais importante na raça Pit Bull.
- O grupo Outras Raças apresentou o maior número de alterações correlacionadas à gravidade.

REFERÊNCIAS

- Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceição-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine Leishmaniasis: Pathological and Ecological Factors Influencing Transmission of Infection. *The Journal of Parasitology*. 1991 Aug;(77): 557-561.
- Alencar JE. Aspectos atuais do calazar no Ceará. *Rev Bras Malariologia e Doenças Tropicais*. 1974-1976.26:27-53.
- Alencar JE. Expansão do calazar no Brasil. *Ceará Médico*. 1983.5:86-102.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005 Jun 15;106(1-2):151-8.
- Altet L, Francino O, Solano-Gallego L, Renier C, Sanchez A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect Immun*.2002.70:2763–2771.
- Altet L, Francino O, Solano-Gallego L, Renier C, Sánchez A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect Immun*. 2002 Jun;70(6):2763-71.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Apr;10(2):298-319.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004.57:1–88.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
- Alves GB, Silva L dos S, Batista JF, Campos AP, Prianti Md, Costa FA. The sero-conversion and evaluation of renal alterations in dogs infected by *Leishmania (Infantum) chagasi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013 Mar-Apr;55(2):105-12.
- Andrade-Neto VV, Cicco NN, Cunha-Junior EF, Canto-Cavalheiro MM, Atella GC, Torres-Santos EC The pharmacological inhibition of sterol biosynthesis in *Leishmania* is counteracted by enhancement of LDL endocytosis. *Acta Trop*. 2011 Aug;119(2-3):194-8.
- Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect. Immun*.2001.69:4709–4718.

Ashford, RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 1996 Sep-Oct.14(5):523–532.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008 Jul;24(7):324-30.

Bansal D, Bhatti HS, Sehgal R. Role of cholesterol in parasitic infections. *Lipids Health Dis.* 2005 May 9;4:10.

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 2007;64:1-109.

Barbieri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology.* 2006;28:329–337.

Barral A, Carvalho EM, Badaró R, Barral-Netto M. Suppression of lymphocyte proliferative responses by sera from patients with American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1986 Jul;35(4):735-42.

Bekaert ED, Dole E, Dubois DY, et al. Alterations in lipoprotein density classes in infantile visceral leishmaniasis: presence of apolipoprotein SAA. *Eur J Clin Invest.* 1992;22: 190–199.

Bekaert ED, Kallel R, Bouma ME, et al. Plasma lipoproteins in infantile visceral leishmaniasis: deficiency of apolipoproteins A-I and A-II. *Clin Chim Acta.* 1989;184: 181–191.

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Sep;55(3):273-7.

Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001. 53(1):1-8.

Boraschi CSS, Nunes CM. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. *Clínica Veterinária.* 2007.71:44-48.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010.

Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa J.C, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 1998;76:173–180.

Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in TNF genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 1995;182:1259–1264.

Castellucci L, Jamieson SE, Miller EN, Menezes E, Oliveira J, Magalhães A, Guimarães LH, Lessa M, de Jesus AR, Carvalho EM, Blackwell JM. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. *BMC Med Genet.* 2010 Jan 20;11:10.

Castro, IP, Sousa, MVC, Magalhães, GM, Mundim AV, Noletto PG, Paula MBC, Pajuaba Neto AA, Medeiro, AA. Perfil Hepático e Protéico em Cães com Leishmaniose Visceral. *Biosci.J. Uberlândia.* 2012. Sept/Oct. 28(5):799-804.

Cerf BJ, Jones TC, Badaró R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WD Jr. Malnutrition a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1987;156:1030-1033.

Chabalgoity JA, Moreno M, Carol H, Dougan G, Hormaeche CE. *Salmonella typhimurim* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine.* 2001; 19:460-9.

Chattopadhyay A, Jafurulla M. Role of membrane cholesterol in leishmanial infection. *Adv Exp Med Biol.* 2012;749:201-13.

Chisari FV. Immunoregulatory properties of human plasma in very low density lipoproteins. *J Immunol.* 1977 Dec;119(6):2129-36.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.* 1997 Nov 22;141(21):539-43.

