

FABIANE ARAGÃO RODRIGUES

**ALTERAÇÃO TESTICULAR, EPIDIDIMÀRIA E DO LIQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO DE CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758)
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*
PROVENIENTES DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE**

**RECIFE
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

FABIANE ARAGÃO RODRIGUES

ALTERAÇÃO TESTICULAR, EPIDIDIMÁRIA E DO LIQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO DE CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758)
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*
PROVENIENTES DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE
2006

**ALTERAÇÃO TESTICULAR, EPIDIDIMÀRIA E DO LIQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO DE CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758)
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*
PROVENIENTES DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE.**

FABIANE ARAGÃO RODRIGUES

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

EXAMINADORES:

Dr. Yara de Miranda Gomes

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior

**RECIFE
2006**

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

R696a Rodrigues, Fabiane Aragão
Alteração testicular, epididimária e do líquido cefalorraquidiano de cães (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi provenientes da Região Metropolitana do Recife /Fabiane Aragão Rodrigues. - 2006.
90 f.

Orientador : Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária)
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE
Inclui anexo e bibliografia.

CDD 636. 708 969 364

- 1 . Parasitologia Veterinária
 - 2 . Neurologia
 - 3 . Patologia
 - 4 . Proteína
 - 5 . Leishmaniose visceral canina
 - 6 . Anticorpos anti-*Leishmania chagasi*
 - 7 . Líquido cefalorraquidiano
 - 8 . Clínica médica
 - 9 . Veterinária
 - 10 . Pernambuco
- I . Alves, Leucio Câmara
 - II . Alteração testicular e do líquido cefalorraquidiano de cães (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi provenientes da Região Metropolitana do Recife

“Somos o que fazemos, mas somos, principalmente, o que fazemos para mudar o que somos.”

(Eduardo Galeno)

A minha mãe Maria José Aragão pelo exemplo de mulher, pela garra,
o profissionalismo e, principalmente, pelo amor e esforços a mim
dedicados, não só a minha vida acadêmica, como pessoal.

**Ao meu pai José Luiz Rodrigues pelos bons conselhos nas horas
certas e pela força**

Vocês sempre serão meu porto seguro!

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esteve presente em minha vida me guiando e iluminando meu caminho principalmente nesse momento tão especial.

Ao meu querido irmão Rodrigo que sempre me deu força.

Ao meu noivo Reidson Marcio pela ajuda, apoio e paciência nos momentos mais críticos ao longo da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leucio Câmara Alves, meu orientador, por ter acreditado em mim e sempre ter me apoiado nos momentos mais difíceis ao longo dessa jornada. Pelos ensinamentos, pela participação ativa neste trabalho, pelo incentivo e pela amizade.

A Profa. Dra. Maria Aparecida da Gloria Faustino, pessoa pela qual tenho muita admiração, pelas orientações e ensinamentos.

Aos Profs. Drs. Frederico Celso Lyra Maia, Valdemiro Amaro da Silva Júnior e Maria Madalena Pessoa Guerra, pela essencial colaboração na realização e interpretação dos exames histopatológicos e reprodutivos.

A todos do Laboratório de imunologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/ Fiocruz, em especial à Dra. Yara de Miranda Gomes, Rodrigo Alves, Milena Paiva e Mineo pela

colaboração de grande valor para a realização dos exames sorológicos, parte fundamental deste trabalho.

Ao Centro de Vigilância Ambiental da Prefeitura do Recife, em especial a João Alves, Geraldo Vieira, Sandra Araújo e aos funcionários do canil, pelos animais cedidos para realização do experimento e pela ajuda com os mesmos.

Às amigas Bárbara, Paola, Éricka e Ana Maria pela disposição em vários momentos precisos e preciosos na realização deste trabalho. Sem essa equipe nada teria saído do papel.

Aos colegas do curso de Pós-graduação, Andréa Paiva, Carlos Alberto, Erica Moraes Fabiani Guido, Grazielle, Juliana Pinto, Rivanilson, Manoel, Manuela, Mariana, Sildivane e Wagner por todos momentos que passamos juntos.

A todos os amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, em especial Alessandra Ribeiro, Daliane, Débora, Edileuza, Geovania, Márcia Paula, Marilene, Verdiane e Guiomar.

A Ana Katarina e Tuzinha pela ajuda na busca pelas referências no COMUT e normalização das mesmas, respectivamente.

Toda a minha gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) ou calazar é uma doença sistêmica causada pelo protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Sua transmissão realiza-se por insetos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, considerado vetor ativo da doença no Brasil. Este trabalho teve como propósito relatar as alterações testiculares e do líquido cefalorraquidiano (LCR), bem como, analisar as proteínas do soro e do LCR de cães com infecção natural provenientes da Região Metropolitana do Recife. As alterações testiculares foram evidenciadas em um animal que não fecundava nenhuma fêmea há mais de 12 meses. O resultado do exame histopatológico evidenciou degeneração testicular e epididimite multifocal e intestinal linfoplasmocitária discreta, sem presença de espermatozóide no lúmen. Para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi*, tanto no soro quanto no LCR foram utilizados 29 animais sendo 21 pertencentes ao grupo infectados (GI) e oito ao grupo controle (GC). Os resultados revelaram que 42,8% (9/21) dos animais do GI foram positivos para presença de anticorpo anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* no LCR. Após a mensuração da proteína sérica e líquórica dos animais do GI, 85,7% (18/21) apresentaram a proteína sérica elevada, e 16,7% (3/21) apresentaram a proteína líquórica elevada com médias de $8,34 \pm 1,07$ e $17,09 \pm 16,03$, respectivamente. Os resultados aqui obtidos sugerem que cães com histórico de infertilidade proveniente de áreas endêmicas devem ser investigados para LVC. Por outro lado, a possível lesão na barreira hematoencefálica e/ou a produção de imunoglobulina no LCR pode ser responsável pela presença de anticorpos anti *Leishmania (L) chagasi*, assim como a elevação da proteína líquórica. Não obstante a hiperproteinemia é resultante da estimulação policlonal após o contato com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) also now as kalazar is a systemic disease caused by the protozoan from the *Leishmania (Leishmania) chagasi* genus. Its transmission occurs through hematophagous insects from the *Lutzomyia longipalpis* genus, considered active vectors in Brazil. This work aimed to present not only the testicular and Cerebrospinal Fluid (CSF) changes but also evaluate sera proteins in naturally infected dogs from the Região Metropolitana do Recife. Testicular changes were observed in an animal that could not fertilize a female for over 12 months. Results from the histopathological exams evidenced testicular degeneration and discreet lymphoplasmocytic multifocal interstitial epididimitis with sperms absence at the lumen. To search for anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* antibodies in sera and CFS, 29 animals were used where 21 belonged to the infected group (IG) and eight to the control group (CG). Results revealed that 42.8% (9/21) of the IG were positive for anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* antibody. Following sera and liquor protein measurement 85.7% (18/21) presented hyperproteinemia and 16.7% (3/21) presented increase of CFS protein level with means ranging from 8.34 ± 1.07 and 17.09 ± 16.03 , respectively. These results suggests that dogs with history of infertility coming from endemic areas must be investigated for CVL. On the other hand, the possible lesion on blood-brain barrier and/or immunoglobulins production at CFS may be responsible for the presence of antibodies anti *Leishmania (L) chagasi*, as well as the increase on liquor protein. Still, hyperproteinemia is a result of policlonal stimulation following contact with *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

INDICE DE ILUSTRAÇÃO

Página

CAPITULO 1

3. ORQUITE E EPIDIDIMITE EM CÃO COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania*

(*Leishmania*) *chagasi* - RELATO DE CASO

FIGURA 1	Fotomicrografia da cauda do espermatozóide fortemente enrolada (seta esquerda) e cabeça destacada (seta direita). 40 X	20
FIGURA 2	Fotomicrografia do infiltrado mononuclear linfoplasmocitário no intertúbulo. 40 X	20
FIGURA 3	Fotomicrografia do processo degenerativo caracterizado pela redução do epitélio. 40 X	20
FIGURA 4	Fotomicrografia da célula de Leydig apresentando excesso de lipofuscina em seu interior. 100X	20
FIGURA 5	Fotomicrografia do lúmen da calda do epidídimo direito apresentando azospermia. 10X	21

INDICE DE TABELA

Página

CAPITULO 3

5. AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL DO SORO E DO LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO (LCR) DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR
Leishmania (Leishmania) chagasi

Tabela 1- Média e desvio padrão dos níveis séricos em g/dl de proteína total, albumina, globulina e da relação A: G no soro dos animais do GI e do GC. Recife, 2006 44

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1- Leishmaniose visceral	01
1.2- Aspectos clínicos	02
1.3- Alterações no Sistema Genital na Leishmaniose Visceral Canina	03
1.4- Alterações no Líquido Cefalorraquidiano (LCR) na Leishmaniose Visceral Canina	03
1.5- Alterações na Proteína Sérica na Leishmaniose Visceral Canina	05
1.6- Referências	05
2. OBJETIVOS	12
2.1- Geral	12
2.2- Específicos	12
CAPÍTULO 1	13
3. ORQUITE E EPIDIDIMITE EM CÃO COM INFECÇÃO NATURAL POR <i>Leishmania</i>	
<i>(Leishmania) chagasi</i> - RELATO DE CASO	
Resumo	14
3.1- Introdução	15
3.2- Relato do Caso	16
3.2.1- Descrição do paciente	16
3.2.2- Exame clínico	17
3.2.3- Exame parasitológico	17
3.2.4- Colheita do sangue para sorologia	17
3.2.5- Exame andrológico	18

3.2.6- Teste de imunoadsorção enzimática (ELISA)	18
3.2.7- Exame anatomo patológico	18
3.3.-Discussão	19
3.4- Referências	23
CAPÍTULO 2	27
4. ANTICORPOS ANTI- <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> (CUNHA & CHAGAS, 1937) EM LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE CÃES (<i>Canis familiaris</i>)(LINNAEUS, 1758) COM INFECÇÃO NATURAL	
Resumo	28
4.1- Introdução	29
4. 2- Material e Métodos	30
4.2.1- Animais	30
4.2.2- Exame clínico	30
4.2.3- Colheita do material destinado ao exame parasitológico	31
4.2.3.1- Biopsia de medula óssea	31
4.2.4- Colheita do material destinado ao teste sorológico	31
4.2.5- Formação do grupo experimental	31
4.2.6- Colheita do Liquido Cefalorraquidiano (LCR)	32
4.2.7- Teste sorológico	32
4.3. Resultados e discussão	33
4.4- Conclusão	34
4.5- Referências	34

CAPÍTULO 3	38
5. AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL DO SORO E DO LÍQUIDO	
CEFALORRAQUIDIANO (LCR) DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR	
<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	
Resumo	39
. 5.1- Introdução	40
.5.2- Material e Métodos	41
.5.2.1-Animais	41
5.2.2- Colheita do soro	42
5.2.3- Colheita do Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	42
5.2.4- Determinação da proteína total do LCR e do soro	43
5.2.5- Análise Estatística	43
5.3- Resultado e discussão	44
5.4- Conclusão	48
5.5- Referências	49
6. CONCLUSÕES GERAIS	55
7- REFERÊNCIAS	56
8- ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Leishmaniose Visceral

Atualmente a Leishmaniose visceral (LV) encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (WHO, 2002). No Brasil, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* tem sido o agente responsável pela infecção, sendo transmitido ao homem pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

Desta forma, a ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível (GONTIJO e MELO, 2004).

Apesar da LV ocorrer de forma endêmica em áreas suburbanas e urbanas (BRASIL, 2003) de vários Estados do Brasil como Roraima, Pará, Tocantins, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e todos os estados do Nordeste (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997), no passado a enfermidade era considerada doença exclusivamente de ambientes rurais.

Entre os hospedeiros silvestres susceptíveis, raposas e marsupiais são os animais incriminados na cadeia epidemiológica.

No ambiente doméstico, segundo Gontijo e Melo (2004), o cão desempenha um importante papel na cadeia de transmissão, em virtude destes apresentarem uma maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, fato que favorece a infecção dos vetores (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997) e sua transmissão para população canina e humana.