Coles, EH. *Veterinary Clinical Pathology.* Philadelphia: W.B. Saunders, 1986.615.

Coppens I, Sinai AP, Joiner KA: *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol.* 2000,149:167-80.

Costa CA, Genaro O, Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick MSM, Melo MN, Costa RT, Magalhães-Rocha MN, Mayrink W. Leishmaniose visceral Americana Canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1991.24:21–25.

Costa CH, Gomes RB, Silva MR, Garcez LM, Ramos PK, Santos RS, Shaw JJ, David JR, Maguire JH. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis.* 2000 Sep;182(3):997-1000.

Costa FA, Guerra JL, Silva SM, Klein RP, Mendonça IL, Goto H. CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2000 Dec;33(12):1455-8.

Curtis, Linda K. Cholesterol, apolipoprotein E, and immune cell function. Marcel Dekker, Inc., New York, 1992.

Dantas-Torres F, de Brito ME, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol.* 2006 Aug 31;140(1-2):54-60.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2007 Nov 10;149(3-4):139-46.

de Almeida Ado B, Sousa VR, da Cruz FA, Dahroug MA, Figueiredo FB, Madeira M de F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012 Oct-Dec;21(4):359-65.

De Cicco NN, Pereira MG, Corrêa JR, Andrade-Neto VV, Saraiva FB, Chagas-Lima AC, Gondim KC, Torres-Santos EC, Folly E, Saraiva EM, Cunha-E-Silva NL, Soares MJ, Atella GC. LDL uptake by *Leishmania amazonensis*: involvement of membrane lipid microdomains. *Exp Parasitol.* 2012 Apr;130(4):330-40.

De Oliveira Mendes C, Paraguai de Souza E, Borja-Cabrera GP, Maria Melo Batista L, Aparecida dos Santos M, Ellner Parra L, Menz I, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. *Vaccine.* 2003 Jun 2;21(19-20):2589-97.

Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H & Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 1995;17:451–458.

Descoteaux A, Moradin N, Arango Duque G. *Leishmania* dices away cholesterol for survival. *Cell Host Microbe.* 2013 Mar 13;13(3):245-7.

Dube B, Arora A, Singh VP, Kumar K, Sunder S. Platelet function studies in Indian kala-azar. *J Trop Med Hyg* 1995. 98(3):166–168.

Dye C, Williams BG. Malnutrition, Age and the Risk of Parasitic Disease: Visceral Leishmaniasis Revisited. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1993;254: 33-39.

Faucher JF, Milama EN, Missinou MA, Ngomo R, Kombila M, Krem-sner PG: The impact of malaria on common lipid parameters. *Parasitol Res.* 2002, 88:1040-43.

Feitosa MM. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). *Clinica Veterinária*, v.28, p.36-44, 2000.

Ferrer L, Juanola B, Ramos JA, Ramis A. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Pathol*. 1991 Jul;28(4):342-3.

Ferrer L. Leishmaniasis. In: Kirk, R.W., Bonagura, J.D. (Eds.), *Kirk's Current Veterinary Therapy*, 11th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1992; 266–270.

Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis*, Barcelona, Spain. *Canine Leishmaniasis: An Update*. Hoeschst Roussel Vet, Wiesbaden. 1999.

Fessel WJ, Follansbee SE, Rego J. High-density lipoprotein cholesterol is low in HIV-infected patients with lipodystrophic fat expansions: implications for pathogenesis of fat redistribution. *AIDS*. 2002 Sep 6;16(13):1785-9.

Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J, Portús M. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol*. 1999 Jun 15;83(2):87-97.

Foglia Manzillo V, Di Muccio T, Cappiello S, Scalone A, Paparcone R, Fiorentino E, Gizzarelli M, Gramiccia M, Gradoni L, Oliva G. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 May 9;7(5):e2225.

Frade AF. Leishmaniose visceral e susceptibilidade genética. *Revista da Biologia*. 2011.6b: 22-25.

França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol*. 2003.111:161–173.

Freitas, JCC, Nunes-Pinheiro DCS, Neto BEL, Santos GJL, Abreu, CRA, Braga, RR, Campo RM, Oliveira, LF. Clinical na laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012 jan-fev; 45(1):24-29.

Galvão-Castro B, Sá Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1984 Apr;56(1):58-66.

Garbagnati E. Changes in lipid profile observed in children over the course of infectious disease. *Acta Paediatr*. 1993 nov;82(11):948-52.

Garcia-Navarro CEK, Pachaly JR. *Manual de Hematologia Veterinária*. 1ª Ed. Livraria Varela, São Paulo. 1998:169p.

Gascón F.M. Marca MC, Nebot E. Hyperlipemias en perros: su incidencia y relación con cardiomiopatías isquémicas, función hepática y renal. II. Estudio del perfil

lipidico en perros con procesos infecciosos y parasitarios Med. Vet. 1988.(5):589–593.

Gaskin AA, Schantz P, Jackson J, Birkenheuer A, Tomlinson L, Gramiccia M, Levy M, Steurer F, Kollmar E, Hegarty BC, Ahn A, and Breitschwerdt EB, 2002. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. J Vet Intern Med 16:34–44.

Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. Res Vet Sci. 2008 Apr;84(2):269-77.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol. 2004.7(3):338-349.

Gradoni L, Gramiccia M, Mancianti F, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. Trans R Soc Trop Med Hyg.1988.82:568–571.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int J Parasitol. 2005 Oct;35(11-12):1169-80.

Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribáñez MA, Alvar J, Castillo JA. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. Res Vet Sci. 2000 Dec;69(3):249-53.

Harrus S, Waner T, Friedmann-Morvinski D, Fishman Z, Bark H & Harmelin A. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. Vet Immunol Immunopathol 2003; 96: 239–243

Hassan MF, Zhang Y, Engwerda CR, Kaye PM, Sharp H, Bickle QD. The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. Am. J. Pathol.2006.169:943–953.

Hill PG; Sammons HG. An interpretation of the elevation of serum alkaline phosphatase in disease. J Clin Path. 1967.20:654-659.

Juttner C, Rodriguez Sinchez M, Rollin Landeras E; Fragio AC, Slappendel RJ. Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. Vet. Rec. 2001.149:176–179.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, WebsterHK, Johnson AJ. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. I. Infection, clinical disease and clinical pathology. Vet Pathol. 1984.21:80-86, 1984.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*. 1990;4:1–24.

Kontos VJ.; Koutinas AF. Old world canine leishmaniasis. *Compendium on Continuing Education*. 1993;15(7):949-959.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1999; 35, 376–383.

Ladisch S, Poplack DG, Holiman B, Blaese RM. Immunodeficiency in familial erythrophagocytic lymphohistiocytosis. *Lancet*. 1978 Mar 18;1(8064):581-3.

Lainson, R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. W. Peters and R. Killick-Kendrick, eds. London: Academic Press. 1987(1):1–120..

Lal CS, Kumar A, Kumar S, Pandey K, Kumar N, Bimal S, Sinha PK, Das P. Hypocholesterolemia and increased triglyceride in pediatric visceral leishmaniasis. *Clin Chim Acta*. 2007 Jul;382(1-2):151-3.

Lampo M, Feliciangeli MD, Márquez LM, Bastidas C, Lau PA. possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg*. 2000 Jun;62(6):718-9.

Lane DR, Robinson R. The utility of biochemical screening in dogs. *Br Vet J*. 1970;126:230-237.

Laurenti MD, Rossi CN, Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, Pimenta PF, Marcondes M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol*. 2013 Sep 23;196(3-4):296-300.

Leontides, LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME, A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol*. 2002;109: 19–27.

Liberopoulos E, Alexandridis G, Bairaktari E, Elisaf M. Severe hypocholesterolemia with reduced serum lipoprotein(a) in a patient with visceral leishmaniasis. *Ann Clin Lab Sci*. 2002; 32(3):305-8.