As diferentes taxas de prevalência da enfermidade na população canina refletem a imunocompetência do hospedeiro vertebrado (FEITOSA et al., 2000) frente ao desafio infectante. Sendo assim atualmente, considera-se a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) como uma enfermidade imunomediada, onde a presença da resposta humoral está associada à doença clínica, enquanto que a resposta celular tem sido observada em animais assintomáticos (MORENO et al., 1999).

Como conseqüência deste *status* imunológico, os animais que não forem eficazes na geração da resposta imune, ocorre a disseminação dos parasitos na pele e posteriormente para diferentes órgãos e tecidos, causando uma doença sistêmica.

1.2. Aspectos Clínicos

Segundo, Feitosa e colaboradores (2000), a leishmaniose causa doença sistêmica e pode manifestar-se de três meses a alguns anos após a infecção por *Leishmania* sp., e sua gravidade depende da imunocompetência do hospedeiro vertebrado. Clinicamente, os animais podem ser classificados de acordo com a evolução da doença em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos (BRASIL, 2004).

De um modo geral os animais podem desenvolver dermatopatias, caracterizada principalmente por alopecia local ou generalizada e presença de úlceras cutâneas (ALVES e FAUSTINO, 2005).

Entre as alterações sistêmicas, destacam-se a hepatoesplenomegalia, e sinais de deposição de imunocomplexos nos olhos, representado por ceratoconjuntivite seca,

ceratite ulcerativa e corioretinite (BRITO, 2004), problemas articulares como a poliartrite autoimune, (DENEROLLE, 1996), além de disfunção cardio-respiratória e digestiva (RIBEIRO, 2005; BARROIUM-MELO et al, 2005) entre outros tem sido observados.

1.3. Alterações no Sistema Genital na Leishmaniose Visceral Canina

O envolvimento do trato genital e a infecção por *Leishmania* sp, tem sido descrito na doença cutânea (DINIZ, 2005), notadamente na espécie humana (CASTRO et al., 1987; CABELLO et al., 2002).

Contudo Martinez-Garcia et al., (1996) e Kovalenko et al. (1994) observaram alterações testiculares em infecções naturais ou experimentais por *Leishmania donovani* no homem e em animais de laboratório respectivamente.

Na espécie canina, presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp foi descrita no testículo e epididimo em cães com infecção natural (POUL, 1949; DIAZ, 1982)

Segundo Diniz (2005), a intensidade de inflamação e a quantidade de formas amastigotas encontrada nos epidídimos, glândula e prepúcio são diretamente proporcionais ao aparecimento dos sinais clínicos em cães com infecção natural por *Leishmania* sp.

1.4. Alterações no Líquido Cefalorraquidiano (LCR) na Leishmaniose Visceral Canina

O LCR é responsável por proteger, sustentar e nutrir o cérebro e a medula espinal (FERNANDES, 1990). Sua produção é realizada no plexo coróide por um

processo de filtração e secreção ativa, com sua absorção ocorrendo nas vilosidades no seio venoso cerebral, pelas vênulas no espaço subaracnóide e pelos vasos linfáticos ao redor da medula espinal (WHEELER e SHARP, 1999).

Inúmeros quadros mórbidos podem causar alterações no líquido, particularmente linfossarcomas, processos inflamatórios crônicos, degenerativos e infecciosos causados por vírus, bactérias, fungos, e protozoários (CORNELIUS, 1958).

Prasad e Sen (1996) relataram a presença de formas amastigotas de *Leishmania donovani* em pacientes humanos e em animais infectados, bem como processos inflamatórios no plexo coróide e meninges (VIÑUELAS et al. 2001).

No que concerne à infecção por *Leishmania* sp, Prasad e Sen (1996) e Viñuelas et al. (2001) observaram formas amastigotas de *Leishmania donovani* no plexo coróide com alteração do conteúdo líquido em pacientes humanos e animais com infecção natural respectivamente.

Segundo Viñuelas et al. (2001), sinais de envolvimento neurológico na leishmaniose visceral canina estão associados à presença de inflamação crônica das meninges, infiltração por linfócitos e células plasmáticas, e imunoglobulinas (LIMA et al., 2003).

Por outro lado Garcia-Alonso et al.(1996), observaram que a deposição de proteínas de alto peso molecular, como as imunoglobulinas, no plexo coróide em cães com infecção natural por *Leishmania infantum* pode predispor ao aparecimento de doença degenerativa e depósito de substâncias.

1.5 Alterações na Proteína Serica na Leishmaniose Visceral Canina

As proteínas são fundamentais, no que diz respeito à estrutura e função, para qualquer célula que faça parte do organismo de qualquer ser vivo e a maioria delas são sintetizada no fígado (COLES, 1984).

O aumento de proteína plasmática tem sido observado em animais com LVC (MENDONÇA, 1996, YKEDA et al., 2003). Este aumento está relacionado com a evolução da infecção, número de parasitos inoculados e a via de inoculação (ROSSAN e STAUBER, 1959). Além disso, a hiperproteinemia plasmática tem sido verificada, particularmente, nos estágios finais da doença (HERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 1987; RAMOS et al., 1994).

Como resultado, ocorre uma a hipergamaglobulinemia como consequência da produção de anticorpos, e inversão da relação Albumina: Globulina (A:G) em decorrência das alterações hepáticas (FERRER, 1992; KONTOS e KOUTINAS, 1993).

1.6 REFERÊNCIAS

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquérito epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 20, n. 1, p. 259-265, jan/fev, 2004

ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose visceral canina. **Manual da Schering-Plough**, 2005, 14p.

BRASIL. MINISTÈRIO DA SAUDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2003. 120p.

BRASIL. MINISTÈRIO DA SAUDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2004. 120p.

BARROUIN-MELO, Stella Maria et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal**, London, v. 171, n. 2, p.331-339, 2006.

BRITO, F. L. C. **Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas, 1937)**. 2004. 862 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CABELLO,I.;CARABALLO,A.;MILLÁN,Y. Leishmaniasis in the genital area. **Revista do Instituto Tropical de São Paulo**,v.44,n.2, p. 105-107, 2002.

CASTRO, C.A.; HIDALGO, H.H; SOLANO,A.E.;COTO,C.F. Leishmaniasis of the genital organs. **Medicine Cutan Ibero Latin American**, v.15,p.145-150, 1987.

COLES, E. H. Fluido cerebrospinal. **Patologia clínica veterinária**, 3. ed. Rio de Janeiro: Manole, 1984. p. 367-381.

CORNELIUS, C.D. Canine cerebrospinal fluid. **California Veterinarian**, San Francisco, v. 12, n. 2, p. 18-20, 1958.

DENEROLLE, P H. Leishmaniose canine: difficultes du diagnostic et du traitement (125 cas). **Pratique Medicale et Chirurgicale de L'animal de Compagnie**, Paris, v. 31, n. 2, p.137-145, 1996.

DIAZ, M. P.; ARRIBAS, J. L. G.; GARCIA, E. G. Lesiones testiculares y epididimarias em la leishmaniasis visceral canina, de presentyacion natural. **Higia Pecoris**, v. 4, n. 10, p. 05-25, 1982.

DINIZ, S.A. **Lesões genitais associadas à leishmaniose visceral e identificação *Leishmania* sp no sêmen de cães infectados naturalmente**. 2005. 39f. Dissertação (Mestrado m Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FEITOSA, M. M.et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 28, p. 36-42, 2000.

FERNANDES, R. W. Determinação dos valores líquidos normais de glicose, proteína, globulina, uréia creatina fosfoquinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), leucócitos e da coloração, turbidêz e coagulabilidade em cães sadios. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 209-216, 1990.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. *KIRK's Current Veterinary Therapy XI*, Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 266-270.

GÁRCIA-ALONSO, M. et al., Presence of antibodies in the aqueous humor and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infection in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite immunology**, Oxford, v. 18, p. 539-546, 1996.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S.; GOMES-NIETO, C.; MARTINEZ-GOMEZ, F. Aspectos clínicos de la leishmaniosis canina. **Revista Ibérica de Parasitología**, Granada, p. 61-66, 1987. Edição especial.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. **Old world canine leishmaniasis**: small animal practice, Philadelphia, v.15, n.7, p.949-959, 1993.

KOVALENKO, F. P.; LYSENKO, A. I. A.; LAVDOVSKAIA, M. V. The host-opportunistic protozoa system. The dissemination of *Leishmania infantum* infection in naturally susceptible laboratory animals subjected to drug-induced immunosuppression **Parazitologiya**, Leningrad, v.28, n.4, p. 293-297, July/Aug1994.

LIMA, V. M. F. et al. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 4, p. 485-489, 2003.

MARTINEZ-GARCIA, F. et al. Protozoan infections in the male genital tract. **Journal of Urology**, Baltimore, v.156, n. 2, p. 340-349, Aug. 1996.

MENDONÇA. I. L. **Avaliação do uso da eletroforese em acetato celulose como método auxiliar no diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 1997. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary immunopathology**, Amsterdam, v. 71, n. 3/4, p. 181-195, Nov. 1999.

POUL, J. Diagnostic de la leishmaniose canine par la recherche des *Leishmania* dans le mucus nasal et dans le testicule. **Archives Institute Pasteur Algery**, Alger, v. 27, p. 315-316, 1949.

PRASAD, L.S.N.; SEN, S. Migration of *Leishmania donovani* amastigotes in the cerebrospinal fluid. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 6, p. 652-654, 1996.

RAMOS, G. P.; RANGEL FILHO, F.B.; BOTELHO, G.P. Valores bioquímicos séricos de cães portadores de leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 5, p. 192-196, 1994.

RIBEIRO, V.M. Leishmaniose Visceral canina. Leishmune, **Manual Técnico**. 52p 2005.

ROSSAN, N. R.; STAUBER, A. L. The serum proteins of animals infected with *Leishmania donovani*. **Journal of Parasitology**, v. 45, n. 50, p. 50, 1959. Suplemento

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p.450-458.

SANTA ROSA, C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 2, n. 11, p. 24-28, nov/dez, 1997.

VIÑUELAS, J. et al. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.101, p. 23-27, 2001.

YKEDA, F. A. et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 8, n. 47, p. 42-48, set/out. 2003.

WHEELER, S.J.; SHARP, N.J. Anatomia funcional. In: _____. **Small animal spinal disorders**. São Paulo: Manole, 1999. p. 10

WORD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 77, n. 44, p. 365-372, 2002.

2- OBJETIVOS

2.1- GERAL

Avaliar a alteração testicular, epididimaria e do líquido cefalorraquidiano de cães (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes da Região Metropolitana do Recife.

2.2- ESPECÍFICOS

- Relatar a orquite e epididimite em cão infectado naturalmente com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.
- Detectar a presença de anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* no líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães naturalmente infectados.
- Avaliação das proteínas do líquido cefalorraquidiano e do soro de cães com diagnóstico positivo para LVC na Região Metropolitana do Recife.

CAPÍTULO 1

ORQUITE E EPIDIDIMITE EM CÃO COM INFECÇÃO NATURAL POR

Leishmania (Leishmania) chagasi (CUNHA & CHAGAS, 1937)

RELATO DE CASO

**ORQUITE E EPIDIDIMITE EM CÃO COM INFECÇÃO NATURAL POR
Leishmania (Leishmania) chagasi (CUNHA & CHAGAS, 1937)
RELATO DE CASO**

RESUMO

Leishmaniose visceral canina (LVC), é uma doença com envolvimento sistêmico em que o desenvolvimento da sintomatologia clínica de uma parcela dos cães infectados depende de sua competência imunológica. Contudo infecções por protozoários no trato genital masculino são raras. O objetivo deste trabalho foi relatar as alterações testiculares em um cão infectado naturalmente por *Leishmania chagasi* proveniente do município de Paulista-PE. Os resultados demonstraram a presença de epididimite multifocal e intersticial linfoplasmocitária discreta com ausência de espermatozoides. Com base nos resultados obtidos, sugere-se que cães com histórico de infertilidade proveniente de áreas endêmicas devem ser investigados para LVC.