Lopes AC, Amato Neto V, editores. *Tratado de Clínica Médica*. 1ª Ed. São Paulo: Roca: 2006.

Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Hernández S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995 Oct;48(3-4):209-20.

Mattos Jr DG, Pinheiro JM, Menezes RC, Costa DA. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2004;56 (1):119-122.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* 1999;119:237–246.

McConville M.J, Handman E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int J for Parasitol* 37 (2007) 1047–1051.

Miranda S, Roura X, Alberola J, Ferrer L, and Ramis A, 2005. Clinically patent canine leishmaniasis shows age, breed and sex predilection. In: *Worldleish3. Third World Congress on Leishmaniasis.* Palermo-Terrassini Sicily, Italy. 10–15 April. 2005. Abstract book; 171.

Miró G, Montoya A, Mateo M, Alonso A, García S, García A, Caballero MJ, Molina R. A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol Res.* 2007 Jul;101(2):253-7.

Molina R, Amela C, Nieto J et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 491– 493.

Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol.* 2012 Nov 23;190(1-2):268-71.

Morais AN, Sousa MG, Meireles LR, Kesper N Jr, Umezawa ES. Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaína, Tocantins. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013 Apr-Jun;22(2):225-9.

Moreno, J. Alvar, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002;18:399–405.

Moura, ST, Fernandes CGN, Pandolpho VC; Rodrigues e Silva R. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 1999. 36(2).

Nieto CG, Barrera R, Habela MA, Navarrete I, Molina C, Jiménez A, Serrera JL. Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 1992 Oct;44(3-4):175-82.

Nieto CG, Garcia-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol. Immunopathol.* 1999;67: 117–130.

Noli C, 1999. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus* 9, 16–24.

Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007 Sep;28(9):378-84.

Oliveira ALL, Paniago AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, et al. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39:446-50.

O'Neal SE, Guimarães LH, Machado PR, Alcântara L, Morgan DJ, Passos S, Glesby MJ, Carvalho EM. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 2007;195:142–148.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Nov;65(5):510-7.

Peacock CS, Collins A, Shaw MA, Silveira F, Costa J, Coste CH, Nascimento MD, Siddiqui R, Shaw JJ, Blackwell JM. Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Genet Epidemiol.* 2001 Apr;20(3):383-96.

Pearson, RD. Pathology of Leishmaniasis. In: Kenneth S. Warren (Ed). *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. 3 ed. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 1993:71-86.

Petersen CA, Barr SC. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized?. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2009 Nov;39(6):1065-74.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 1994;62:229–235.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernardina W, Del Real G & Ruitenber J. Cellular and humoral responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 1994; 62: 229–235.

Pozio E, Gradoni L, Bettini S, Gramiccia M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Gosseto). *Acta Trop.* 1981;38:383–393.

Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. Cholesterol: a potential therapeutic target in *Leishmania* infection? *Trends Parasitol.* 2007 Feb;23(2):49-53..

Pucadyil TJ, Tewary P, Madhubala R, Chattopadhyay A. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Feb;133(2):145-52.

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009 Dec;136(14):1915-34

Ramakrishnan S, Serrichio M, Striepena B, Bütikofer P. Lipid synthesis in protozoan parasites: A comparison between kinetoplastids and apicomplexans. *Progress in Lipid Research*. 2013 (52):488–512.

Ramírez GA, Peñafiel-Verdú C, Altimira J, García-González B, Vilafranca M. Naturally acquired visceral leishmaniosis in a captive Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus rufogriseus*). *Vet Pathol*. 2013 Jan;50(1):188-90.

Ramos GP, Rangel FBF, Botelho GG. Valores bioquímicos séricos de cães portadores de leishmaniose visceral. *Rev Bras Med Vet*. 1994;16:23-25.

Reithinger R, Davies CR. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends Parasitol*. 2002.18(7):289-90.

Rifai, N., Bachorik, P.S., Albers, J.J. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (Eds.), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 1999:809–861.

Rigo RS, Rigo L, Honer MR. Aspectos Clínicos e Laboratoriais na Leishmaniose Visceral Americana. *J.Bras Nefrol*. 2009;31(1):4854.

Rosenzweig D, Smith D, Oppendoes F, Stern S, Olafson RW, Zilberstein D. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J*. 2008 Feb;22(2):590-602.

Sacks DL. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infect Agents Dis*. 1992 Aug;1(4):200-6.

Salgado Filho N. Estudo da ocorrência de imunocomplexos circulantes e ativação do sistema complemento em pacientes com a forma aguda da leishmaniose visceral. [Dissertação]. São Paulo. Escola Paulista de Medicina. 1987.

Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, Francino O. Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered*. 2005;96(7):755-8.

Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002; 88: 21–30.

Shamshiev AT, Ampenberger F, Ernst B, Rohrer L, Marsland BJ, Kopf M. Dyslipidemia inhibits Toll-like receptor-induced activation of CD8 alpha-negative dendritic cells and protective Th1 type immunity. *J Exp Med*. 2007 Feb 19;204(2):441-52.

Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol.* 2009 Jun; 47(6):412-23.

Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol.* 1999 Mar;15(3):271-6.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):31-9.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q.* 1988 Jan;10(1):1-16.

Soares NM, Leal TF, Fiúza MC, Reis EA, Souza MA, Dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho L. Plasma lipoproteins in visceral leishmaniasis and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. *Parasite Immunol.* 2010 Apr;32(4):259-66.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 2000 Jun 10;90(1-2):37-45.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, The LeishVet Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors.* 2011 May 20;4:86.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:560–563.

Souza NP, Almeida Ado B, Freitas TP, Paz RC, Dutra V, Nakazato L, Sousa VR. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 May-Jun;43(3):333-5.

Strauss-Ayali D, Baneth G, Shor S, Okano F, Jaffe CL. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Int J Parasitol.* 2005;35: 63–73.

Tryphonas L, Zawidska Z, Bernard MA, Jansen EA. Visceral leishmaniasis in dog: clinical, hematological and pathological observations. *Can J Comp Med.* 1977; 41:1-12.

Varma N, Naseem S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2010 Sep;26(3):78-82.

Verçosa BL, Lemos CM, Mendonça IL, Silva SM, de Carvalho SM, Goto H, Costa FA. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of

symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. BMC Vet Res. 2008 Nov 6;4:45.

WHO. Control of Leishmaniasis. Technical Report Series. World Health Organization, Geneva.1990.793:1-158.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Technical Report Series 949.Geneva. 2010.

Zhang K, Bangs JD, Beverley SM. Sphingolipids in parasitic protozoa. Adv Exp Med Biol. 2010;688:238-48.

Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in Leishmania. Mol Biochem Parasitol. 2010 Apr;170(2):55-64.

APENDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA UTILIZAÇÃO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS DE CÃO PARA PARTICIPAÇÃO NO PROJETO DE PESQUISA DENOMINADO

“EVOLUÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL: RAÇA CANINA E PERFIL LIPÍDICO”

Eu, (nome) _____, (nacionalidade) _____, (idade) _____, (estado civil) _____, (profissão) _____, R.G. _____ e CPF _____ estou sendo convidado(a) a autorizar a utilização do seu animal da espécie canina de nome _____, sexo _____, idade/ data do nascimento _____, raça _____ cor de pelagem _____ para um estudo científico no projeto supracitado, cujos objetivos são avaliar o perfil de lipoproteínas plasmáticas de cães naturalmente infectados com *Leishmania sp.*, sua possível participação na resposta imunológica, e a raça do animal como fator de suscetibilidade ou resistência na leishmaniose visceral canina.

A utilização do animal no referido estudo será no sentido de fornecer cerca de 20 ml de sangue total, material para biópsias de gânglios (linfonodos poplíteos) das pernas e biópsia da medula óssea retirada a partir do osso externo (do peito), ambas através de punção aspirativa por agulha fina e da biópsia de um pedaço da pele da parte interna da orelha, este último num tamanho aproximado de 0,5 cm². Os procedimentos passíveis de dor, como a punção de medula óssea e a biópsia da pele da parte interna da orelha, serão realizados com aplicação de anestesia local e por médico veterinário especializado.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, o benefício alcançado será possuir o real diagnóstico do estado de saúde do animal e o comprometimento da doença relativos ao momento das coletas.