**ORQUITIS AND EPIDIDIMITIS IN DOGS WITH NATURAL INFECTION BY
Leishmania (Leishmania) chagasi (CUNHA & CHAGAS, 1937)
CASE REPORT**

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a disease with systemic involvement, which depends on immunological response from the affected animals so that only part of infected dogs develops clinical illness. However, infections promoted by protozoan on genital system male are unusual. The aim of this work was to present the testicular alterations in a dog naturally infected by *Leishmania chagasi* deriving from Paulista-PE district. The results showed an evident multifocal epididimitis and lymphoplasmocytic interstitial with sperms absence at the lumen. Based on the results it is concluded that dogs with infertility precedent coming from endemic areas must be investigated for CVL.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os sinais sugestivos da leishmaniose visceral canina (LVC) ou calazar canino, se destacam as dermatopatias, que em geral estão presentes no focinho, nas orelhas e nas extremidades. Onicogribose, conjuntivite, febre irregular, apatia, epistaxe, emagrecimento, hepatoesplenomegalia, ascite, edema das extremidades e paresia dos posteriores (MARZOCHI et al., 1985; RAMOS et al., 1994) são outros sinais que têm sido relatados em cães provenientes de áreas endêmicas.

A LVC é considerada doença imunomediada com formação de imunocomplexos circulantes como conseqüência de vasculite, uveíte, glomerulonefrite e artrite (PINELLI et al., 1994). Porém pode ocorrer, na dependência da resposta imunológica, apenas uma parcela dos cães infectados desenvolve doença clínica (MARZOCHI et al. 1985; MORENO et al., 1999). Assim, os cães podem ser agrupados em três categorias: assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos, em função dos sinais clínicos apresentados (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997).

Após a infecção, ocorre multiplicação do parasito no sítio de inoculação, e se o hospedeiro não gerar uma resposta imune eficaz, há destruição dos macrófagos infectados, e desta forma a infecção é debelada. Do contrario, os parasitos disseminam-se na pele para posteriormente migrarem para diferentes órgãos e tecidos, tais como medula óssea, baço, fígado (LOSOS, 1986; STRAUSS e BANETH, 2001; FERRER, 2002; BRASIL, 2003), coração, pulmão, intestino e rins (MANGOUD et al. (1997); MANGOUD et al. (1998); KOVALENKO et al. (1994).

Infecções por protozoários no trato genital masculino são raras, no entanto, *Leishmania donovani* têm sido vinculada à disfunções testiculares no homem (MARTINEZ-GARCIA et al., 1996) e em hamster submetido a infecção experimental (KOVALENKO et al. 1994).

No que se refere a LVC, há relatos da presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp no testículo e epididimo em animais com infecção natural (POUL, 1949; DIAZ, 1982; DINIZ, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo descrever os achados histopatológicos da orquite e epididimite em cão com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

2. RELATO DO CASO

2.1 DESCRIÇÃO DO PACIENTE

Um cão, da raça Fila Brasileiro, macho, com idade de quatro anos, proveniente do município de Paulista, localizado no litoral norte do Estado de Pernambuco (Latitude 07°56'27" Sul e longitude 34° 52' 23" Oeste), foi encaminhado pelo médico veterinário ao hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, com a finalidade de realizar o exame sorológico para LVC. Durante o exame clínico o proprietário relatou que o animal era reprodutor e não fecundava nenhuma fêmea há mais de 12 meses, sendo então decidido a realização do exame andrológico.

2.2 EXAME CLÍNICO

O exame clínico constituiu, inicialmente, de anamnese com obtenção de dados referentes ao estado geral do animal, sexo, idade, porte, evolução do processo, local de procedência e possíveis condutas terapêuticas efetuadas anteriormente. O exame físico constituiu na avaliação do animal, para identificação de alterações orgânicas, observando-se a existência de sinais sugestivos de LVC.

2.3 EXAME PARASITOLÓGICO

O exame parasitológico foi realizado por biópsia de medula óssea na crista do osso externo, utilizando-se seringa¹ e agulha² descartáveis. Do material puncionado foram realizados esfregaços em lâminas de vidro para microscopia, fixados e corados pelo método de coloração rápida Panótico³ e examinados em microscópio óptico com objetiva de 100x no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco para pesquisa de *Leishmania L. chagasi*.

2.4 COLHEITA DE SANGUE PARA SOROLOGIA

¹ Seringa descartável de 20ml, Becton Dickson

² Agulha descartável de 40x12, Becton Dickson

³ solução Corante para Hematologia Panótico rápido-LB Laborclin

⁴ Seringa descartável de 5ml, Becton Dickson

⁵ Agulha descartável de 25x7, Becton Dickson

A amostra de sangue foi colhida por venopunção da veia cefálica, com seringa⁴ e agulha⁵ descartáveis. Ato contínuo, o material foi transferido para um tubo de ensaio estéril, para posterior obtenção do soro, que foi acondicionado em recipiente de vidro e armazenado a uma temperatura de -20°C .

2.5 EXAME ANDROLÓGICO

O exame constituiu-se palpação dos testículos e epidídimos objetivando avaliar tamanho, simetria e consistência. Em seguida foi procedida a colheita do sêmen para posterior análise, acompanhado do exame ultra-sonográfico com o aparelho Pie Medical dos testículos para avaliar a ecogenicidade do parênquima testicular do animal.

2.6 TESTE DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)

Foi utilizado Kit para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina ELISA - Biogene (Lote 003-1/04). O teste Elisa foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

2.7 EXAME ANATOMO-PATOLÓGICO

Após o diagnóstico sorológico positivo para LVC, o animal foi encaminhado pelo médico veterinário para eutanásia, seguindo a sugestão da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002). Após os procedimentos de eutanásia foi realizado o exame macroscópico e posterior coleta de fragmentos testiculares. Após a necropsia foi realizada punção da cauda do epidídimo direito com seringa⁴ e agulha⁵ descartáveis,

visando avaliar microscopicamente seu conteúdo, visto que a quantidade colhida anteriormente não foi suficiente para análise, em seguida foi retirado fragmentos do testículo direito e acondicionados em formalina tamponada 10%, sendo processada de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em parafina pela técnica da hematoxilina-eosina (H.E.) (LUNA, 1968) para posterior exame histopatológico.

3. DISCUSSÃO

Não foram evidenciadas formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* na biópsia de medula óssea. Contudo o resultado do teste sorológico evidenciou presença de anticorpos circulantes anti-*Leishmania (L.) chagasi*, apresentando densidade ótica (D O) de 0,210 (*Cut-off*= 0,127).

Segundo Sundar (2002), a razão para negatividade do teste parasitológico deve-se à sensibilidade da biópsia de medula óssea.

Com relação ao teste sorológico, a utilização do teste Elisa no diagnóstico da LVC tem sido apontada como teste seguro, notadamente quando se utiliza a porção carboxi-terminal da proteína recombinante HSP-70 de *Leishmania chagasi*, como antígeno para o ELISA, o qual tem demonstrado identificação específica e precoce da infecção em cães (ANDRADE et al., 1998)

No exame andrológico foi observado que os testículos direito e esquerdo apresentavam tamanho e consistência normais, porém no ato da palpação, a cauda do epidídimo do testículo direito encontrava-se mais consistente.

O exame ultra-sonográfico revelou que o parênquima testicular (direito e esquerdo), possuía média ecogenicidade. A estrutura morfológica dos testículos encontrava-se com aparência normal no que diz respeito à separação entre o compartimento intersticial e tubular. Todavia, a cauda do epidídimo direito apresentou aumento de ecogenicidade.

Microscopicamente, o conteúdo espermático apresentava-se com 24,35% de células normais, 62,61% de células com cauda de espermatozóide fortemente enrolada, 7,83% de caudas dobradas, além de 5,21% de cabeças destacadas (FIGURA 1).



Figura 1- Fotomicrografia da cauda do espermatozóide fortemente enrolada (seta esquerda) e cabeça destacada (seta direita). 40 X

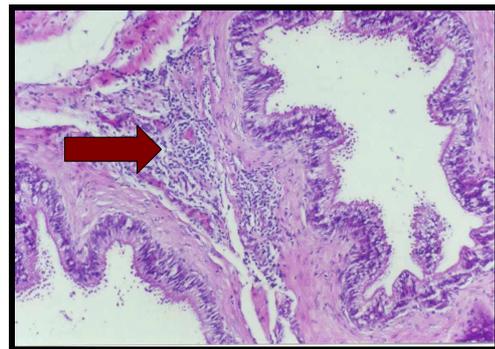


Figura 2- Fotomicrografia do infiltrado mononuclear linfoplasmocitário no intertúbulo. 40 X

Kristin (2003) afirma que cães com boa fertilidade não apresentam mais que 20% de espermatozoides anormais.

Ao exame histopatológico, do testículo direito, foi evidenciado discreto infiltrado mononuclear linfoplasmocitário no intertúbulo (FIGURA 2).

O processo degenerativo foi caracterizado pela redução na altura do epitélio, como também pela formação de aglomerados de células sinciciais em diferentes estágios de necrose e apoptose (FIGURA 3), corroborando com Diaz et al. (1982), que também evidenciaram infiltrado inflamatório e degeneração nos animais com LVC.

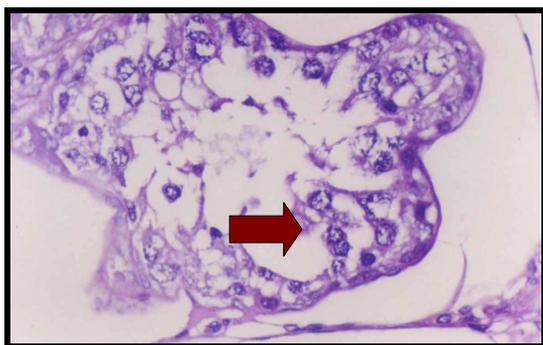


Figura 3- Fotomicrografia do processo degenerativo caracterizado pela redução do epitélio. 40 X

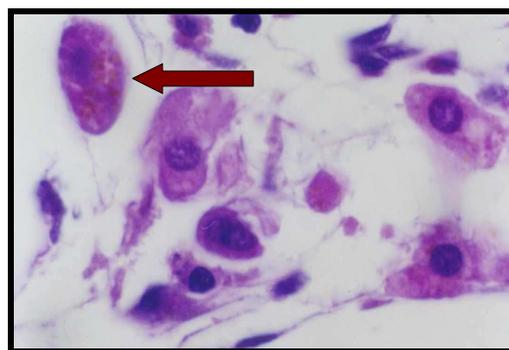


Figura 4- Fotomicrografia da célula de Leydig apresentando excesso de lipofuscina em seu interior. 100X

As células de Leydig possuíam excesso de lipofuscina, compatível com início de degeneração gordurosa (FIGURA 4). Ressalta-se ainda que foi observado epididimite multifocal e intersticial linfoplasmocitária discreta. O lúmen da calda do epididimo direito não possuía espermatozóides (FIGURA 5) e o epitélio limitante tinha característica normal apresentando infiltração linfocitária.

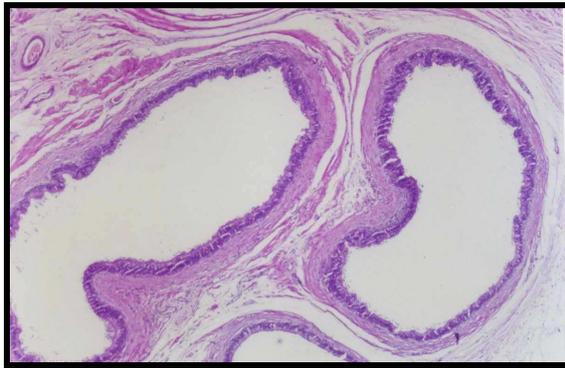


Figura 5- Fotomicrografia do lúmen da calda do epidídimo direito apresentando azospermia 10X

Estes achados são compatíveis com os observados por Gonzalez et al. (1983) que encontraram degeneração testicular crônica em hamsters infectados experimentalmente com *Leishmania donovani*, tendo observado atrofia testicular progressiva, com células espermatogênicas dos túbulos seminíferos com degeneração vacuolar e diminuição do número de espermatozoides, bem como, infiltrado linfoplasmocitário com macrófagos contendo *L. donovani* no espaço intertubular.

No estudo em questão, não foram evidenciadas formas amastigotas de *Leishmania* sp. em macrófagos no testículo, contrapondo com os achados de Poul, (1949), Diaz (1982) e Diniz (2005), que encontraram formas amastigotas em testículo e epididimo de cães infectados naturalmente.

Em virtude de ser um único caso, novos estudos deverão ser realizados para avaliar a frequência desses achados em animais com LVC.

Com base nos resultados encontrados sugere-se que cães com histórico de infertilidade proveniente de áreas endêmicas devem ser investigados para LVC.