Fui esclarecido sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, como sangramento discreto nos locais biopsiados e o animal mancar por alguns dias do membro traseiro em que foi coletada amostra de linfonodo poplíteo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu

nome e do meu animal e qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, serão mantidos em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e por desejar sair da pesquisa não sofrerei qualquer prejuízo.

O pesquisador envolvido com o referido projeto é o médico veterinário André Luis Soares da Fonseca, professor da disciplina de Imunologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, *campus* Campo Grande/MS, e com ele poderei manter contato pelos telefones (11) 3061-7027 e (11) 9991-4838, (11) 8289-2050 e (67) 9991-2200.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Tendo sido orientado(a) quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no laboratório de Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo /USP e outra copia me será fornecida.

Campo Grande/MS, _____ de _____ de 201____ .

(nome do proprietário)

Prof. André Luis Soares da Fonseca CRMV/MS 1404

(nome da testemunha e documento oficial de identificação)

APÊNDICE B

FICHA ANAMNÉSICA

Ficha nº _____ Data: ____/____/____

DADOS DO PROPRIETÁRIO

Nome do(a) Proprietário(a) : _____

R.G. _____ CPF: _____

Endereço residencial: _____

Bairro: _____ Cidade/UF: _____

Profissão: _____ e-mail: _____

Fone: () _____ Cel: () _____

DADOS DO ANIMAL

Nome do animal: _____ Sexo: () macho () fêmea

Idade: _____ Data de Nascimento: _____

Raça _____ () puro () mestiço Cor: _____

Porte: () mini () pequeno () médio () grande () gigante Peso: _____

Animal vacinado contra Leishmaniose: () sim () não Leishmune () Leishtec ()

Castrado: () sim () não () não sabe

Vacinas: anti-rábica: () sim () não () não sabe

polivalente () sim () não () não sabe

Obs:

SINTOMATOLOGIA CLÍNICA

Evolução clínica (pelo proprietário): _____

O animal já teve outras doenças ? () sim () não

Quais e quando (e tratamentos aplicados) _____

ANAMNESE EPIDEMIOLÓGICA

1- Houve outros casos de leishmaniose na vizinhança ? () sim () não () não sabe

2- Tem/teve outros cães em casa com a mesma doença? () sim () não

3- Os pais ou irmãos do cão tem/tiveram a doença? () sim () não () não sabe

4- Há outros cães/animais em casa ? () sim () não Quantos? (nome, idade, sexo)

5- Foram realizados exames para leishmaniose nos outros animais () sim () não

6- Origem do cão (cidade, estado) _____

() adquirido em pet shop () resgatado de rua/abrigo () doação de amigo

() adquirido de canil () outro (especificar) _____

7- O cão já morou em outros bairros/cidades? () sim () não () não sabe

Quais ? _____

8- Local onde o cão vive: () só dentro de casa () só fora de casa

() predominantemente dentro de casa () predominantemente fora de casa

Obs: _____

9- O local/bairro onde o cão vive tem mosquito/flebotomíneo? () sim () não () não sabe

8- Há coabitação do cão com () crianças () gestantes () idosos () n.d.a.

9- Tempo de coabitação dos membros da casa com o animal já manifestando a doença:

() menos de 1 mês () de 1 a 3 meses () de 3 a 6 meses () 6 a 12 meses

() 1 a 2 anos () 2 a 4 anos () acima de 4 anos () não se aplica

10- Outros: _____

ANAMNESE CLÍNICA

Temp. Retal: _____

SISTEMA TEGUMENTAR

- 1)- Apresenta lesões de pele? () sim () não
 () dermatite seca () lesão compatível com sarna () lesão compatível com fungo
 () lesão compatível com doença bacteriana () lesão compatível com autoimunidade
 () alopecia () hiperqueratose () hiperpigmentação () onicogribose
 () lesão ungueal () hiperemia ungueal () outros