4. REFERÊNCIAS

ANDRADE, P. P. et al. Assessment of a recombinant *Leishmania* HSP70 ELISA for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n.2, p. 217, 1998. Suplemento

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF. 2003. 120 p.

DIAZ, M. P.; ARRIBAS, J. L. G.; GARCIA, E. G. Lesiones testiculares y epididimarias em la leishmaniasis visceral canina, de presentyacion natural. **Higia Pecoris**, v. 4, n. 10, p. 05-25, 1982.

DINIZ, S. A. **Lesões genitais associadas à leishmaniose visceral e identificação *Leishmania* sp no sêmen de cães infectados naturalmente**. 2005. 39f. Dissertação (Mestrado m Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FERRER, L. Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In: WORD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27., 2002, Granada. **Anais eletrônico...** Granada, 2002. Disponível em: <<http://www.avepa.org/granada2002>>. Acesso em: 24 fev. 2005.

GONZALEZ, J. L. et al. Testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 12, n. 10, p. 412, Oct.1983.

KOVALENKO, F. P; LYSENKO, A. I. A.; LAVDOVSKAIA, M. V. The host-opportunistic protozoa system. The dissemination of *Leishmania infantum* infection in naturally susceptible laboratory animals subjected to drug-induced immunosuppression **Parazitologiya**, Leningrad, v.28, n.4, p. 293-297, July/Aug 1994.

KRISTIN, L. H. Sistema reprodutor. In: ROSE, E. R; DENNY, J. M. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003. cap. 11, p. 233-264

LOSOS, G. J. Infectious tropical diseases of domestic animals. **International Development Research Center**, Ottawa, 1986. 938 p.

LUNA, L. G. Routine staining procedures. In: LUNA, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1968. p. 72-240.

MANGOUD AM, RAMADAN ME, MORSY TA, et al. Histopathological studies of Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania d. infantum*. **Journal of Egyptian Society of Parasitology**, Cairo., v. 27, n. 3. p. 689-702, Dec. 1997.

MANGOUD AM, MORSY TA, RAMADAN ME, et al. The pathology of the heart and lung in Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania d. infantum* on top of pre-existing *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*, Cairo. v. 28, n. 2, p. 395-402, Aug. 1998.

MARTINEZ-GARCIA, F. et al. Protozoan infections in the male genital tract. **Journal of Urology**, v.156, n. 2, p. 340-349, Aug. 1996.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 432-446, out/dez.1985.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary immunopathology**, Amsterdam, v. 71, n. 3/4, p. 181-195, nov. 1999.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, Washington, v. 62, p. 229-235, 1994.

POUL.J. Diagnostic de la leishmaniose canine par la recherche des *Leishmania* dans le mucus nasal et dans le testicule. **Archives Institute Pasteur Algery**, Alger, v. 27, p. 315-316, 1949.

RAMOS, G. P.; RANGEL FILHO, F.B.; BOTELHO, G.P. Valores bioquímicos séricos de cães portadores de leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 5, p. 192-196, 1994.

SANTA ROSA, C.A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 2, n. 11, p. 24-28, nov/dez, 1997.

STRAUSS-AYALI, D.; BAENETH, G. Canine visceral leishmaniasis. In: CARMICHAEL, L. (Ed.). **Recent advances in canine infectious diseases**. New York: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: <http://www.ivis.org/sdvances/infect_DIS_Carmichael/banth/chapter_frm.asp>. Acesso em: 25 maio 2006.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington. v. 9, n. 5, p.951-958, 2002

WORD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 77, n. 44, p. 365-372, 2002.

CAPITULO 2

**ANTICORPOS ANTI-*Leishmania (Leishmania) chagasi*
(CUNHA & CHAGAS, 1937) EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE CÃES
(*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758) COM INFECÇÃO NATURAL**

**ANTICORPOS ANTI-*Leishmania (Leishmania) chagasi*
(CUNHA & CHAGAS, 1937) EM LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE CÃES
(*Canis familiaris*)(LINNAEUS, 1758) COM INFECCÃO NATURAL**

RESUMO

Apesar de o cérebro ser dotado de uma proteção imunológica, a presença de formas amastigotas tem sido relatada neste sitio em pacientes humanos e em animais infectados com *Leishmania donovani*. O objetivo deste trabalho foi relatar a presença de anticorpos anti- *Leishmania (Leishmania) chagasi* em cães infectados naturalmente. A presença dos mesmos no LCR pode sugerir a existência de lesão na barreira hematoencefálica.

**ANTI-*Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)
ANTIBODIES IN CEREBROSPINAL FLUID IN NATURALLY INFECTED
DOG**

ABSTRACT

Human and animal brains possess a great immunological protection, nonetheless, amastigots forms have been related under *Leishmania donovani* infection. The aim of this work was to present the existence of antibodies anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* in dogs naturally infected. The presence of these antibodies in Cerebrospinal Fluid (CSF) suggests that there is lesion on blood-brain barrier.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a leishmaniose visceral (LV) ou calazar, é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*, transmitido por insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* sp. tendo no ambiente silvestre as raposas e masurpias, como reservatórios e no meio urbano o cão (SANTA ROSA e OLIVEIRA., 1997; FEITOSA et al., 2000).

A infecção por *Leishmania* sp, usualmente causa doença sistêmica de evolução crônica, podendo manifestar-se de três meses a alguns anos após a infecção, e a sua gravidade depende da imunocompetência do hospedeiro vertebrado (FEITOSA et al., 2000).

Após a infecção, os parasitos disseminam-se na pele e posteriormente alcançam diferentes órgãos e tecidos, tais como medula óssea, baço, fígado, coração, pulmão, intestino e rins, (LOSOS, 1986; FERRER, 2002; MANGOUD et al 1997; KOVALENKO et al. 1994) causando uma doença sistêmica.

Apesar do tecido nervoso do SNC ser dotado de uma proteção imunológica privilegiada (ABREU-SILVA et al., 2003) a presença de formas amastigotas tem sido relatada em líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes humanos e em animais infectados com *Leishmania donovani* (PRASAD e SEN, 1996).

Alterações no LCR (LIMA et al., 2003) e a presença de processos inflamatórios no plexo coróide (NIETO et al, 1996) e meninges (PRASAD e SEN, 1996; VIÑUELAS et al. 2001) têm sido reportada em paciente humanos e cães com infecção natural por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, respectivamente.

Não obstante, Garcia-Alonso e colaboradores (1996) e Lima e colaboradores (2003) observaram a presença de imunoglobulinas da classe G (IgG) anti- *Leishmania sp* em LCR de cães com infecção natural.

O presente trabalho teve como objetivo detectar a presença de anticorpos anti- *Leishmania (L.) chagasi* em LCR de cães infectados naturalmente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 29 cães de raça, sexo e idades variadas procedentes da Região Metropolitana do Recife. A amostra foi escolhida por conveniência não probabilística, de acordo com Costa Neto (1977), no período de julho de 2004 a abril de 2005.

2.2 EXAME CLÍNICO

Inicialmente foi realizado anamnese, com obtenção de dados referentes ao estado geral, raça, sexo, idade, porte e evolução do processo bem como dados referentes ao proprietário e ao animal. O exame físico, para observação da existência ou não de sinais sugestivos de leishmaniose visceral canina, de acordo com Ferrer, e colaboradores (1999) e Ferrer (2002), constou principalmente da inspeção da pele e fâneros, além da palpação abdominal e dos gânglios linfáticos

2.3 COLHEITA DO MATERIAL DESTINADO AO EXAME PARASITOLÓGICO

2.3.1 BIOPSIA DE MEDULA ÓSSEA

A biópsia de medula óssea foi realizada por punção medular no manúbrio do osso externo, utilizando-se seringas¹ e agulhas² descartáveis. Do material puncionado foram realizados esfregaços que após secagem foram fixados, corados e examinados como foi descrito anteriormente.

2.4 COLHEITA DO MATERIAL DESTINADO AO TESTE SOROLÓGICO

De cada animal foram colhidos aproximadamente 10 mililitros (ml) de sangue por venopunção da veia cefálica, com seringa³ e agulha⁴ descartáveis. O material foi transferido para tubos estéreis sem anticoagulante para obtenção do soro, o qual foi acondicionado em tubos de polipropileno (Eppendorf) com capacidade para 1,5 ml.

2.5 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após os exames clínicos, sorológicos e parasitológicos, os animais foram divididos em grupos experimentais, a saber: Grupo Infectado (GI), formado por 21 animais atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE com sorologia positiva ao teste ELISA e/ou exame parasitológico positivo para *Leishmania (L) chagasi*, independente

¹ Seringa descartável de 20ml, Becton Dickson

² Agulha descartável de 40x12, Becton Dickson

³ Seringa descartável de 5ml, Becton Dickson

⁴ Agulha descartável de 25x7, Becton Dickson

⁵ Agulha descartável de 25x8, Becton Dickson

de sinais clínicos; e Grupo Controle (GC), formado por oito animais provenientes do Centro de Vigilância Ambiental da Cidade do Recife-PE, com sorologia negativa ao teste ELISA e exame parasitológico negativo para *Leishmania (l.) chagasi*, sem sinais clínicos da doença.

2.6 COLHEITA DO LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)

O LCR foi colhido segundo a técnica descrita por Wright (1978). Para tanto o animal foi colocado em decúbito lateral, com a cabeça formando um ângulo de 90° com a coluna cervical e o espaço entre a protuberância occipital e a ponta crânio dorsal da vértebra C2. A colheita foi realizada com auxílio de agulha⁵ estéril no espaço mediano. Após a visibilização do LCR no cabo da agulha, o mesmo foi colhido por gotejamento em tubos de polipropileno⁶ com capacidade para 1,5 ml.

2.7 TESTE SOROLÓGICO

Foi utilizado o kit EIE-Leishmaniose Canina Bio-Manguinhos para realização dos testes sorológicos tanto para o soro como para o LCR. As diluições utilizadas nos testes foram 1:100 e 1:2 com o Kit Elisa horseradish peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) (GARCIA-ALONSO et al.,1996) para o soro e LCR respectivamente. A leitura foi realizada em um leitor de ELISA com densidade óptica de 450 nanômetros, no Centro de Pesquisa Ageu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes sorológicos do LCR, com o kit EIE-Leishmaniose Canina Bio-Manguinhos, revelaram que 42,8% (9/21) dos animais do GI foram positivos para presença de anticorpo anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Estes resultados são inferiores aqueles observados por Garcia-Alonso e colaboradores (1996) e Lima e colaboradores (2003), que detectaram a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp em LCR de 61,5% e 46,6% dos cães com infecção natural respectivamente utilizando o kit Elisa Sigma.

A presença de anticorpos específicos em LCR de cães com LVC tem sido pouco descrita na literatura. Entretanto, sua presença sugere lesão ao nível da membrana semipermeável formada por endotélio vascular e células ependimais altas do plexo coróide que protegem o sistema nervoso central (SNC).

Abreu-Silva e colaboradores (2003) e Vries e colaboradores (1997), asseguram que vários patógenos podem atravessar a barreira hematoencefálica e causar lesões. Entre as possíveis vias de entrada no sistema nervoso central, Toumanen (1996) destaca a invasão direta dos patógenos nas células epiteliais, passagem dos microorganismos entre as células da referida barreira, ou ainda transporte através da barreira dentro de leucócitos infectados.

Vale salientar que dos animais do GI, 38% (8/21) foram positivos para presença de anticorpo anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi*, tanto no soro quanto no LCR, e

que 4,7% (1/21) foi positivo apenas no LCR. Contudo nenhum dos animais estudados apresentava sinais de envolvimento neurológico.

Furmaga-Jablosnka (1987) assegura que a presença de IgG no LCR pode ser resultante do aumento das Imunoglobulinas no soro ou produção local no LCR em estados patológicos.

A presença de anticorpos no LCR e ausência do soro de animais com infecção natural, pode estar relacionada a fatores ligados á exaustão da resposta imune, notadamente aqueles relacionados com linfócitos T e CD4, reações falso negativas também têm sido demonstradas (BRITO, 2004).

Por outro lado, sinais neurológicos não têm sido reportados com freqüência na literatura. Novos estudos deverão ser realizados para avaliar melhor a presença de anticorpos no LCR e sua repercussão em cães de áreas endêmicas.

4. CONCLUSÃO

A presença de anticorpos anti-*Leishmania (L) chagasi*, pode sugerir a existência de lesão na barreira hematoencefálica e/ou produção local no LCR.

5. REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K. S.; TEDESCO, R. C. et al. Central nervous system involvement in experimental infectio wiht *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, n.6, p. 661-665, 2003.

BRITO, F. L. C. **Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas, 1937)**. 2004. 862 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264p.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 28, p. 36-42, 2000.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick.R Canine leishmaniasis: an update. **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM**, Barcelona, p. 6-10, jan.1999.

FERRER, L. Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In: WORD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27., 2002, Granada. **Anais eletrônico...** Granada, 2002. Disponível em: <<http://www.avepa.org/granada2002>>. Acesso em: 24 fev. 2005.

FURMAGA-JABLONSKA W. IgG, IgM and IgA levels in the cerebrospinal fluid of children with congenital toxoplasmosis. **Pediatrics Polska**, Warszawa, v. 62, n. 7, p. 469-475, july. 1987.

GÁRCIA-ALONSO, M. et al., Presence of antibodies in the aqueous humor and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infection in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite immunology**, Oxford, v. 18, p. 539-546, 1996.

KOVALENKO, F. P.; LYSENKO, A. I. A.; LAVDOVSKAIA, M. V. The host-opportunistic protozoa system. The dissemination of *Leishmania infantum* infection in naturally susceptible laboratory animals subjected to drug-induced immunosuppression **Parazitologiya**, Leningrad, v.28, n.4, p. 293-297, july/aug 1994.

LIMA, V. M. F. et al. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 4, p. 485-489, 2003.

LOSOS, G. J. Infectious tropical diseases of domestic animals. **International Development Research Center**, Ottawa, 1986, 938 p.

MANGOUD AM, RAMADAN ME, MORSY TA, et al. Histopathological studies of Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania d. infantum*. **Journal of Egyptian Society of Parasitology**, Cairo., v. 27, n. 3. p. 689-702, Dec. 1997.

NIETO, C. G. et al., Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Veterinary Record**, Amsterdam, v. 139, p. 346-347, 1996.

PRASAD, L.S.N.; SEN, S. Migration of *Leishmania donovani* amastigotes in the cerebrospinal fluid. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 6, p. 652-654, 1996.

SANTA ROSA, C.A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Revista Clínica veterinária**, São Paulo, ano 2, n. 11, p. 24-28, nov/dez, 1997.

TOUMANEN, E. Entry of pathogens into the central nervous system. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.18, p. 289–299, 1996.

VIÑUELAS, J. et al. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.101, p. 23-27, 2001

VRIES, H. E. et al. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. **Pharmacology Reviews**, v. 49, p.143–155, 1997.

WRIGHT, J.A. Evaluation of cerebrospinal fluid in the dog. **Veterinary Record**, London, v. 103, n. 3, p. 48-51, 1978.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL DO SORO E DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR) DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL DO SORO E DO LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO (LCR) DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS
POR *Leishmania (Leishmania) chagasi***

RESUMO

O aumento de proteína plasmática total, vem sendo comumente observado na LVC, nesses casos a hiperglobulinemia seguido de hipoalbuminemia é relatada como conseqüência da produção de anticorpos e alterações renais e hepáticas. Com base na escassez de dados na literatura correlacionando as proteínas do soro e do líquido cefalorraquidiano em cães com calazar, este trabalho teve por objetivo mensurar a proteína total serica e do LCR de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. Após a mensuração da proteína sérica e líquórica dos animais infectados naturalmente, 85,7% (18/21) apresentaram hiperproteinemia, e 16,7% (3/21) apresentaram o nível de proteína elevado do LCR com médias de $8,34 \pm 1,07$ e $17,09 \pm 16,03$, respectivamente.

**EVALUATION OF SERIC AND CEREBROSPINAL FLUID PROTEINS IN
NATURALLY *Leishmania (Leishmania) chagasi* INFECTED DOG**

ABSTRACT

The increase of total plasmatic protein has been commonly observed in CVL. In these cases the hyperglobulinemia followed by hypoalbumunemia is alleged to be a consequence of the production of antibodies renal and hepatic alterations. Based on the scarce data correlating seric and cerebrospinal fluid proteins in dogs with kalazar disease, this work aimed to measure both, the total seric protein and CSF protein from dogs naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi*. Following sera and liquor protein measurement 85.7% (18/21) presented hyperproteinemia and 16.7% (3/21) presented increase of CFS protein level with means ranging from $8.34 \pm 1,07$ and 17.09 ± 16.03 , respectively.

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são compostos indispensáveis à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa orgânica como anticorpos (JAIN, 1993; KANEKO et al., 1989).

A maioria das proteínas são sintetizadas no fígado a partir de aminoácidos obtidos após a quebra e absorção intestinal (COLES, 1984; KERR, 2003).

Com relação às proteínas sericas, as globulinas e as albuminas são as principais frações, sendo as albuminas, responsáveis por cerca de 35 a 60% das proteínas séricas totais (COLES, 1984; BUSH et al., 2004).

Sendo assim, os valores normais da proteína sérica total e albumina em cães variam de 5,4 a 7,8 g/dl, e 2,5 a 40g/dl respectivamente (KANEKO et al., 1989; KERR, 2003; BUSH, 2004).

Com relação às globulinas, são produzidas pelos plasmócitos em resposta à estimulação antigênica, com sua concentração variando de 2,5 a 4,5g/dl, (COLES, 1984; BUSH, 2004).

No que concerne à proteína total presente no líquido cefalorraquidiano (LCR) sua concentração varia de 10 a 40mg/dl (COLES, 1984; FERNANDES, 1990; CHRISMAN, 1992; BRAUND, 1994; MEINKOTH e CRYSTAL, 1998). Contudo, De Lahunta (1983) assegura que a maior parte da proteína é composta de albumina.

Estudos envolvendo alteração do perfil eletroforético e a infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* têm sido reportada por Rey (2001), observando hipergamaglobulinemia e alteração na relação albumina/globulina.

Em cães, Medonça (1997) observou que o nível de gamaglobulina mostrou-se elevado com diminuição dos valores de albumina nos animais com infecção natural por *Leishmania* sp.

Por outro lado, Lima e colaboradores (2003) relataram a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em LCR de animais positivos para LVC com conseqüente alterações do líquido cefalorraquidiano (LCR).

Devido à escassez de dados na literatura correlacionando leishmaniose e alterações no LCR, este trabalho teve como objetivo, mensurar a proteína total sérica e liquorica de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 21 cães de raça, sexo e idades variados, positivos ao teste ELISA e/ou exame parasitológico positivo para *Leishmania (L.) chagasi*, independente de sinais clínicos sugestivos da doença, denominados de Grupo Infectado (GI), procedente da Região Metropolitana do Recife, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco e o Grupo Controle (GC), formado por oito animais provenientes do Centro de Vigilância Ambiental da Cidade do Recife-PE, com sorologia negativa ao teste ELISA e exame parasitológico negativo para *Leishmania (L.) chagasi*, e

sem sinais clínicos da doença. A amostragem utilizada foi por conveniência não probabilística, de acordo com Costa Neto (1977).

2.2 COLHEITA DO SORO

Foram colhidos aproximadamente 10 ml de sangue através da venopunção da veia cefálica, com seringa¹ e agulha² descartáveis e transferidos imediatamente para tubos de ensaio estéreis, sem anticoagulante, e mantidos inclinados até a completa retração do coágulo para obtenção do soro, o qual foi transferido para tubos de polipropileno armazenado à temperatura de -20°C .

2.3 COLHEITA DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)

O LCR foi colhido segundo a técnica descrita por Wright (1978). Para tanto o animal foi colocado em decúbito lateral, com a cabeça formando um ângulo de 90° com a coluna cervical e o espaço entre a protuberância occipital e a ponta crânio dorsal da vértebra C2. A colheita foi realizada com auxílio de agulha³ estéril no espaço mediano. Após a visibilização do LCR no cabo da agulha, o mesmo foi colhido por gotejamento em tubos de polipropileno⁶ com capacidade para 1,5 ml.

2.4 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL E ALBUMINA NO SORO E PROTEÍNA NO LCR

A mensuração da proteína total sérica e da albumina foi realizada através de Kits comerciais⁴ utilizando a metodologia calorimétrica. A leitura foi realizada em espectrofotômetro digital² em densidade óptica de 450.

A determinação da proteína total do LCR foi realizada pela técnica do ácido sulfossalicílico 3% e padrões de proteína com concentração de 20mg/dl, 40mg/dl e 80mg/dl, de acordo com Sarmento e colaboradores (2002). A leitura foi realizada no mesmo aparelho citado anteriormente, em densidade óptica de 420.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados foram utilizados os testes t-Student para as variáveis proteínas sérica, albumina, globulina e a relação A:G, precedidas do teste de normalidade, bem como o teste não paramétrico de Mann-Whitney para avaliar as alterações da proteína líquórica. O nível de significância utilizado nas decisões dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados em planilha Excel e o

¹ Seringa descartável de 20ml, Becton Dickson

² Agulha descartável de 40x12, Becton Dickson

³ Agulha descartável de 25 x8, Becton Dickson

⁴ Kit para dosagem de Proteína Total e Albumina, Doles

⁵ Spectro UV-VISRS

programa utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi Minitab Release 14,1
Estatistical Software.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se os dados referentes às dosagens séricas de proteína total, albumina e globulinas (Tabela 1), constatou-se que o valor médio da proteína total e das globulinas nos animais do GI, encontram-se acima dos valores referenciais de Bush (2004). Contudo os valores relativos à albumina e a relação Albumina:Globulina (A:G) estava abaixo daqueles referenciais.

Tabela 1-Média e desvio padrão dos níveis séricos em g/dl de proteína total, albumina, globulina e da relação A: G no soro dos animais do GI e do GC. Recife, 2006

VARIÁVEIS	GI	GC	VALORES REFERÊNCIAIS*
Proteína total	8,34 ± 1,07	5,91 ± 1,82	5,5-7,5 g/dL
Albumina	1,69 ± 0,41	1,53 ± 0,31	2,5-4,0 g /dL
Globulina	6,65 ± 1,26	4,38 ± 1,84	2,5-4,5 g /dL
Relação A:G	4,26 ± 1,60	2,98 ± 1,54	0,5-1,3 g /dL

* Bush (2004)

Os valores para proteínas totais, albumina, alfa, beta e gamaglobulinas em cães adultos saudáveis já estão bem caracterizados (BARSANTI et al., 1977; KEAY, 1982; HARRUS, 1996), para várias enfermidades infecciosas e parasitárias no cão, incluindo a LVC (MENDONÇA, 1997).

Contudo a sua variação pode ser decorrente da idade, estado nutricional e fisiológico, gestação, lactação, perda de líquidos, além dos processos infecciosos (KANEKO, 1989)

Segundo Bush (2004), o aumento da proteína total está relacionado a vários fatores como desidratação, concentração aumentada de globulinas, devido à inflamação aguda, subaguda ou crônica, doenças hepáticas e/ou renais, distúrbio auto-ímmunes, doenças virais, além de infecções por fungos e protozoários.

Sendo assim a hiperproteinemia aqui encontrada pode ser resultante da hiperglobulinemia, devido a uma ativação policlonal de células B e a produção de anticorpos (FERRER, 1992; LOPES et al., 1996; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999).

Desta forma fica claro que os valores aumentados das globulinas aqui encontrados são resultantes da resposta na atividade das células T, particularmente os linfócitos T auxiliar 2 (Th2) que elicitam a imunidade humoral (BIAZZONO, 2003).

Os dados de hiperproteinemia e hiperglobulinemia aqui encontrada são concordantes com os achados de Ferrer (1992), Ciaramella e colaboradores (1997) e Koutinas e colaboradores (1999), que observaram a hiperproteinemia por

hiperglobulinemia em animais com LVC, particularmente nos estágios finais da doença. (HERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 1987; RAMOS et al., 1994)

Com relação à diminuição de albumina aqui observada, deve-se levar em consideração que em virtude da lesão hepática, devido à disseminação dos parasitos no fígado na LVC, possa ocorrer redução na sua produção, o que reflete diretamente nos índices sericos.

Vale a pena lembrar que a determinação da proteína sérica total ou albumina isolada, podem refletir em um achado clínico sem muito valor, em virtude de que a alteração de uma das frações pode refletir diretamente no aumento ou diminuição de outra fração, como observado por Mendonça (1997) na LVC.

Entretanto, a diminuição desta proteína ocorreu tanto no grupo infectado quanto no controle. Outros fatores relacionados com perdas renais e diminuição na ingestão protéica devem ser levados em consideração para o entendimento melhor dessas alterações.

Com base nos resultados da relação albumina/globulina (A/G), pôde-se constatar uma diminuição da relação A:G.

A avaliação da relação albumina/globulina auxilia na orientação diagnóstica, nos quadros de aumento das imunoglobulinas, como na gamopatia observada por Font e colaboradores (1994) no calazar canino.

Analisando-se os dados referentes às dosagens de proteína total no LCR constatou-se que o valor médio da proteína total líquórica nos animais do GI, encontra-se acima, enquanto que no GC estavam abaixo dos valores referenciados por Meinkoth

e Crystal (1998) que é 10 a 25 mg/dL, apresentando médias $17,09 \pm 16,03$ e $1,92 \pm 0,38$, respectivamente.

Analisando-se individualmente as proteínas líquóricas do GI, observou-se que 37,5% (9/21) estavam abaixo do normal, sem significado clínico-patológico, 45,83% (9/21) estavam dentro da normalidade, porém, 16,7% (3/21) apresentaram concentrações acima do considerado normal, o que sugere alteração na permeabilidade da barreira hemato-encefálica do plexo coróide (LAHUNTA, 1983; DUNKAN, 1987).

A análise estatística revelou não existir diferença significativa ($p > 0,05$) nos níveis protéicos do soro e do LCR tanto nos animais do GI, como nos do GC.

Segundo Gerber e colaboradores (1994), a concentração de proteínas do LCR é definida pela interação entre o fluxo molecular e o fluxo do LCR, e o nível normal de proteína no LCR aumenta do espaço ventricular para o lombar. O transporte difusão-dependente de proteínas do cérebro para o LCR e do sangue para o LCR segue as leis da difusão de acordo com o tamanho da molécula, o que é a causa da seletividade da função das barreiras hemato-encefálica (BHE) e hemato-liquórica (BHL), as quais representam interface entre o sistema vascular e o compartimento extracelular do sistema nervoso central (SNC), o sistema vascular e o espaço do LCR, respectivamente.

Segundo, García-Alonso e colaboradores (1996) e Nieto e colaboradores (1996), a ação dos antígenos de *Leishmania* sp e imunoglobulinas no plexo coróide, pode gerar como consequência uma reação inflamatória no local.

Sperhacker e colaboradores (2004) citam que, nas infecções agudas, os leucócitos migram para o LCR e para o tecido nervoso, as BHE e BHL se tornam permeáveis para

albumina e outras grandes moléculas, como consequência pode aumentar a resistência de saída do fluxo do LCR no espaço subaracnóideo, tendendo a diminuir o fluxo do LCR e aumentar a concentração protéica do LCR.

Vale salientar ainda que nos animais do GC a concentração protéica esteve abaixo daqueles valores referenciais.

É importante lembrar que ocorre variação da concentração protéica de acordo com o local da punção (GAMA et al., 2005), assim como na dependência da idade e estado patológico (SPERHACKE et al., 2004).

4. CONCLUSÕES

A determinação da proteína sérica de cães com infecção natural por *Leishmania (L.) chagasi* deve ser cuidadosamente avaliada, levando-se em consideração os problemas renais além da diminuição na ingestão protéica.

Nos cães com infecção natural por *Leishmania (L.) chagasi*, a elevação da proteína líquórica pode ser decorrente da alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica, ou do aumento na síntese de imunoglobulina intratecal.

5. REFERÊNCIAS

BARSANTI, J.A. et al. Analysis of serum proteins, using agarose electrophoresis in normal dogs and in dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago v.38, n.7, p.1055-1058, 1977.

BIAZZONO, L. **Avaliação da reação de hipersensibilidade tardia à leishmania e das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 em cães de região endêmica para leishmaniose visceral**. 2003. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

BRAUND, K. G. Diagnostic techniques. In: _____. **Clinical syndromes in veterinary neurology**. Santa Louis: Mosby, 1994. p. 333-421.

BUSH, B. M. Nutrientes e metabólitos In: _____. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. cap. 5, p. 180-183.

CHRISMAN, C. L. Cerebrospinal fluid analysis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, 1992. v. 22, p. 781-810.

CIARAMELLA, P. et al., A retrospective clinical study of canine leishmaniosis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, London, v. 141, n. 21, p. 539-543, Nov. 1997.

COLES, E. H. Fluido cerebrospinal. In: _____. **Patologia clínica veterinária**, 3. ed. Rio de Janeiro: Manole, 1984. p. 367-381.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264p.

De LAHUNTA, A. **Veterinary neuroanatomy and clinical neurology**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1983. 261p.

DUNCAN, J. R. et al. Laboratory examinations. In: OLIVER, J.E.; HOERLEIN, B.F. MAYHEW, I.G. **Veterinary Neurology**, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1987, p. 57-64.

FERNANDES, R. W. Determinação dos valores líquóricos normais de glicose, proteína, globulina, uréia creatina fosfoquinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), leucócitos e da coloração, turbidêz e coagulabilidade em cães sadios. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 209-216, 1990.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **KIRK's Current Veterinary Therapy** 11., Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 266-270.

FONT A; CLOSA, J. M.; MASCORT, J. Monoclonal gammopathy in a dog with visceral leishmaniasis. **Journal of Veterinary International Medicine**, Lawrence, v. 8, n. 3, p. 233-235, May/Jun. 1994.

GAMA, F. G. V. et al. Caracteres físico-químicos e citológicos do liquor de cães em diferentes fases da cinomose. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.35, n.3, p. 596-601 May/June 2005.

GÁRCIA-ALONSO, M. et al. Presence of antibodies in the aqueous humor and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infection in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite immunology**, Oxford, v. 18, p. 539-546, 1996.

GERBER J. et al.. Lumbar and ventricular CSF protein, leukocytes, and lactate in suspected bacterial CNS infections. **Neurology**, Paris, v. 5, p. 1710-1714, 1998.

HARRUS, S. et al. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.66, p.241-249, 1996

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S.; GOMES-NIETO, C.; MARTINEZ-GOMES, F. Aspectos clínicos de la leishmnaiosis canina. **Revista Ibérica de Parasitologia**, Granada, v. Extraordinário, p. 61-66, 1987.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.349-380.

KANEKO, J.J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. New York: Academic, 1989. p 932.

KEAY, G. Serum protein values from clinically normal cats and dogs determined by agarose gel electrophoresis. **Research in Veterinary Science**, London, v.33, n.3, p.343-346, 1982.

KERR, M. G. Proteínas plasmáticas. Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003. cap. 4, p. 87.

KOUTINAS, A. F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniosis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakenwood, v. 35, n. 5, p. 376-383, Sept./Out. 1999.

LOPES, S. T. A. et al. Patologia clínica veterinária. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1996. 172 p. Apostila.

LIMA, V. M. F. et al. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 4, p. 485-489, 2003.

MEINKOTH, J. H.; CRYSTAL, M. A. Cerebrospinal fluid analysis In: COWELL, R. L. et al. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and the Cat**. 2. ed. Saint Louis; Mosby, 1998. p. 41-125.

MENDONÇA, I. L. **Avaliação do uso da eletroforese em acetato celulose como método auxiliar no diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 1997. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

NIETO, C. G. et al. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Veterinary Record**, Amsterdam, v. 139, p. 346-347, 1996.

RAMOS, G. P.; RANGEL FILHO, F.B.; BOTELHO, G.P. Valores bioquímicos séricos de cães portadores de leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 5, p. 192-196, 1994

REY, L. Parasitologia. 3. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. cap. 19, p.253-256.

SARMENTO, L. V. C. et al. Mielografia de cães sadios com o meio de contraste ioversol. Resultados liquóricos e anátomo- histopatológico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 427-432, 2002

SPERHACKE, R. D. et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, Paris, v. 8, p.312-317, 2004

6. CONCLUSÕES GERAIS

1- Com base nos resultados encontrados sugere-se que cães com histórico de infertilidade proveniente de áreas endêmicas devem ser investigados para LVC.

2- A presença de anticorpos anti-*Leishmania (L) chagasi*, pode sugerir a existência de lesão na barreira hematoencefálica e/ou produção local no LCR

3- A determinação da proteína sérica de cães com infecção natural por *Leishmania (L) chagasi* deve ser cuidadosamente avaliada, levando-se em consideração os problemas renais além da diminuição na ingestão protéica.

4- Nos cães com infecção natural por *Leishmania (L) chagasi*, a elevação da proteína liquorica pode ser decorrente da alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica, ou do aumento na síntese de imunoglobulina intratecal.

7- REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K. S.; TEDESCO, R. C. et al. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, n.6, p. 661-665, 2003.

ANDRADE, P. P. et al. Assessment of a recombinant *Leishmania* HSP70 ELISA for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n.2, p. 217, 1998. Suplemento

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquérito epidemiológico: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 20, n. 1, p. 259-265, jan/fev, 2004

ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose visceral canina. **Manual da Schering-Plough**, 2005, 14p.

BARROUIN-MELO, Stella Maria et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal**, London, v. 171, n. 2, p.331-339, 2006.

BARSANTI, J.A. et al. Analysis of serum proteins, using agarose electrophoresis in normal dogs and in dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago v.38, n.7, p.1055-1058, 1977.

BIAZZONO, L. **Avaliação da reação de hipersensibilidade tardia à leishmania e das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 em cães de região endêmica para leishmaniose visceral**. 2003. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

BRASIL. MINISTÈRIO DA SAUDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2003. 120p.

BRASIL. MINISTÈRIO DA SAUDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2004. 120p.

BRAUND, K. G. Diagnostic techniques. In: _____. **Clinical syndromes in veterinary neurology**. Santa Louis: Mosby, 1994. p. 333-421.

BRITO, F. L. C. **Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas, 1937)**. 2004. 862 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BUSH, B. M. Nutrientes e metabólitos In: _____. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. cap. 5, p. 180-183.

CABELLO,I.; CARABALLO,A.; MILLÁN,Y. Leishmaniasis in the genital area. **Revista do Instituto Tropical de São Paulo**,v.44,n.2, p. 105-107, 2002.

CASTRO, C.A.; HIDALGO, H.H; SOLANO,A.E.;COTO,C.F. Leishmaniasis of the genital organs. **Medicine Cutan Ibero Latin American**, v.15,p.145-150, 1987.

CIARAMELLA, P. et al., A retrospective clinical study of canine leishmaniosis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, London, v. 141, n. 21, p. 539-543, Nov. 1997.

CHRISMAN, C. L. Cerebrospinal fluid analysis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, 1992. v. 22, p. 781-810.

COLES, E. H. Fluido cerebrospinal. **Patologia clínica veterinária**, 3. ed. Rio de Janeiro: Manole, 1984. p. 367-381.

CORNELIUS, C.D. Canine cerebrospinal fluid. **California Veterinarian**, San Francisco, v. 12, n. 2, p. 18-20, 1958.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264p.

De LAHUNTA, A. **Veterinary neuroanatomy and clinical neurology**. 2. ed.
Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1983. 261p.

DENEROLLE, P H. Leishmaniose canine: difficultes du diagnostic et du traitement
(125 cas). **Pratique Medicale et Chirurgicale de L'animal de Compagnie**, Paris, v.
31, n. 2, p.137-145, 1996.

DIAZ, M. P.; ARRIBAS, J. L. G.; GARCIA, E. G. Lesiones testiculares y epididimarias
em la leishmaniasis visceral canina, de presentyacion natural. **Higia Pecoris**, v. 4, n. 10,
p. 05-25, 1982.

DINIZ, S.A. **Lesões genitais associadas à leishmaniose visceral e identificação
Leishmania sp no sêmen de cães infectados naturalmente**. 2005. 39f. Dissertação
(Mestrado m Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
Horizonte.

DUNCAN, J. R. et al. Laboratory examinations. In: OLIVER, J.E.; HOERLEIN, B.F.
MAYHEW, I.G. **Veterinary Neurology**, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1987,
p. 57-64.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 28, p. 36-42, 2000.

FERNANDES, R. W. Determinação dos valores líquidos normais de glicose, proteína, globulina, uréia creatina fosfoquinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), leucócitos e da coloração, turbidêz e coagulabilidade em cães sadios. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 209-216, 1990.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **KIRK's Current Veterinary Therapy XI**, Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 266-270.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick.R **Canine leishmaniasis: an update. PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM**, Barcelona, p. 6-10, jan.1999.

FERRER, L. Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In: **WORD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS**, 27., 2002, Granada. **Anais eletrônico...** Granada, 2002. Disponível em: <<http://www.avepa.org/granada2002>>. Acesso em: 24 fev. 2005.

FONT A; CLOSA, J. M.; MASCORT, J. Monoclonal gammopathy in a dog with visceral leishmaniasis. **Journal of Veterinary International Medicine**, Lawrence, v. 8, n. 3, p. 233-235, May/Jun. 1994.

FURMAGA-JABLONSKA W. IgG, IgM and IgA levels in the cerebrospinal fluid of children with congenital toxoplasmosis. **Pediatrics Polska**, Warszawa, v. 62, n. 7, p. 469-475, july. 1987.

GAMA, F. G. V. et al. Caracteres físico-químicos e citológicos do liquor de cães em diferentes fases da cinomose. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.35, n.3, p. 596-601 May/June 2005.

GÁRCIA-ALONSO, M. et al., Presence of antibodies in the aqueous humor and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infection in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite immunology**, Oxford, v. 18, p. 539-546, 1996.

GERBER J. et al.. Lumbar and ventricular CSF protein, leukocytes, and lactate in suspected bacterial CNS infections. **Neurology**, Paris, v. 5, p. 1710-1714, 1998.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZALEZ, J. L. et al. Testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 12, n. 10, p. 412, Oct.1983.

HARRUS, S. et al. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.66, p.241-249, 1996

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S.; GOMES-NIETO, C.; MARTINEZ-GOMEZ, F.
Aspectos clínicos de la leishmaniosis canina. **Revista Ibérica de Parasitología**,
Granada, p. 61-66, 1987. Edição especial.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
p.349-380.

KANEKO, J.J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. New York:
Academic, 1989. p 932.

KEAY, G. Serum protein values from clinically normal cats and dogs determined by
agarose gel electrophoresis. **Research in Veterinary Science**, London, v.33, n.3, p.343-
346, 1982.

KERR, M. G. Proteínas plasmáticas. Exames laboratoriais em medicina veterinária:
bioquímica clínica e hematologia. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003. cap. 4, p. 87.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. **Old world canine leishmaniasis**: small animal practice, Philadelphia, v.15, n.7, p.949-959, 1993.

KOUTINAS, A. F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniosis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakenwood, v. 35, n. 5, p. 376-383, Sept./Out. 1999.

KOVALENKO, F. P; LYSENKO, A. I. A.; LAVDOVSKAIA, M. V. The host-opportunistic protozoa system. The dissemination of *Leishmania infantum* infection in naturally susceptible laboratory animals subjected to drug-induced immunosuppression **Parazitologiya**, Leningrad, v.28, n.4, p. 293-297, July/Aug1994.

KRISTIN, L. H. Sistema reprodutor. In: ROSE, E. R; DENNY, J. M. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003. cap. 11, p. 233-264

LIMA, V. M. F. et al. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 4, p. 485-489, 2003.

LOPES, S. T. A. et al. Patologia clínica veterinária. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1996. 172 p. Apostila.

LOSOS, G. J. Infectious tropical diseases of domestic animals. **International Development Research Center**, Ottawa, 1986. 938 p.

LUNA, L. G. Routine staining procedures. In: LUNA, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1968. p. 72-240.

MANGOUD AM, RAMADAN ME, MORSY TA, et al. Histopathological studies of Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania d. infantum*. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*, Cairo., v. 27, n. 3. p. 689-702, Dec. 1997.

MANGOUD AM, MORSY TA, RAMADAN ME, et al. The pathology of the heart and lung in Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania d. infantum* on top of pre-existing *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*, Cairo.v. 28, n. 2, p. 395-402, Aug. 1998.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 432-446, out/dez.1985.

MARTINEZ-GARCIA, F. et al. Protozoan infections in the male genital tract. **Journal of Urology**, Baltimore, v.156, n. 2, p. 340-349, Aug. 1996.

MEINKOTH, J. H.; CRYSTAL, M. A. Cerebrospinal fluid analysis In: COWELL, R. L. et al. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and the Cat**. 2. ed. Saint Louis; Mosby, 1998. p. 41-125.

MENDONÇA, I. L. **Avaliação do uso da eletroforese em acetato celulose como método auxiliar no diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 1997. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary immunopathology**, Amsterdam, v. 71, n. 3/4, p. 181-195, Nov. 1999.

NIETO, C. G. et al. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Veterinary Record**, Amsterdam, v. 139, p. 346-347, 1996.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, Washington, v. 62, p. 229-235, 1994.

POUL, J. Diagnostic de la leishmaniose canine par la recherche des *Leishmania* dans le mucus nasal et dans le testicule. **Archives Institute Pasteur Algery**, Alger, v. 27, p. 315-316, 1949.

PRASAD, L.S.N.; SEN, S. Migration of *Leishmania donovani* amastigotes in the cerebrospinal fluid. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 6, p. 652-654, 1996.

RAMOS, G. P.; RANGEL FILHO, F.B.; BOTELHO, G.P. Valores bioquímicos séricos de cães portadores de leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 5, p. 192-196, 1994.

REY, L. Parasitologia. 3. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. cap. 19, p.253-256.

RIBEIRO, V.M. Leishmaniose Visceral canina. Leishmune, **Manual Técnico**. 52p 2005.

ROSSAN, N. R.; STAUBER, A. L. The serum proteins of animals infected with *Leishmania donovani*. **Journal of Parasitology**, v. 45, n. 50, p. 50, 1959. Suplemento

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p.450-458.

SANTA ROSA, C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 2, n. 11, p. 24-28, nov/dez, 1997.

SARMENTO, L. V. C. et al. Mielografia de cães sadios com o meio de contraste ioversol. Resultados liquóricos e anátomo- histopatológico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 427-432, 2002

SPERHACKE, R. D. et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, Paris, v. 8, p.312-317, 2004

STRAUSS-AYALI, D.; BAENETH, G. Canine visceral leishmaniasis. In: CARMICHAEL, L. (Ed.). **Recent advances in canine infectious diseases**. New York: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: <http://www.ivis.org/sdvances/infect_DIS_Carmichael/banth/chapter_frm.asp>. Acesso em: 25 maio 2006.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington. v. 9, n. 5, p.951-958, 2002.

TOUMANEN, E. Entry of pathogens into the central nervous system. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.18, p. 289–299, 1996.

VIÑUELAS, J. et al. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.101, p. 23-27, 2001

VRIES, H. E. et al. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. **Pharmacology Reviews**, v. 49, p.143–155, 1997.

WHEELER, S.J.; SHARP, N.J. Anatomia funcional. In: _____. **Small animal spinal disorders**. São Paulo: Manole, 1999. p. 10

WORD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 77, n. 44, p. 365-372, 2002.

YKEDA, F. A. et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 8, n. 47, p. 42-48, set/out. 2003.

ANEXOS

AMBULATÓRIO DE LEISHMANIOSE

Data: ___/___/___ Horário: _____ Responsável: _____

1. FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

Nome do proprietário: _____
Nome do animal: _____ Idade: _____ Sexo: ()F ()M
Raça: _____ Pelagem: ()curta ()média ()longa
Porte: ()pequeno ()médio ()grande Cor: ()branca ()preta ()marrom ()dourada ()cinza
Procedência: _____ Viagens: ()sim ()não _____
Endereço: _____
Bairro: _____ Fone: _____
Médico Veterinário Responsável: _____ Fone: _____

2. AVALIAÇÃO DO ANIMAL

Início da sintomatologia: _____
Vermifugado: ()sim ()não
Apetite normal: ()sim ()não
Perda de peso: ()sim ()não
Oftalmologia presente: ()sim ()não
Micção normal: ()sim ()não
Epistaxe: ()sim ()não
Problema articular: ()sim ()não
Aumento de linfonodo: ()sim ()não
Grifose: ()sim ()não
Úlcera cutânea: ()sim ()não

3. MATERIAL COLETADO

Punção de medula: ()sim ()não
Eternal: () () Ilíaca
Raspado/pele íntegra: ()sim ()não
Raspado/pele lesionada: ()sim ()não
Soro: ()sim ()não
Plasma: ()sim ()não

4. DADOS SOBRE O VETOR

Presença de mosquito: ()sim ()não

5. RESULTADO

Parasitológico de medula: ()+ ()--
Eternal: ()+ ()-- Ilíaca: ()+ ()--
Parasitológico/pele íntegra: ()+ ()--
Parasitológico/pele lesionada ()+ ()--
Sorologia/ELISA: ()+ ()--

6. LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES

Anexo 2 - Valores Protéicos do Grupo Controle (GC)

AMOSTRA			VALORES DE REFERÊNCIA					ELISA-LCR
			*5,7-7,7 (g/dl)	*2,0-4,0 (g/dl)	*2,0-4,5 (g/dl)	*0,5-1,3 (g/dl)	**10-25 (mg/dl)	
ANIMAL	PARASIT	ELISA-SORO	PT-SORO	ALBUMINA	GLOBULINA	Rel. A:G	PT-LCR	ELISA-LCR
C5	negativo	negativo	6,429	1,349	5,08	3,766	1,74	negativo
C6	negativo	negativo	6,674	1,911	4,763	2,492	1,66	negativo
C7	negativo	negativo	8,392	1,542	6,85	4,442	2,42	negativo
C8	negativo	negativo	5,889	1,477	4,412	2,987	2,04	negativo
C9	negativo	negativo	3,1	1,365	1,735	1,271	1,51	negativo
C10	negativo	negativo	7,68	1,156	6,524	5,644	2,57	negativo
M			5,919	1,536	4,383	2,983	1,928	
DP			1,829	0,316	1,843	1,542	0,382	
			BAIXO	NORMAL	ALTO			

* Bush (2004)

**Meinkoth e Crystal (1998)

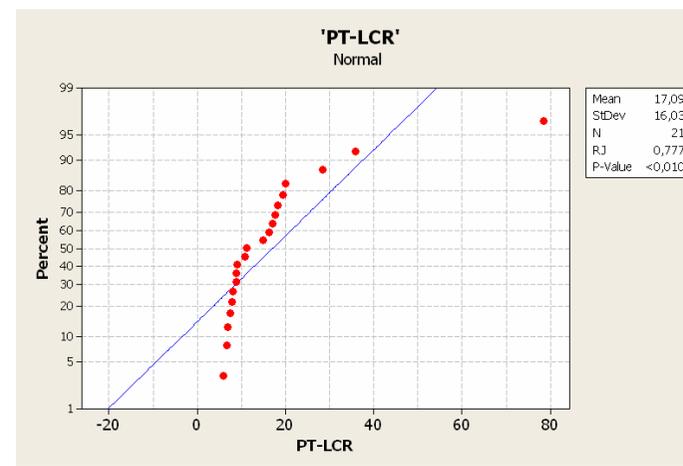
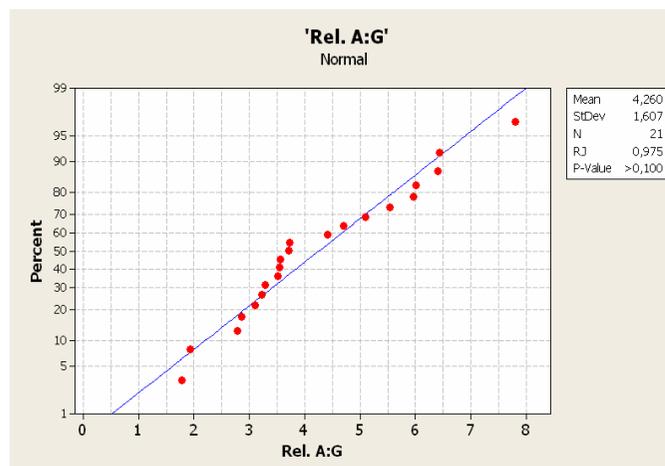
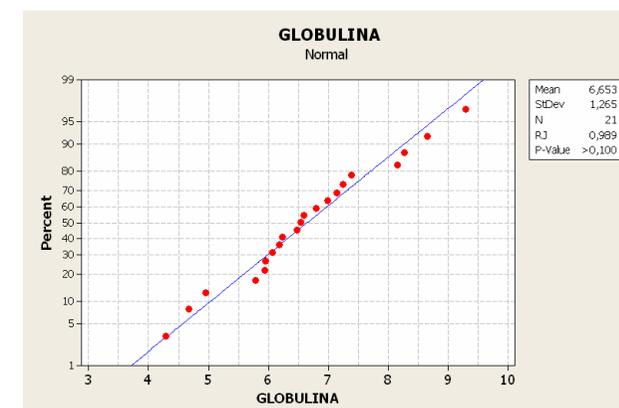
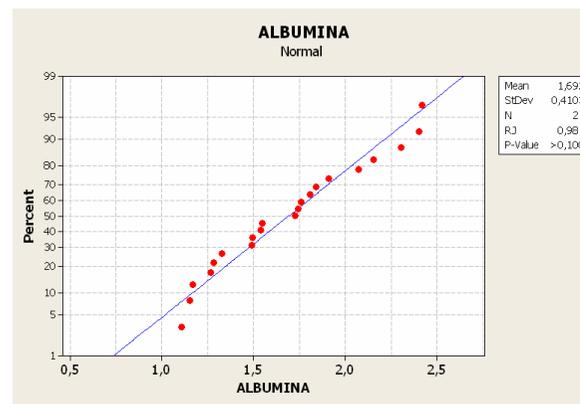
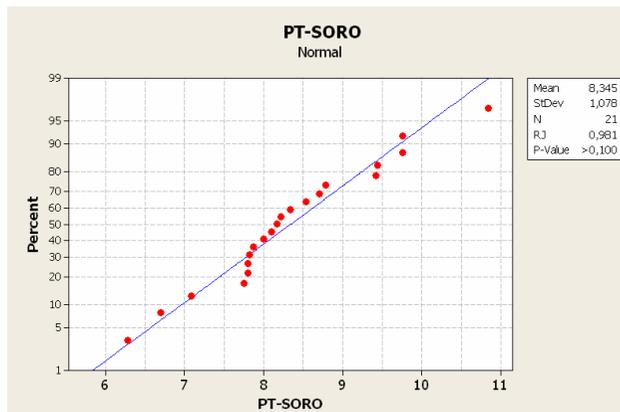
Anexo 3 - Valores Protéicos do Grupo Infectado (GI)

AMOSTRA			VALORES DE REFERÊNCIA					ELISA-LCR
			*5,7-7,7 (g/dl)	*2,0-4,0 (g/dl)	*2,0-4,5 (g/dl)	*0,5-1,3 (g/dl)	**10-25 (mg/dl)	
ANIMAL	PARASIT	ELISA-SORO	PT-SORO	ALBUMINA	GLOBULINA	Rel. A:G	PT-LCR	
L1	positivo	positivo	7,803	1,728	6,075	3,516	10,79	negativo
L2	negativo	positivo	8,22	1,744	6,476	3,713	17,04	positivo
L3	negativo	positivo	8	1,761	6,239	3,543	16,31	positivo
L4	positivo	positivo	7,868	2,074	5,794	2,794	7,54	positivo
L5	negativo	positivo	6,282	1,328	4,954	3,73	19,48	negativo
L6	negativo	positivo	10,846	1,547	9,299	6,011	78,5	positivo
L7	positivo	negativo	8,711	1,909	6,802	3,563	8,84	negativo
L8	positivo	positivo	8,539	1,152	7,387	6,412	11,2	negativo
L9	positivo	negativo	7,803	1,843	5,96	3,234	35,97	negativo
L10	positivo	negativo	7,828	1,283	6,545	5,101	28,54	negativo
L11	negativo	positivo	9,423	1,267	8,156	6,437	7,99	positivo
L12	positivo	positivo	9,447	2,304	7,143	3,1	17,66	positivo
L13	negativo	positivo	8,098	1,497	6,601	4,409	9,11	positivo
L14	positivo	positivo	7,754	1,81	5,944	3,284	8,87	negativo
L15	positivo	positivo	6,699	2,403	4,296	1,788	18,22	negativo
L16	positivo	negativo	7,092	2,419	4,673	1,932	6,06	negativo
L17	negativo	positivo	8,343	2,156	6,187	2,87	8,1	negativo
L18	positivo	negativo	8,785	1,542	7,243	4,697	20,07	negativo
L19	positivo	positivo	9,766	1,108	8,658	7,814	6,96	positivo
L20	positivo	negativo	8,171	1,172	6,999	5,972	14,99	positivo
L21	positivo	positivo	9,766	1,493	8,273	5,541	6,74	negativo
M			8,345	1,692	6,653	4,260	17,094	
D			1,078	0,410	1,265	1,607	16,031	
			BAIXO	NORMAL	ALTO			

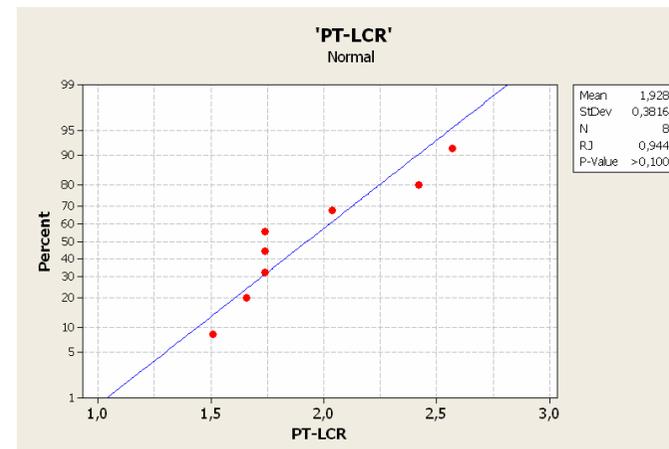
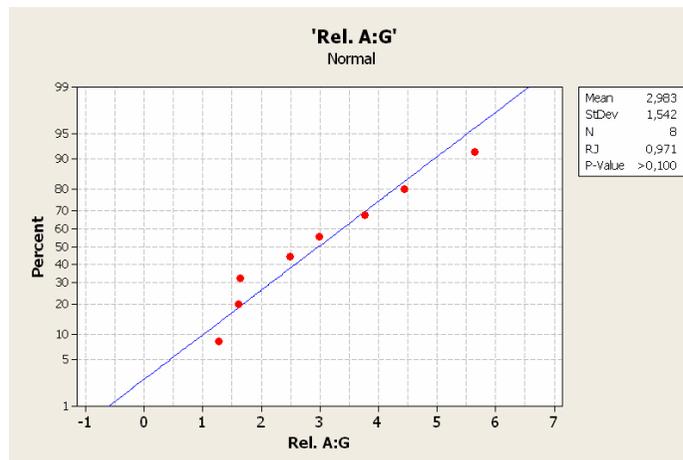
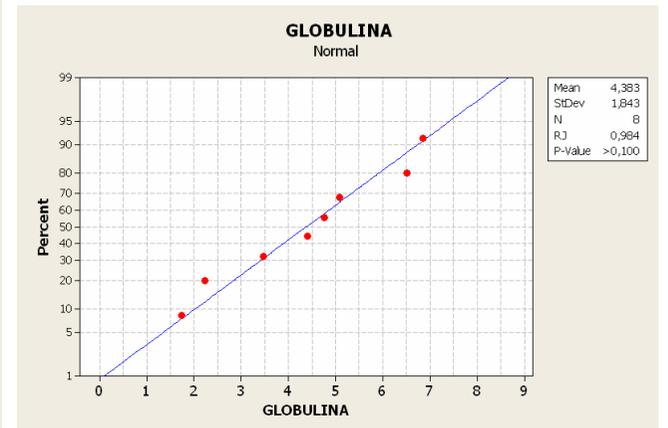
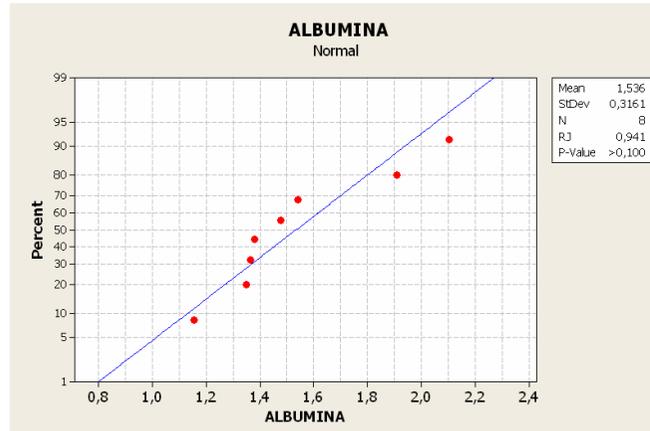
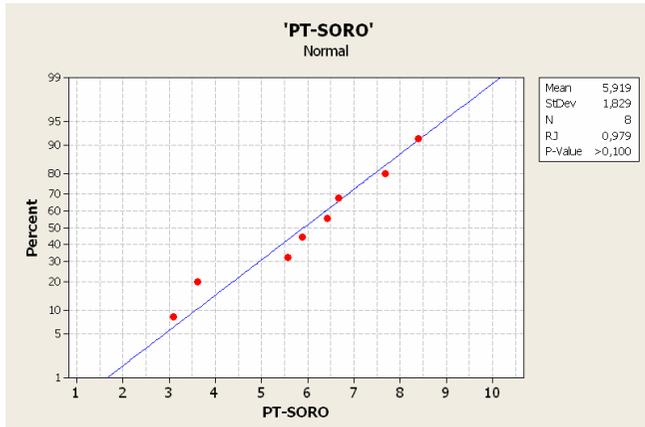
* Bush (2004)

**Meinkoth e Crystal (1998)

Anexo 4- Gráficos do Teste de Normalidade do Grupo Infectado (GI)



Anexo 5- Gráficos do Teste de Normalidade do Grupo Controle (GC)



Anexo 6- Teste T das Proteínas Séricas

Proteína		
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	8,344952381	5,91875
Variância	1,161401148	3,345749357
Observações	21	8
Variância agrupada	1,727713646	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	27	
Stat t	4,442697922	
P(T<=t) uni-caudal	6,80299E-05	
t crítico uni-caudal	1,703288035	
P(T<=t) bi-caudal	0,00013606	
t crítico bi-caudal	2,051829142	

Globulina		
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	6,652571429	4,383125
Variância	1,601260657	3,395388125
Observações	21	8
Variância agrupada	2,066404815	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	27	
Stat t	3,799862439	
P(T<=t) uni-caudal	0,000374844	
t crítico uni-caudal	1,703288035	
P(T<=t) bi-caudal	0,000749689	
t crítico bi-caudal	2,051829142	

Albumina		
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	1,692380952	1,535625
Variância	0,168349748	0,099914268
Observações	21	8
Variância agrupada	0,150607216	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	27	
Stat t	0,972202633	
P(T<=t) uni-caudal	0,169789771	
t crítico uni-caudal	1,703288035	
P(T<=t) bi-caudal	0,339579542	
t crítico bi-caudal	2,051829142	

A:G		
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	4,260092308	2,983496919
Variância	2,583159595	2,376937179
Observações	21	
Variância agrupada	2,529694524	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	27	
Stat t	1,931856542	
P(T<=t) uni-caudal	0,031967292	
t crítico uni-caudal	1,703288035	
P(T<=t) bi-caudal	0,063934584	
t crítico bi-caudal	2,051829142	

Anexo 7. Teste T e Mann-Whitney da Proteína Líquórica

Proteína		
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	17,09428571	1,9275
Variância	256,9943057	0,145621429
Observações	21	8
Variância agrupada	190,4039061	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	27	
Stat t	2,645521321	
P(T<=t) uni-caudal	0,0067163	
t crítico uni-caudal	1,703288035	
P(T<=t) bi-caudal	0,013432601	
t crítico bi-caudal	2,051829142	

TESTE	
Mann-Whitney	
n1	8
n2	21
N=n1+n2	29
R1	36
R2	399
m1	168
Ho	Ñ há difer/grupos
mi(u)	84
sigma(u)	20,4939015
zcal	4,09878031
p-value	2,0778E-05