Obs: _____

- 2)- Apresenta ectoparasitismo () sim () não
 () pulgas () piolhos () carrapatos

Obs: _____

SISTEMA RESPIRATÓRIO

- 1)- Apresenta alterações à ausculta pulmonar? () sim () não
 () estertores secos () estertores úmidos () tosse seca () tosse úmida
 () hiperqueratinização de narinas () úlceras de narinas/mucosas

Obs: _____

SISTEMA CIRCULATÓRIO

- 1)- Apresenta alterações à ausculta cardíaca? () sim () não
 () aumento da área de percussão () desdobramento de bulha () prolapso de válvula
 () estenose de válvula () fibrilação cardíaca () arritmia cardíaca
 2)- Numero de batimentos/minuto _____ .

SISTEMA DIGESTIVO

Mucosa Oral: () corada () cianótica () pálida () icterica

Gengivas: () normais () periodontite () gengivite () úlceras

Dentição () normal () tártato dentário () desgaste senil () fissuras/fraturas

Estômago/Intestinos

() vômitos () fezes pastosas () diarreia mucosa () melena

PALPAÇÃO ABDOMINAL E DE LINFONODOS

Baço () normal () aumentado () diminuído () não foi possível palpar

Fígado () normal () aumentado () diminuído () não foi possível palpar

Bexiga Urinária () normal () vazia () repleta () não foi possível palpar

Rins () normal () aumentado () diminuído () não foi possível palpar

Linf. popliteos () normal () aumentado () diminuído () não foi possível palpar

Linf. cervicais () normal () aumentado () diminuído () não foi possível palpar

Linf. submandibulares () normal () aumentado () diminuído () não foi possível palpar

APARELHO LOCOMOTOR

Dores articulares ? () sim () não () não sabe

Alterações morfológicas ? () sim () não () não sabe

Dor ao levantar ou deitar-se ? () sim () não () não sabe

OLHOS/PÁLPEBRAS

() sem lesões aparentes () ectrópio () entrópio () conjuntivite () uveíte

() catarata () glaucoma () úlcera de córnea () ceratite () blefarite

() ceratoconjuntivite seca () outros

MAPEAMENTO DAS LESÕES DÉRMICAS

SISTEMA TEGUMENTAR

- 1)- Apresenta lesões de pele? () sim () não
- () dermatite seca () lesão compatível com sarna () lesão compatível com fungo
- () lesão compatível com doença bacteriana () lesão compatível com autoimunidade
- () alopecia () hiperqueratose () hiperpigmentação () onicogribose
- () lesão ungueal () hiperemia ungueal () cancro de inoculação () úlceras

Obs: _____

EXAMES LABORATORIAIS SOLICITADOS

Exames Específicos para *Leishmania sp.*

R.I.F.I.: _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

E.L.I.S.A. _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

PAAF (med. óssea): _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

PAAF (linf. poplíteo): _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

PCR (med. óssea): _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

PCR (linf. poplíteo): _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

IHC (pina) _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

ICC (linf. poplíteo) _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

OUTROS _____

Provas para Função Hepática e Renal

Creatinina: _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

Ureia _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

ALT: _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

Fosfatase Alcalina: _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

Hemograma Completo: _____

Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

Proteinograma (ou Eletroforese de Proteínas) _____

Relação Albumina/Globulinas: _____ Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____

Lipoproteinograma (ou Eletroforese de Lipoproteínas) _____

Data da Coleta: _____ Data do Exame: _____**Outros Exames: (Raspado de Pele, Urina tipo I, Glicemia etc.)****ANEXAR FOTOS****Todos os exames realizados deverão ser anexados a esta ficha clínica.**

ANEXO A – Comitê de Ética do IMTSP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-8650/7025 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 31 de agosto de 2011.

Ilmo (a)

Dra. HIRO GOTO

(aos cuidados de André Luis Soares da Fonseca)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2011/097** e intitulado "Evolução da leishmaniose visceral: raça canina e perfil lipídico", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna

Vice-Presidente (em exercício)

Comissão de Pesquisa e Ética do IMTSP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMTSP