

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Manifestação ocular atípica da leishmaniose e diagnóstico parasitológico por *imprint* conjuntival em cão: relato de caso

Yanna Nascimento de Figueiredo Martins

Areia, 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Manifestação ocular atípica da leishmaniose e diagnóstico parasitológico por *imprint* conjuntival em cão: relato de caso

Yanna Nascimento de Figueiredo Martins

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba, sob orientação da professora Ivia Carmem Talieri.

Areia, 2016
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Yanna Nascimento de Figueiredo Martins

Manifestação ocular atípica da leishmaniose e diagnóstico parasitológico por *imprint* conjuntival em cão: relato de caso

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovada em:
Nota:

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ivia Carmem Talieri - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Barbosa de Lucena - UFPB

Gilzane Dantas Nóbrega, Mestre - UFPB

Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto
Coordenador de TCC

Aos meus pais, por todo amor e compreensão.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado saúde e força para enfrentar as dificuldades que apareceram ao longo do caminho.

Aos meus pais Eliane do Nascimento e João de Figueiredo Martins por todo incentivo e amor incondicional.

À minha grande família que de todas as formas me apoiaram e me aconselharam a seguir sempre em frente.

A minha orientadora Ivia Carmem Talieri, pela ajuda na elaboração deste trabalho, pelas suas correções e incentivos.

A todos os professores da UFPB que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos animais, motivo pelo qual escolhi essa linda profissão que é a Medicina Veterinária.

A todos os meus colegas que contribuíram para minha caminhada na universidade, desde o começo na zootecnia, especialmente Rosa, Vanúbia, Waleska e durante o curso da veterinária, especialmente Lieska, Idaline, Regina, Wennia, as quais foram parte da minha família em Areia, como também Francisca, Maria, Camilla, Carol, Lucas, Allan, Paulo Ricardo, Neto, Rubia, Alex, Ricardo Pereira, Messias, Gedean, Érica, Vanessa, Ana Karen, Lanne por todos os anos de amizade e cumplicidade que foi construído, tornando mais fácil a caminhada.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Deus nunca disse que a jornada seria fácil, mas ele disse que a chegada
valeria a pena.

Max Lucado

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Ciclo de vida da *Leishmania*.....18
- Figura 2:** Região perianal de cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose, apresentando hiperqueratose, alopecia e crostas..... 29
- Figura 3:** Cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose, apresentando conjuntivas bulbares edemaciadas nas porções mediais, com edema e neovascularização corneais adjacentes à conjuntiva. Notar alopecia e hiperqueratose no canto palpebral lateral29
- Figura 4:** Procedimento cirúrgico para a realização da biópsia da conjuntiva bulbar de um cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose.....32
- Figura 5:** Citologia esfoliativa da conjuntiva bulbar medial de cão Pug de um ano e oito meses de idade, com leishmaniose.....34
- Figura 6:** Formas amastigotas de *Leishmania* spp. no citoplasma de um macrófago, em citologia de sangue periférico (ponta de orelha) de cão Pug, um ano e oito meses de idade. Coloração Panótico, aumento 100X.....35
- Figura 7:** Formas amastigotas (seta) de *Leishmania* no citoplasma de macrófago na citologia esfoliativa de conjuntiva bulbar de um cão Pug, um ano e oito meses de idade. Coloração Panótico, aumento 1000X.....36
- Figura 8:** Fotomicrografia de corte histológico de conjuntiva bulbar de um cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade. Observar as formas amastigotas (seta) de *Leishmania* spp. no citoplasma dos macrófagos. Coloração Hematoxilina & Eosina, 1000x.....36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Hemograma de cão Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose. Observar anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia.....30
- Tabela 2:** Hemograma de cão Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose, aos 21 dias após o primeiro atendimento, ainda apresentando anemia normocítica e hipocrômica, trombocitopenia e leucopenia com eosinopenia e linfopenia.....31
- Tabela 3:** Dosagens séricas de exames bioquímicos de um cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade com leishmaniose.....31
- Tabela 4:** Hemograma de cão Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose, aos 51 dias após o primeiro atendimento, ainda apresentando anemia normocítica hipocrômica e trombocitopenia, linfopenia, monocitose e eosinopenia.....33
- Tabela 5:** Dosagens séricas de um cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose. De acordo com os valores de referência, notar ausência de alterações.....34

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: Alanina aminotransferase;

BID: Duas vezes ao dia;

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média;

DNA: Ácido desoxirribonucleico;

ELISA: Ensaio imunossorvente ligado a enzima;

FA: Fosfatase alcalina;

HIV: Vírus da imunodeficiência humana;

OD: Olho direito;

OE: Olho esquerdo,

PIO: Pressão intraocular;

PCR: Reação em cadeia de polimerase;

RIFI: Reação de imunofluorescência indireta;

SID: Uma vez ao dia;

VCM: Volume corpuscular médio;

RESUMO

MARTINS, Yanna Nascimento de Figueiredo, Universidade Federal da Paraíba, junho, 2016. **Manifestação ocular atípica da leishmaniose e diagnóstico parasitológico por *imprint* conjuntival em cão: relato de caso.** Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivia Carmem Talieri.

A sintomatologia inespecífica que caracteriza a leishmaniose em cães compreende febre, esplenomegalia, ascite, emagrecimento acentuado e anemia. Pode haver ulcerações cutâneas, descamação da pele, lesões oculares e perioculares. Um cão da raça Pug, de um ano e oito meses de idade, foi encaminhado ao Hospital Veterinário da UFPB, Areia-PB, com histórico de inapetência, episódios de epistaxe e claudicação há aproximadamente três meses. Ao exame, as alterações mais evidentes foram o edema e a hiperemia da conjuntiva bulbar medial de ambos os olhos, alopecia e hiperkeratose em canto lateral das pálpebras, bilateralmente, hiperkeratose e rarefação pilosa na região perianal. A tonometria de aplanção revelou uveíte anterior. O cão apresentou anemia arregenerativa e trombocitopenia durante todo o seu acompanhamento clínico. Alterações discretas e temporárias foram observadas nas dosagens sérias de ALT e FA. Testes sorológicos como a imunofluorescência indireta e ELISA, para leishmaniose, revelaram resultados negativos. Contudo, devido à persistência de sinais clínicos, da anemia e da trombocitopenia, apesar de tratamento sintomático, a leishmaniose não foi descartada. Para tanto, foi solicitado exame molecular de PCR em tempo real de sangue total do animal, cujo resultado também foi negativo. Desta maneira, foram realizadas citologia esfoliativa da conjuntiva e do sangue periférico, além de biópsia conjuntival, para melhor investigar a doença. Tais exames parasitológicos concluíram o diagnóstico por meio da observação de inúmeras formas amastigotas de *Leishmania* spp. em macrófagos das amostras. Um protocolo terapêutico para leishmaniose foi estabelecido para o animal, com boa resposta clínica.

Palavras-chave: citologia, conjuntiva, *Leishmania* spp., oftalmologia veterinária.

ABSTRACT

MARTINS, Yanna Nascimento de Figueiredo, Federal University of Paraíba, June, 2016. **Atypical ocular manifestation of leishmaniasis and parasitological diagnostic by conjunctival imprint in a dog: case report.** Advisor: Dr. Ivia Carmem Talieri.

The nonspecific symptoms that characterize leishmaniasis in dogs include fever, splenomegaly, ascites, severe weight loss, and anemia. There may be skin ulcerations, skin peeling, ophthalmic and periocular lesions. One-year-old male Pug was referred to the Veterinary Hospital of UFPB, Areia-PB, with history of inappetence, epistaxis and lameness about three months ago. On examination, the most obvious changes were edema and hyperemia of the medial bulbar conjunctiva of eyes, alopecia and hyperkeratosis of the lateral eyelids of both eyes, hyperkeratosis and hairy rarefaction in the perianal region. The tonometry revealed anterior uveitis. The dog had nonregenerative anemia and thrombocytopenia throughout their clinical follow-up. Discrete and temporary changes were observed in ALT and FA dosages. Serological tests for leishmaniasis as indirect immunofluorescence and ELISA revealed negative results. However, due to the persistence of clinical signs, anemia and thrombocytopenia, although symptomatic treatment, leishmaniasis was not ruled out. Therefore, it was requested molecular examination of real-time PCR of total blood, that the result was also negative. Thus, conjunctival cytology, peripheral blood cytology and conjunctival biopsy were performed to further investigate the disease. Such parasitological examinations concluded diagnosis through observation of numerous amastigotes of *Leishmania* spp. on macrophages. A therapeutic protocol for leishmaniasis was established for the animal, with good clinical response.

Keywords: cytology, conjunctival, *Leishmania* spp, veterinary ophthalmology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA:	15
2.1. Agente Etiológico e Epidemiologia	15
2.2. Vetor	16
2.3. Reservatórios	16
2.4. Ciclo Biológico e Transmissão.....	17
2.5. Quadro Clínico e Patogenia.....	18
2.6. Alterações Laboratoriais	21
2.7. Diagnóstico	21
2.7.1. Diagnóstico Parasitológico	22
2.7.1.1. Exame Parasitológico Direto	22
2.7.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	23
2.7.2. Testes imunológicos	23
2.8 Tratamento	24
2.9 Prevenção e Controle	26
2.10 Leishmaniose e Saúde Pública.....	27
3. RELATO DE CASO	28
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÃO	42
6. REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença de abrangente distribuição geográfica. Em alguns locais como Índia, Nepal e África, é uma doença antroponótica, ou seja, que só é transmitida entre humanos, porém em outros locais como China, Oriente Médio, Mediterrâneo, Américas Central e do Sul, se comporta como zoonose (COSTA, 2011). É uma doença parasitária, que pode se manifestar de duas formas, a forma visceral, em que há o comprometimento de múltiplos órgãos que são base de infecção do sistema reticuloendotelial, e a forma cutânea, onde ocorre uma variedade de lesões na pele (AKILOV et al., 2007; PEÑA et al., 2000). A doença é urbana e rural, ocorre particularmente em cidades localizadas em regiões semiáridas (TAYLOR et al., 2010). Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WORLD, 2015).

A leishmaniose é causada pelo protozoário do gênero dimórfico (amastigota e promastigota) *Leishmania*, acometendo os cães que são considerados os principais reservatórios, através dos quais os humanos podem se infectar. Todavia, animais silvestres como coiotes, lobos, raposas e roedores também servem como fonte de reservatório. No Brasil, a transmissão ocorre através da picada de um mosquito pertencente à família dos flebotomíneos, pertencente ao gênero *Lutzomyia*. Este mosquito, pertencente à espécie *Lutzomyia longipalpis*, é conhecido popularmente por mosquito-palha, birigui ou tatuquira (COSTA, 2011). O flebotomíneo é um hospedeiro intermediário, em cujo intestino, o protozoário realiza sua divisão. Os insetos veiculam as formas promastigotas, uma vez que o protozoário possui duas formas em seu ciclo, uma amastigota intracelular, e outra promastigota (DESJEUX, 1992).

Os sinais clínicos da leishmaniose canina são variados, por vezes inespecíficos incluindo febre, esplenomegalia, ascite, emagrecimento exagerado e anemia. Pode haver ulcerações cutâneas, descamação da pele e onicogribose. Lesões oculares e perioculares têm sido relatadas variando de 16% a 80%. As lesões oculares, como manifestação clínica isolada, constituem 15% dos casos (PEÑA et al., 2000; SOLANO GALLEGGO et al., 2009), sendo a blefarite, a ceratoconjutivite e a uveíte anterior os sinais descritos como os mais

frequentes. Outras manifestações oculares relatadas incluem ciclite, coriorretinite, descolamento de retina, ceratoconjuntivite seca, cataratas, glaucoma (PEÑA et al., 2000), dermatites perioculares (SOLANO GALLEGO et al., 2009) e, com menor frequência, ocorre conjuntivite (LAUS, 2007). Sua forma crônica tem baixa mortalidade, mas a forma aguda é fatal (FORTES, 2004).

Os cães são comumente encontrados em um grande número de lares, tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos, portanto, sua saúde preocupa sempre seus tutores (MARTIN SANCHEZ et al., 2007).

Objetivou-se com esse trabalho relatar a ocorrência da manifestação ocular atípica de leishmaniose canina com aumento da conjuntiva bulbar, bilateralmente, bem como a realização do diagnóstico parasitológico a partir da citologia conjuntival.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1. Agente Etiológico e Epidemiologia

A leishmaniose canina é uma zoonose causada por um protozoário pleomórfico. Tem distribuição geográfica ampla, estando presente em todo o mundo. Entre as doenças transmitidas por vetores esta doença é a terceira mais importante após, a malária e a filariose linfática. É endêmica em regiões tropicais e subtropicais, abrangendo 88 países, com estimativa de 2 milhões de casos por ano em humanos. Destes, 0,5 milhão são de leishmaniose visceral e 1,5 milhões são de leishmaniose cutânea (DESJEUX, 2004). O protozoário *Leishmania* produz dois tipos diferentes de sintomatologia, sendo dividida em dois grandes grupos: a leishmaniose tegumentar que acomete pele e mucosas, e a leishmaniose visceral, causando afecção de órgãos internos (ETTINGER, 2010).

Os primeiros casos de leishmaniose visceral em humanos foram descritos na Índia no ano de 1885, e somente alguns anos mais tarde, em 1903, o agente causador desta doença foi descoberto e descrito por William Boog Leishman. Ele descreveu o parasita, mas o associou às formas do *Trypanosoma* (LEISHMAN, 1903).

A leishmaniose canina é causada por um protozoário pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (LEISHMAN, 1903). A leishmaniose visceral é composta pelo complexo *Leishmania donovani*, que compreende a *Leishmania donovani*, a *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*. No Novo Mundo, o agente etiológico é a *L. chagasi*, enquanto que na Europa, Ásia e África, os agentes responsáveis são a *L. infantum* e a *L. donovani* (GREENE, 2015). No Brasil, a espécie mais comum é a *Leishmania infantum chagasi*, encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia (BARATA et al., 2004; MICHALSKY, 2011). Esses protozoários apresentam duas formas: uma amastigota, intracelular obrigatória, que se encontra no sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (MEREDITH et al., 1995) e outra

flagelada ou promastigota encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (PAIVA et al., 2007).

2.2. Vetor

O gênero *Leishmania* possui ciclo biológico heteroxênico, ou seja, precisa de dois hospedeiros para completar seu ciclo. Ele necessita de um hospedeiro vertebrado, principalmente canídeos domésticos e selvagens, ou roedores e humanos, e um hospedeiro invertebrado representado apenas por um inseto vetor, um mosquito flebotomíneo (SCHLEIN, 1993).

Os flebotomíneos fazem parte da Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae. Ambos os sexos se alimentam principalmente de matéria orgânica e de seiva oriunda do néctar de flores. Apenas as fêmeas realizam hematofagia, o que é fundamental para a maturação folicular ovariana. Possuem ciclo de vida dividido nas fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os adultos tem o corpo piloso e apresentam pequeno porte (NOVO, 2011).

O hospedeiro intermediário, no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) recebe o nome de *Phlebotomus* e, no Novo Mundo, ele é denominado de *Lutzomyia* (América Central e do Sul). Estes vetores são conhecidos popularmente, de acordo com a região geográfica, como mosquito-palha, cangalhinha, birigui, tatuquira, asa-branca, asa-dura, dentre outros. Através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas, a leishmaniose é transmitida. Estes mosquitos estão principalmente presentes em países tropicais. Nos países de clima temperado os *Phlebotomus* são ativos durante os meses relativamente quentes do ano, sendo comumente encontrados nos domicílios à noite, devido ao seu fototropismo positivo (SHARMA; SINGH, 2008).

No Brasil, as espécies que tem sido relatadas como transmissoras da doença são a *Lutzomyia longipalpis*, considerada a principal transmissora de *L. chagasi* e *Lutzomyia cruzi*, denominada como vetora em Corumbá e Jaciara no Mato Grosso do Sul (NOVO, 2011).

2.3. Reservatórios

Os reservatórios da *L. chagasi* na área urbana é o cão doméstico (*Canis familiares*) e na área silvestre são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) (COSTA, 2005). A infecção em gatos (MARTIN SANCHEZ et al., 2007) e cavalos (FERNANDEZ BELLON et al., 2006) tem sido relatada em áreas onde a doença normalmente só acomete cães.

2.4. Ciclo Biológico e Transmissão

Nos hospedeiros vertebrados, a *Leishmania* spp. é encontrada na forma amastigota nos macrófagos e outras células do sistema fagocitário mononuclear da pele, baço, fígado, medula óssea, nódulos linfáticos e mucosa, onde sua reprodução se dá por cissiparidade simples causando a destruição das referidas células (FORTES, 2004). Os reservatórios vertebrados se infectam quando as fêmeas dos insetos inoculam formas promastigotas durante o repasto sanguíneo. Quando se alimenta, o inseto inocula sua saliva que tem função anticoagulante, causando vasodilatação e antiagregação plaquetária, servindo ainda como substância quimiotática para monócitos. Além disso, a saliva age como imunorregulador interagindo com os macrófagos, o que aumenta sua proliferação e impede que essas células destruam os parasitas (MICHALICK, 2004).

O hospedeiro invertebrado se infecta por ocasião do seu repasto sanguíneo no vertebrado, onde ingere macrófagos e monócitos infectados contendo formas amastigotas, os quais irão para o intestino se transformando em forma promastigota que, por cissiparidade simples longitudinal, se multiplicam rapidamente, produzindo um grande número no inseto. O mosquito, através do regurgitamento, na picada, inocula no hospedeiro vertebrado a *Leishmania* spp. (FORTES, 2004). Uma vez que os parasitas são inoculados através da derme, preferencialmente em zonas de pêlo rarefeito, como cabeça, focinho, pavilhões auriculares, áreas inguinais e perineais (SOLANO GALLEGU et al., 2009), a fagocitose por macrófagos segue, envolvendo o parasita em um fagossoma e tentando expulsá-lo através de uma cascata de metabólitos. O protozoário dribla essa defesa para sobreviver e se multiplicar

no macrófago. O progresso da infecção vai depender da eficácia da resposta imune do hospedeiro (ALVAR et al., 2004; CABRAL et al., 1998).

Algumas outras vias de transmissão são descritas, tais como a venérea (BOGGIATTO et al, 2011) e a transplacentária (NAUCKE; LORENTZ, 2012).

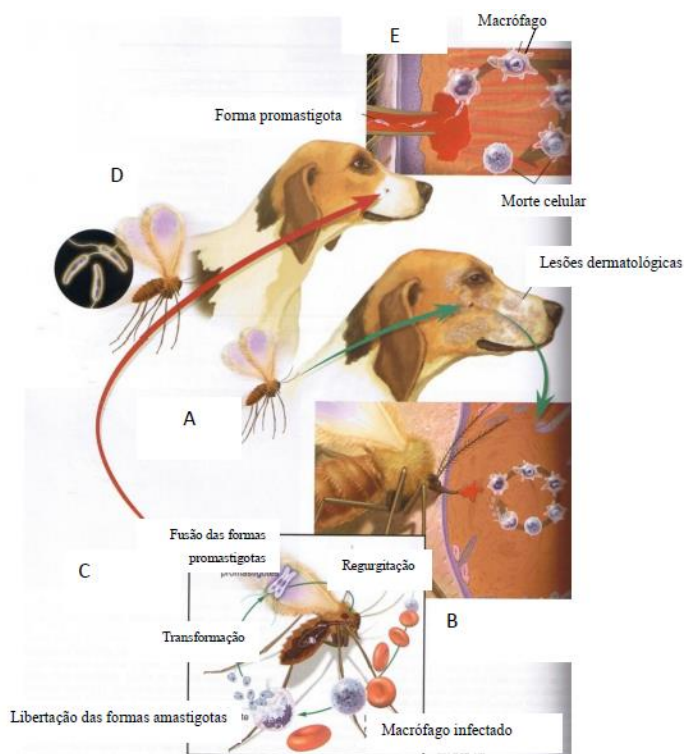


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania* (adaptado de GREENE, 2012).

2.5. Quadro Clínico e Patogenia

Em geral, a leishmaniose canina é uma doença sistêmica que pode envolver qualquer órgão, tecido e fluido biológico e manifesta-se por uma multiplicidade de sinais clínicos (CABRAL et al., 1998; SOLANO GALLEGO et al., 2009). Segundo o nível de afecção podemos classificar a doença como visceral, cutânea ou viscerocutânea (GRAMICCIA, 2011), sendo que esta última é a forma de apresentação mais frequente da doença. Geralmente, a leishmaniose canina é uma doença crônica (CIARAMELLA et al., 1997), e os sinais clínicos podem desenvolver-se dos três meses até os sete anos após a infecção (SOLANO GALLEGO et al., 2001).

Os sinais clínicos mais observados são perda progressiva de peso, atrofia muscular, intolerância ao exercício, linfadenomegalia, lesões na pele, letargia, diminuição do apetite, esplenomegalia, poliúria, polidipsia, lesões oculares, epistaxe, claudicação, onicogribose, vômitos e diarreia (CIARAMELLA et al., 1997).

Os órgãos afetados se caracterizam por lesão inflamatória crônica e proliferativa, em que células inflamatórias, tais como macrófagos, linfócitos e plasmócitos, conseqüentemente se infiltram. Essas lesões ocorrem nos rins, fígado, órgãos linfóides e pele, olhos, ossos, articulações e no sistema nervoso central (MARQUES, 2008).

Nos rins o depósito de imunocomplexos nos glomérulos pode acarretar em glomerulonefrite e nefrite intersticial com comprometimento da função renal (LOPEZ et al., 1996). A poliúria e/ou polidipsia podem indicar lesão renal (CIARAMELLA; CORONA, 2003), podendo ser estas as únicas alterações da leishmaniose canina (SOLANO GALLEGO et al., 2011). Muitas vezes o problema renal é a principal causa da morte dos animais com leishmaniose (COSTA; VIEIRA, 2000).

No fígado as lesões se caracterizam por inflamações granulomatosas, hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer, pois nestas células se encontram uma maior carga parasitária (OLIVEIRA et al., 1993).

Os linfonodos e baço apresentam reação linfoplasmocitária acentuada, ocorrendo a linfadenomegalia generalizada e esplenomegalia, que são alterações presentes em 54% dos casos (CIARAMELLA; CORONA, 2003; KRAUSPENHAR et al., 2007). Os linfonodos podem apresentar-se hipertróficos nas regiões corticais e medulares, com formas amastigotas da *Leishmania* dentro dos macrófagos medulares (KRAUSPENHAR et al., 2007; LIMA et al., 2004).

Na pele, os sinais clínicos ocorrem normalmente isolados, sem sinais óbvios da doença sistêmica. Não se deve descartar que o animal com sinais dermatológicos não tenha envolvimento visceral, pois o parasita se dissemina antes das lesões de pele se generalizarem. A prevalência de lesões cutâneas varia de 56% a 90% (GREENE, 2015). Dentre os sinais dermatológicos, geralmente os animais desenvolvem feridas ulcerativas de difícil cicatrização, estando associadas a uma dermatite esfoliativa e uma seborreia seca

generalizada, mais comum na cabeça, orelhas e extremidades. A maior parte dos animais apresenta alopecias progressivas, simétricas, na face, na região periocular e perilabial. Podem aparecer úlceras mucocutâneas, nódulos cutâneos ou erupções pustulosas. Pode haver hiperqueratose nasodigital, com hipotricose ou alopecia na região. Outros achados incluem onicogribose, paroníquia, dermatite pustular estéril, despigmentação nasal com erosões e ulcerações, dermatite nodular e piodermite bacteriana secundária (GREENE, 2015). Piodermite por *Staphylococcus*, superficial ou profunda, é uma complicação relativamente frequente (SOLANO GALLEGO et al., 2009).

Sinais articulares e ósseos também podem ser observados, entre os quais a claudicação de um ou mais membros, atrofia muscular, inflamação articular, crepitação e dor. O animal, portanto, fica incapacitado de se movimentar, tudo isso devido à presença de poliartrite, polimiosite e lesões ósseas (GIMÉNEZ; MENÉNDEZ, 2005).

Os sinais neurológicos relatados foram convulsão generalizada, alterações visuais, tetraparesia e tetraplegia, mioclonias, vocalização, andar em círculos e perseguição da cauda, bem como sinais de envolvimento vestibular e cerebelar (FEITOSA, 2005).

Alterações gastrointestinais como diarreia crônica e melena, devido às ulcerações nas mucosas gástrica e intestinal, também são observadas. Em alguns casos, a diarreia de intestino delgado tem sido atribuída à infiltração da mucosa por células parasitadas. Colite ulcerativa e erosiva também podem se apresentar (FERRER, 1999).

Apesar de serem menos frequentes, as lesões oculares também são muito características, variando amplamente. As pálpebras apresentam frequentemente blefarite, que é um processo inflamatório intenso com edema, hiperemia e engurgitamento das mesmas, em associação com a dermatite facial. Pode-se observar ceratoconjuntivite bilateral (GREENE, 2015; NARANJO et al., 2005; PEÑA et al., 2000; ROZE, 1986), uveíte anterior, geralmente bilateral, que pode também estar associado a edema de córnea e sinéquia posterior (GARCIA ALONSO et al., 1996; GREENE, 2015). O glaucoma pode ser consequência de uveíte grave (ROZE, 1986; FERRER, 1999).

Histologicamente, ocorre uma inflamação de granulomatosa a linfoplasmocítica, num padrão perivascular, nodular ou difuso, devido às formas amastigotas da *Leishmania* se apresentarem nos tecidos oculares, em especial na conjuntiva, limbo e corpo ciliar (GREENE, 2015; SOLANO GALLEGO et al., 2009). A formação de sinéquias posteriores pode levar à ocorrência de glaucoma, resultado da obstrução pupilar (CIARAMELLA; CORONA, 2003). A conjuntivite (KOUTINAS et al., 1999) é muito comum e geralmente secundária a outras causas, mas alguns autores sugerem que a leishmaniose é uma das poucas doenças em que a conjuntivite pode ser primária, não descartando a possibilidade da conjuntivite ser secundária na leishmaniose com envolvimento das glândulas lacrimais (PEÑA et al., 2008).

Podem-se observar ainda sequelas oculares de hipertensão arterial sistêmica, como descolamento e hemorragias de retina, tortuosidade dos vasos da retina e hifema que, apesar de raras, foram relatadas (SOLANO GALLEGO et al., 2009).

2.6. Alterações Laboratoriais

As alterações encontradas no hemograma são anemia não regenerativa (normocrômica e normocítica), mas em alguns casos podemos encontrar uma anemia regenerativa, do tipo hemolítica, com características de macrocitose e hipocromia, trombocitopenia, leucocitose com desvio à esquerda e linfopenia (GREENE, 2015). Segundo Sonoda (2007), os achados mais comuns no leucograma de um animal com leishmaniose são leucopenia associada a linfopenia e monocitose, como também pode ser observado leucocitose com neutrofilia.

Nos achados bioquímicos podemos encontrar hiperglobulinemia, hiperproteinemia, hipoalbuminemia, azotemia e aumento das atividades das enzimas hepáticas tais como alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. Na urinálise o achado mais consistente é a proteinúria (NELSON; COUTO, 2015; SONODA, 2007).

2.7. Diagnóstico

Os sinais clínicos e laboratoriais da leishmaniose canina são muito variáveis e quase sempre inespecíficos, tornando seu diagnóstico complexo (SOLANO GALLEGO et al., 2009). Um diagnóstico preciso envolve a realização de exames clinicopatológicos e ensaios diagnósticos específicos que incluem observação microscópica do parasita em preparações citológicas ou amostras histopatológicas, sorologia ou métodos moleculares (GREENE, 2015).

2.7.1. Diagnóstico Parasitológico

2.7.1.1. Exame Parasitológico Direto

O diagnóstico da leishmaniose, quando existem sinais clínicos que levam à suspeita da doença, pode ser feito observando as formas amastigotas do parasita em microscopia óptica de exame citológico do aspirado de lesões cutâneas, baço, medula óssea, linfonodos, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos de sangue periférico que é considerado o teste ouro para o diagnóstico da doença (ALVAR et al., 2004; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005).

O exame parasitológico é considerado, ainda, o teste ouro para detecção da leishmaniose. A especificidade desse método é de 100% mais a sensibilidade depende do grau de parasitismo, do tipo de material coletado, do seu processamento e coloração, além do observador (LAURENTI, 2009).

São observadas formas amastigotas livres ou intracelulares nas células mononucleares, em monócitos, macrófagos ou neutrófilos, que se apresentam de forma oval a arredondada, com núcleo relativamente grande de coloração avermelhada e cinetoplasto como uma estrutura vermelha ou violeta (MAIA; CAMPINO, 2008).

As amostras de citologia, biópsia e de esfregaço sanguíneo podem ser coradas com coloração de Wright, Giemsa ou Panótico. Este método permite estabelecer o diagnóstico definitivo (NELSON; COUTO, 2006). Também podem ser vistas *Leishmania* em secções de biópsias histopatológicas da pele ou outros órgãos infectados (ADAMAMA-MORAITOU et al, 2007; PEÑA et al, 2008; SOLANO GALLEGO et al, 2004).

2.7.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Essa técnica é utilizada rotineiramente para fins de diagnóstico, estudos epidemiológicos e na seleção de doadores de sangue (GREENE, 2015), determinando a presença do parasita não só nos casos ativos, como também monitoramento da cura parasitológica após o tratamento. A PCR baseia-se na amplificação *in vitro* de uma sequência específica de nucleotídeos de DNA parasitário, o que permite a identificação da *Leishmania* em vários tecidos como baço, fígado, sangue, medula óssea e biópsia conjuntiva. (ALVAR, et al, 2004). Porém, um único resultado negativo de PCR não é suficiente para descartar a infecção, podendo haver resultados falsos negativos, especialmente em cães assintomáticos, pois geralmente estes animais produzem altos níveis de anticorpos, que podem ser facilmente detectados, mas nesse caso a sensibilidade de detecção de anticorpos é inferior e geralmente cães assintomáticos representam 85% dos cães infectados, então deve ser realizado diversos tipos de exames para comprovar a existência da doença. A eficácia da PCR irá depender de vários fatores tais como o método de extração de DNA, o protocolo e o material analisado (MAIA; CAMPINO, 2008).

2.7.2. Testes imunológicos

Existem diversos testes imunológicos usados para detecção de anticorpos no soro do paciente, dentre eles podem ser citados os testes que utilizam antígenos particulados (parasitos inteiros), como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI); e testes que utilizam extratos ou frações antigênicas específicas, tais como as reações imunoenzimáticas como o ELISA (SUNDAR; RAI, 2002).

A imunofluorescência indireta (RIFI) é o padrão ouro dos métodos sorológicos, pois apresenta alta especificidade (80%) e alta sensibilidade (90% a 100%). É uma técnica sensível, porém uma das suas limitações é a ocorrência de reações cruzadas, principalmente com a doença de Chagas (LANGONI et al., 2005) e às vezes ocorre falha devido ao baixo nível de anticorpos no cão. Este teste permite detectar anticorpos pela incubação de

diluições seriadas do soro a ser testado com um antígeno do gênero *Leishmania* na forma promastigota. Em seguida, adiciona-se um anti-anticorpo conjugado com fluoresceína para a visualização em microscopia de fluorescência. A observação de fluorescência amarelo-esverdeada sobre o parasita indica ser positivo para a infecção, porém se for visualizado fluorescência vermelha ou vermelha-acastanhado, a amostra é considerada negativa para leishmaniose (SOLANO GALLEGGO et al., 2009). Outro teste sorológico de diagnóstico, como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), é fácil e simples e permite analisar um grande número de amostras em curto espaço de tempo (GRAMICCIA, 2011; MAIA E CAMPINO, 2008). Além disso, pode ser adaptada para o uso com diversos antígenos, como antígenos sintéticos, brutos ou recombinantes, comportando assim inesgotáveis formas de variação (MAIA e CAMPINO, 2008). Neste método utilizam-se diversos antígenos complexos de *Leishmania* (VULPIANI et al., 2011).

Dentre as novas tecnologias para o diagnóstico sorológico da LVC inclui-se o teste rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP[®] -Leishmaniose Visceral Canina), patenteado pela Chembio Diagnostics e desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz (FUNED,2010). São ensaios imunocromatográfico de triagem que emprega de um lado a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal, e de outro, antígenos recombinantes k28 (fusão do rk39, rk26 e rk9) específicos de *Leishmania* ligados a uma membrana. Se houver a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra testada, estes reagirão com os antígenos recombinantes, e em sequência se ligarão à combinação de proteína A e ouro coloidal, fornecendo o resultado positivo por meio de reação de cor. As vantagens são de um teste rápido, simples e de fácil uso, podendo ser executado a campo (BIO MANGUINHOS, 2011).

2.8 Tratamento

Para os humanos existe tratamento (RAZEGHINEJAD et al., 2016), entretanto a leishmaniose canina é mais resistente ao tratamento comparativamente à doença em humanos (GREENE, 2015).

O tratamento da leishmaniose é considerado difícil, demorado, de custo elevado e com eficácia parcial. O protocolo licenciado na Europa para o

tratamento específico da leishmaniose é baseado no uso de antimoniais pentavalentes como o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (SOLANO GALLEGO et al., 2009), na dose de 100 mg, por via intravenosa a cada 24 horas por 3 a 4 semanas ou a mesma dose subcutânea dividida em duas doses diárias. O estibogluconato de sódio (Pentosan®), outro antimonial pentavalente, deve ser administrado diariamente por via subcutânea, endovenosa ou intramuscular por 3 a 4 semanas. Alguns efeitos colaterais destes fármacos podem ser observados e são comuns, como fibrose muscular, formação de abscessos, insuficiência renal, vômito e dor (GREENE, 2015).

Pode-se usar o alopurinol, um composto de hipoxantina, que é metabolizado por espécies de *Leishmania*, que produzem um análogo de iosina que é incorporado ao seu RNA, provocando uma tradução defeituosa das proteínas e inibe a multiplicação dos parasitos. É utilizado frequentemente na dose de 10 mg/kg, via oral, há cada 12 horas, resulta em notável melhora clínica dentro de 4 semanas. Este fármaco impede a transformação de hipoxantina em ácido úrico, podendo produzir urolitíase. Devido a este efeito do alopurinol, a função renal pode ser comprometida, contudo, a resolução das lesões cutâneas e a melhora do estado clínico do paciente são observadas (GREENE, 2015).

Durante muito tempo o protocolo terapêutico para a leishmaniose canina e humana recomendava o uso de antimoniais pentavalentes, na dose diária de 75 a 100mg/kg, a cada 24 horas (GREENE, 2015) ou 40 a 75mg/kg a cada 12 horas, SC, durante um período de 4 a 8 semanas (GREENE, 2015; SOLANO GALLEGO et al, 2011).

Os medicamentos atualmente licenciados para o tratamento específico da leishmaniose canina na Europa são o antimoniato de meglumina, a miltefosina e a aminosidina (SOLANO GALLEGO, et al., 2009).

Em países como França, Espanha e Itália foi relatada a ocorrência de cepas resistentes aos antimoniais pentavalentes (GREENE, 2015). Devido a este fato, o Brasil inclui-se no grupo de países que proíbe a utilização de fármacos destinados ao tratamento da leishmaniose humana dentro da veterinária. Através da portaria Interministerial N° 1.426 o Ministério da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), proíbe o tratamento de cães

com leishmaniose visceral canina utilizando medicamentos de uso humano ou produtos não registrados pelo Mapa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Outros fármacos também são utilizados, como a anfotericina B, mas este fármaco tem algumas desvantagens graves, consequentemente além da sua via de administração ser intravenosa, apresenta nefrotoxicidade. Também se utiliza da aminosida, que também é nefrotóxica e ototóxica e seu emprego como terapia de primeira escolha para a leishmaniose não é recomendada (MIRÓ et al., 2008).

A domperidona também é utilizada no tratamento da leishmaniose, pois diminui os títulos de *Leishmania* no estágio mais precoce da doença, tendo sido aprovada em diversos países da Europa para reduzir os sinais clínicos, como também controlar sua progressão, utilizada na dose de 5 mg/kg (HMA, 2013).

Os cães submetidos ao tratamento com esses medicamentos devem ser monitorados frequentemente, com repetição de exames a cada 3 a 6 meses. Se não observar melhora, o fármaco ou a dose devem ser modificados (SOLANO GALLEGO et al., 2009). Em geral, a maioria dos animais apresenta melhora no primeiro mês de tratamento, contudo em outros cães é necessário que se prolongue a terapia para que se obtenha melhora. Cães com insuficiência renal apresentam uma taxa de recuperação mais baixa, portanto deve-se monitorar a função renal por causa do alto potencial nefrotóxico dos fármacos utilizados no protocolo terapêutico (SOLANO GALLEGO et al., 2011) e pela própria lesão aos glomérulos, causada pelo parasita.

É importante salientar que o tratamento não previne o aparecimento de recidivas que normalmente ocorrem 6 meses a 2 anos após o seu término (BANETH; SHAW, 2002).

2.9 Prevenção e Controle

O controle da leishmaniose canina está intimamente relacionado com o controle da doença em humanos. Portanto, devem-se implantar métodos que evitem a progressão da doença e sua transmissão, deste modo o controle da leishmaniose deve ser feito através de várias medidas, realizadas em conjunto para que se obtenha sucesso na sua prevenção (VULPIANI et al., 2011).

O controle de reservatórios tem sido feito através do diagnóstico sorológico, onde os animais com resultado positivo são encaminhados para a eutanásia (COSTA et al., 2001). Porém, estes animais de estimação são considerados membros da família, e a sua saúde é de grande preocupação por parte dos tutores (MARTIN SANCHEZ et al., 2007). As falhas apontadas por este tipo de controle, por meio de resultados de testes sorológicos são: alta frequência de resultados falsos positivos, a falta de alcance de toda a população canina e, ainda, um longo período de tempo existente entre a detecção do animal doente até a sua eutanásia (MIRÓ et al., 2008).

Controlar o vetor da doença é uma das maneiras mais eficazes de prevenir o ciclo da leishmaniose e diminuir a ocorrência de infecção, através da utilização de redes protetoras em janelas, portas e canis (MIRÓ et al., 2008). O uso também de inseticidas tópicos à base de piretróides sintéticos em várias concentrações tem uma ação repelente e tóxica para o inseto muito forte, o que leva à prevenção da picada do mosquito, como também na diminuição de flebótomos infectados. Pulverizações e unções punctiformes à base de imidacloprida a 10% e permetrina a 50%, com duração de ação de mais ou menos 3 a 4 semanas são métodos empregados com eficácia (GREENE, 2015; VULPIANI et al., 2011). Coleiras impregnadas de deltametrina também são utilizadas, promovendo uma proteção durante seis meses.

Atuar sobre o cão saudável através da imunoprofilaxia também é uma excelente estratégia, além de prevenir a doença nos cães, diminuir a ameaça da infecção em humanos (MIRÓ et al., 2008). Vacinas vêm sendo produzidas contra a Leishmaniose onde já se dispõe de uma vacina comercial e várias encontram-se em ensaios clínicos de campo, aquelas de fração purificada de *leishmania* parecem ser bem sucedidas na prevenção da doença. Uma vacina canina comercial aprovada no Brasil constitui de uma fração enriquecida com glicoproteína GP63 de *L. donovani*, conhecida como ligante da fucose manose (*fucose mannose ligand*). Uma segunda vacina, baseada em um antígeno excretado/secretado do sobrenadante da cultura em meio específico de promastigotas de *L. infantum* vem demonstrado alta eficiência (GREENE, 2015).

2.10 Leishmaniose e Saúde Pública

A leishmaniose faz parte do grupo das principais zoonoses mundiais (SOLANO GALLEGOS et al., 2009) e os cães são considerados os principais reservatórios de leishmaniose visceral para os humanos nos países da Bacia Mediterrânea, Oriente Médio e América do Sul (GREENE, 2015). A leishmaniose afeta crianças, mas atualmente o número de casos em pacientes imunocomprometidos como os que possuem o vírus da doença da imunodeficiência humana (HIV) ou os que tomam fármacos imunossupressores, vem aumentando (GREENE, 2015). O contágio da doença ocorre através da picada do mosquito flebótomo, portanto não é provável que o contato direto com os amastigotas resulte na infecção humana (NELSON; COUTO, 2006). Possuir um cão não quer dizer que seja um risco para infecção humana, mas também essa hipótese não pode ser excluída (GREENE, 2015).

3. RELATO DE CASO

Um cão da raça Pug, de um ano e oito meses de idade, foi encaminhado ao Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias, da UFPB, Areia-PB, por um médico veterinário. O animal estava apresentando aumento de volume da conjuntiva bulbar medial bilateralmente, diminuição do apetite, epistaxe e claudicação do membro direito há três meses.

O animal estava sendo medicado com doxiciclina (10 mg/kg, BID, VO) e omeprazol (0,7 mg/kg, SID) há 30 dias, por causa de uma trombocitopenia observada em hemograma prévio, sem melhora do quadro clínico. O teste de RIFI e de ELISA para a pesquisa de *Leishmania* spp., requisitados pelo médico veterinário que o encaminhou, foram negativos.

No exame físico geral não foram evidenciadas alterações, além de linfadenomegalia de todos os linfonodos palpáveis. Hiperqueratose e rarefação pilosa na região perianal também foram observadas (Figura 1).

Ato contínuo, o exame oftálmico foi realizado. Foram observados edema e hiperemia da conjuntiva bulbar medial de ambos os olhos, alopecia com hiperqueratose da região periocular bilateral, mais evidente nos cantos laterais das pálpebras (Figura 1). Os reflexos de ameaça e os reflexos pupilares à luz apresentaram-se normais. Os valores do teste da lágrima de Schirmer estavam dentro da normalidade (OE = 19 mm/min; OD = 20 mm/min). A pressão

intraocular de ambos os olhos, aferidas por meio de tonômetro de aplanção (Tono-pen Avia® Reichert), apresentaram-se abaixo dos valores normais (OE = 12 mmHg; OD = 13 mmHg). À oftalmoscopia indireta não foram observadas alterações em fundo de olho.



Figura 2: Região perianal de cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose, apresentando hiperqueratose, alopecia e crostas.



Figura 3: Cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose, apresentando conjuntivas bulbares edemaciadas nas porções mediais, com edema e

neovascularização corneais adjacentes à conjuntiva. Notar alopecia e hiperqueratose no canto palpebral lateral.

No hemograma verificou-se diminuição do número de hemácias sem sinais sugestivos de regeneração, trombocitopenia e leucograma sem alterações (Tabela 1). Foi solicitado apenas dosagem sérica de creatinina onde estava dentro dos valores de referência.

Devido à presença de uveíte anterior bilateral, prescreveu-se pomada de dexametasona a 0,1 %, QID, por 15 dias.

Tabela 1: Hemograma de cão Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose. Observar anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia.

Hemograma		Resultados		Valores de Referência*	
Eritrócitos (10⁶/ uL)		3.98		5,5-8,5	
Hemoglobina (g/dL)		8.1		12-18	
Hematócrito (%)		23.9		37-55	
VCM (fL)		60.1		60-77	
CHCM (%)		33.9		32-36	
Plaquetas (x10³/μL)		151		200-500	
		Valor Relativo (%)	Valor absoluto (/uL)	Valor Relativo (%)	Valor absoluto (/uL)
Leucócitos	totais	9.000		6.000-17.000 uL	
	(/μL)				
Bastonetes	(/μL)	1	90	0-3	0-300
Segmentados	(/μL)	74	6.660	60-77	3.000-11.500
Linfócitos	(/μL)	13	1170	12-30	1.000 a 4.800
Eosinófilos	(/μL)	4	360	2-10	100-1.250
Monócitos	(/μL)	8	720	3-10	150 a 1.350
Basófilos	(/μL)	0	0	0	Raros

*Fonte: JAIN, 1997

O animal retornou após 21 dias e foi submetido a um novo hemograma evidenciando a persistência de anemia arregenerativa e trombocitopenia. No leucograma foi observado leucopenia com eosinopenia (Tabela 2). Dentre as dosagens séricas realizadas, ALT e FA mostraram-se elevadas (Tabela 3).

Tabela 2: Hemograma de cão Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose, aos 21 dias após o primeiro atendimento, ainda apresentando anemia normocítica e hipocrômica, trombocitopenia e leucopenia com eosinopenia e linfopenia.

Hemograma	Resultados			Valores de Referência*			
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	3.93			5,5-8,5			
Hemoglobina (g/dL)	8.2			12-18			
Hematócrito (%)	27			37-55			
VCM fL	70.9			60-77			
CHCM (%)	29.4			32-36			
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	198			200-500			
	Valor Relativo (%)	Valor (uL)	absoluto	Valor (%)	Relativo	Valor (uL)	absoluto
Leucócitos totais (μL)	4.5			6.000-17.000 UI			
Bastonetes (μL)	2	90		0-3	0-300		
Segmentados (μL)	77	3.465		60-77	3.000-11.500		
Linfócitos (μL)	14	630		12-30	1.000 a 4.800		
Eosinófilos (μL)	1.8	45		2-10	100-1.250		
Monócitos (μL)	4.0	270		3-10	150 a 1.350		
Basófilos (μL)	0	0		0	Raros		

*Fonte: JAIN, 1997.

Tabela 3: Dosagens séricas de exames bioquímicos de um cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade com leishmaniose.

Bioquímico	Resultados	Valores de Referência*
ALT (U/L)	145	0-102
FA (U/L)	220	0-156
Creatinina (mg/dL)	0,72	0,5-1.5
Uréia (mg/dL)	22,3	21-60
Glicose (mg/ dL)	63,3	65-118

*Fonte: JAIN, 1997.

Ao exame oftálmico foi observada úlcera de córnea no olho direito e PIO normais em ambos os olhos (OE = 26 mmHg; OD = 25 mmHg). As alterações conjuntivais permaneciam, apesar do tratamento tópico com pomada de dexametasona. Devido à persistência dos sinais oculares, da trombocitopenia e das demais alterações inespecíficas nos exames laboratoriais, a suspeita de leishmaniose não foi descartada, apesar dos testes de RIFI e ELISA terem se revelado negativos.

Desta maneira, foi realizada coleta de células conjuntivais com auxílio de escova para citologia esfoliativa (Escova cervical descartável estéril® - Labor Import). Esfregou-se a escova na conjuntiva bulbar edemaciada (Figura 3) e no

saco conjuntival após dessensibilização com colírio anestésico à base de cloridrato de proximetacaína (Anestalcon® - Alcon). O material foi distribuído em lâmina de vidro e corado com Panótico.

Realizou-se ainda um exame parasitológico de sangue periférico colhido por meio de punção de capilares do pavilhão auricular. O sangue foi distribuído em várias lâminas de vidro e corado com Panótico.

Uma amostra de sangue total, congelada a -80°C foi enviada para a realização de PCR em tempo real para pesquisa de *Leishmania* spp., cujo resultado foi negativo para a doença.

Um fragmento da conjuntiva bulbar também foi coletado, a fim de se obter mais uma amostra para a pesquisa de *Leishmania* spp. e de outras alterações teciduais que pudessem coexistir (Figura 4).

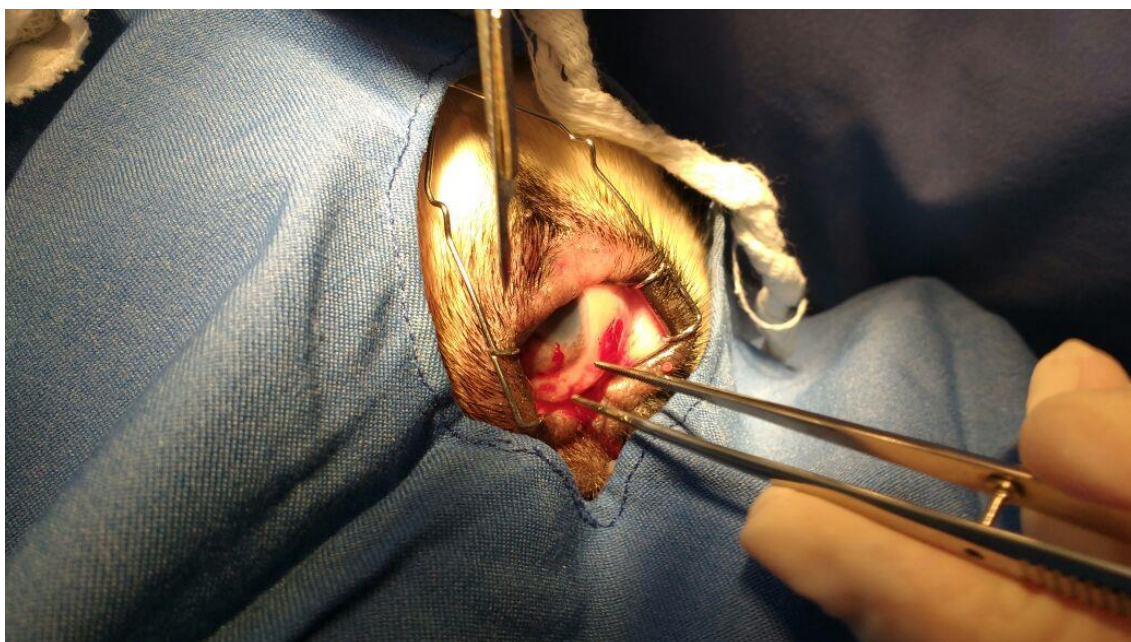


Figura 4: Procedimento cirúrgico para a realização da biópsia da conjuntiva bulbar de um cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose.

Para tanto, o cão foi submetido à anestesia geral. A medicação pré-anestésica consistiu de acepromazina (0,05mg/kg) associada com morfina (0,3mg/kg), por via intramuscular. A anestesia foi induzida e mantida com propofol, na dose de 4mg/kg, por via intravenosa.

Neste dia foram prescritos timomodulina (Leucogen® - Aché), 80mg/kg, BID, durante 30 dias, silimarina (Silimalon180mg® - Nikkho), uma cápsula, SID, 30 dias e colírio de ofloxacino 0,3% (Oflox® - Allergan), TID, no OD, por 15 dias, como tratamento paliativo das alterações até então observadas.

Formas amastigotas dentro de macrófagos foram observadas no esfregaço de sangue periférico (Figura 5) e na citologia conjuntival (Figura 6), confirmando o diagnóstico de leishmaniose. O exame histopatológico da conjuntiva bulbar também revelou formas amastigotas do parasita dentro de macrófagos teciduais (Figura 7).

Após alguns dias o cão retornou ao Hospital Veterinário para refazer hemograma e bioquímicos antes de iniciar o tratamento da doença. No hemograma foi observado anemia não regenerativa, normocítica e normocrômica e trombocitopenia. No leucograma havia linfopenia com monocitose e eosinopenia (Tabela 4). As dosagens séricas de ALT, FA, creatinina apresentaram-se dentro dos valores de referência de normalidade para a espécie (Tabela 5).

Finalmente, foi estabelecido um protocolo terapêutico para o animal utilizando domperidona na dose de 0,5mg / kg, BID, por via oral, juntamente com alopurinol, na dose de 13mg/ kg, BID, por via oral e aplicação de vacina (Leish-Tec® - Hertape Saúde Animal) composta por antígeno de *Leishmania* spp. produzidas em *Escherichia coli*, sob a forma de proteína recombinante. Duas doses de vacina foram aplicadas a cada 21 dias, totalizando três aplicações e o animal está utilizando coleira antiparasitária.

Tabela 4: Hemograma de cão Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose, aos 51 dias após o primeiro atendimento, ainda apresentando anemia normocítica hipocrômica e trombocitopenia, linfopenia, monocitose e eosinopenia.

Hemograma		Resultados		Valores de Referência*			
Eritrócitos (10^6/ uL)		3,55		5,5-8,5			
Hemoglobina (g/dL)		7,3		12-18			
Hematócrito (%)		24		37-55			
VCM fL		69.2		60-77			
CHCM (%)		29,7		32-36			
Plaquetas ($\times 10^3$/μL)		145		200-500			
		Valor Relativo (%)	Valor absoluto (uL)	Valor Relativo (%)	Valor absoluto (uL)		
Leucócitos	totais		11.3		6.000-17.000 UI		
	(/μL)						
Bastonetes ($\times 10^3$/μL)		0		0-3			
Segmentados (/μL)		77		60-77			
Linfócitos (/μL)		9		1.000 a 4.800			
Eosinófilos (/μL)		3		100-1.250			
Monócitos (/μL)		11		150 a 1.350			
Basófilos (/μL)		0		Raros			

*Fonte: JAIN, 1997.

Tabela 5: Dosagens séricas de um cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade, com leishmaniose. De acordo com os valores de referência, notar ausência de alterações.

Bioquímico	Resultados	Valores de Referência*
ALT (U/L)	92	0-102
FA (U/L)	48	0-156
Creatinina (mg/dL)	1,05	0,5—1.5
Uréia (mg/dL)	34.4	21-60

*Fonte: JAIN, 1997.

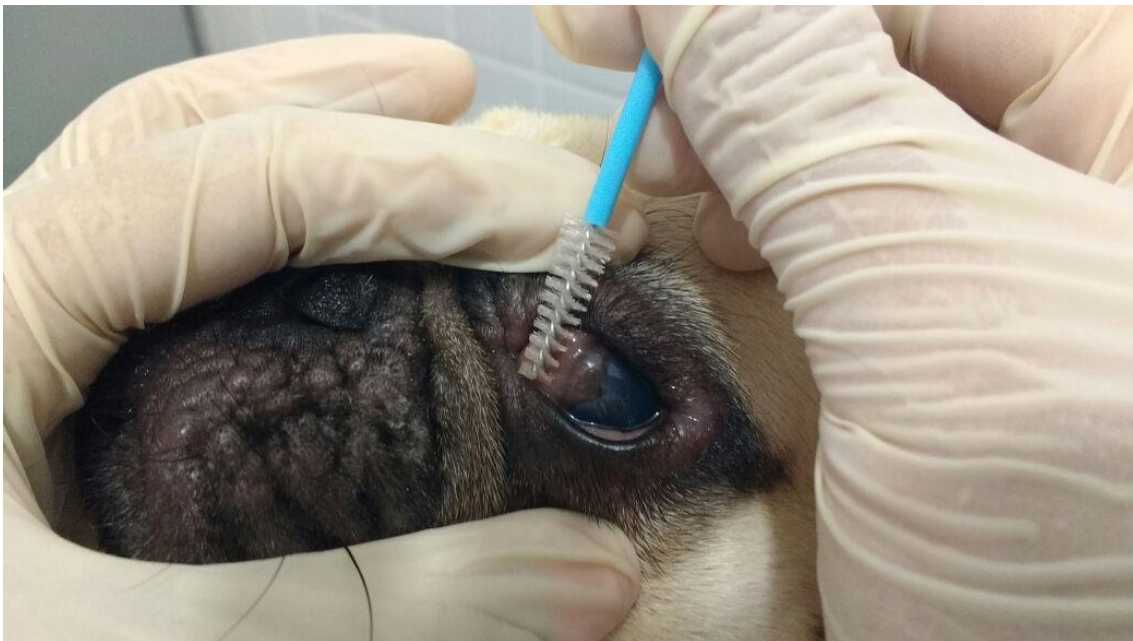


Figura 5: Citologia esfoliativa da conjuntiva bulbar medial de cão Pug de um ano e oito meses de idade, com leishmaniose.

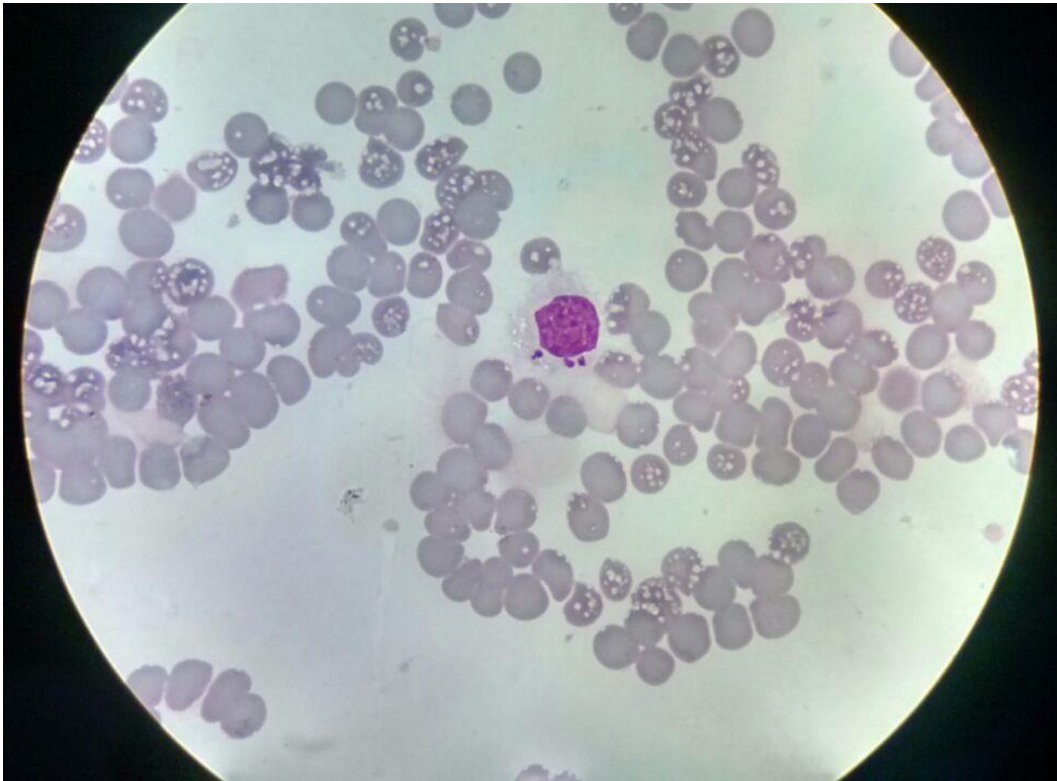


Figura 6: Formas amastigotas de *Leishmania* spp. no citoplasma de um macrófago, em citologia de sangue periférico (ponta de orelha) de cão Pug, um ano e oito meses de idade. Coloração Panótico, aumento 100X.

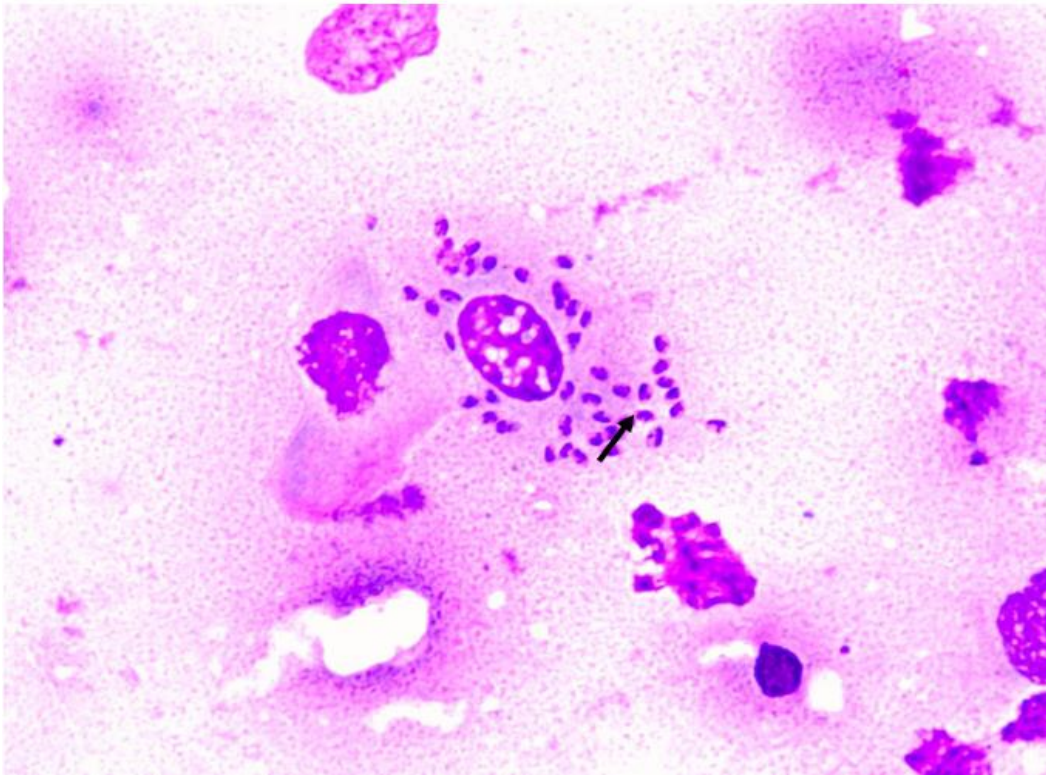


Figura 7: Formas amastigotas (seta) de *Leishmania* no citoplasma de macrófago na citologia esfoliativa de conjuntiva bulbar de um cão Pug, um ano e oito meses de idade. Coloração Panótico, aumento 1000X.

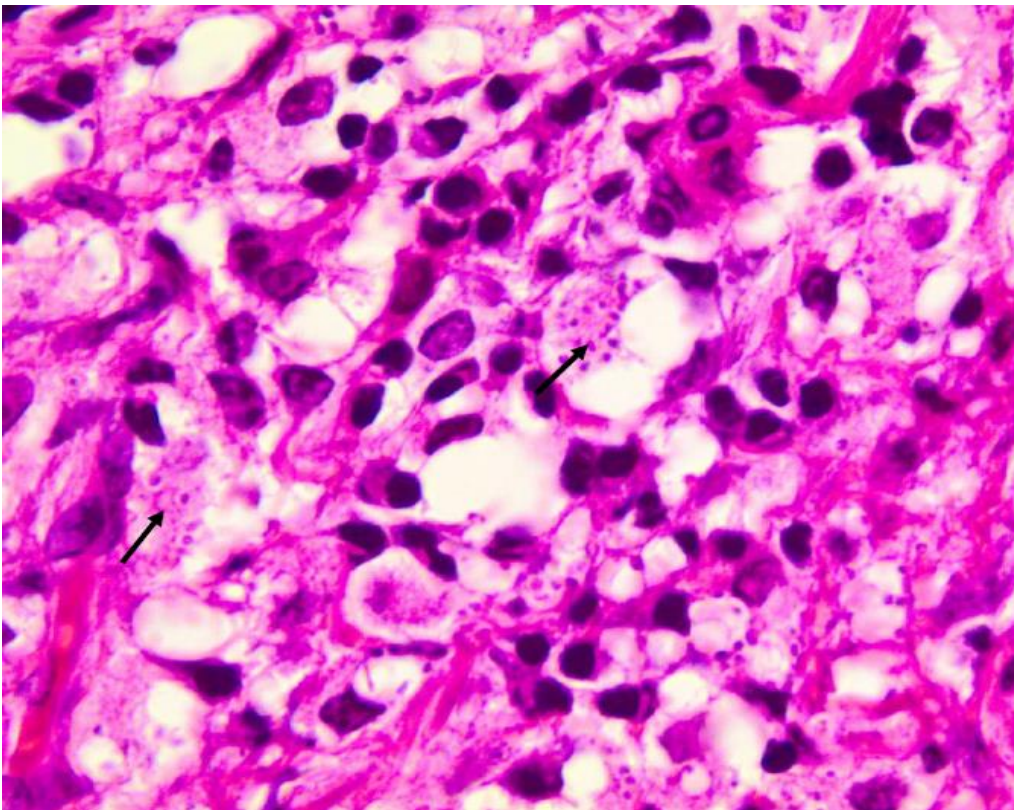


Figura 8: Fotomicrografia de corte histológico de conjuntiva bulbar de um cão da raça Pug, um ano e oito meses de idade. Observar as formas

amastigotas (seta) de *Leishmania* spp. no citoplasma dos macrófagos.
Coloração Hematoxilina & Eosina, 1000x.

4. DISCUSSÃO

Os sinais clínicos encontrados no cão do presente relato, bem como seus achados laboratoriais, estão dentre os sinais da leishmaniose observados por inúmeros autores, a epistaxe (FERRER, 1999), a claudicação (GIMÉNEZ; MENÉNDEZ, 2005), a alopecia periocular (GREENE, 2015).

No animal do relato diversos sinais oculares foram observados, corroborando com os achados que a literatura descreve. Além disso, os sinais oculares ocorreram concomitantemente com outros sinais clínicos inespecíficos, tais como a linfadenomegalia, a claudicação e febre, assim como já descrito por outros pesquisadores (CIARAMELLA *et al.*, 1997; PEÑA *et al.*, 2000). Cabral *et al.* (1998) e Solano Gallego *et al.* (2009) descreveram que os sinais clínicos da leishmaniose são altamente variáveis, pois esta doença apresenta diversos mecanismos patogênicos e há uma variada resposta imune por parte do animal infectado. Baneth *et al.* (2008) afirmaram que as lesões oculares estão presentes em 16% a 80% dos cães com sintomatologia clínica de leishmaniose.

As manifestações oculares mais comumente relatadas se deram na conjuntiva (PEÑA *et al.*, 2008), assim como no cão deste trabalho, apesar de Laus (2006) afirmar que a manifestação conjuntival é rara em casos de leishmaniose canina. É importante salientar que o aumento conjuntival acentuado, localizado somente na porção medial da conjuntiva bulbar, constitui uma aparência clínica atípica nunca relatada por outros pesquisadores.

KOUTINAS *et al.* (1999) afirmaram que anemia normocítica normocrômica é observada com frequência na leishmaniose, associando-a à hipoplasia medular, deficiência de eritropoetina, inflamação crônica ou até mesmo a sangramentos causados pela doença. De acordo com Thrall *et al.* (2015), os hemoparasitas causam anemia devido à hemólise extravascular imunomediada, os anticorpos agem contra os microorganismos, ligando-se aos eritrócitos, resultando em fagocitose pelos macrófagos.

No animal do relato foi observado monocitose, diferindo com relação ao número de eosinófilos e de linfócitos citados pela literatura. A resposta leucocitária se modifica de acordo com a evolução da doença, e por diversos fatores como o estado imunológico do animal, a gravidade dos sinais clínicos e

presença de quadros infecciosos ou parasitários associados. Por este motivo, foi prescrito a timomodulina, como um agente estimulador do sistema imunológico, baseando-se em estudos prévios (SANTOS, 2010) que obtiveram bons resultados com o uso desta medicação em animais leucopênicos. Em relação aos leucócitos a resposta varia, podendo-se observar leucopenia, com maior frequência, como também leucocitose (COSTA, 2014). Ciaramella *et al.* (1997) relataram leucopenia e trombocitopenia, mas também leucocitose com eosinopenia. Neste Pug foi observado leucopenia com linfopenia. Alvar *et al.* (2004) justificam a leucopenia afirmando que os leucócitos podem migrar para sítios inflamatórios. Medeiros *et al.*, (2008), observaram monocitose, eosinofilia e linfocitose.

Os aumentos das enzimas hepáticas ALT e FA, observados no animal em questão, também foram relatados em estudos realizados por Costa (2014) e por Marquês (2008) devido a lesão hepática (OLIVEIRA *et al.*, 1993). Ciaramella *et al.* (1997) referem aumento das enzimas hepáticas em apenas 16% dos animais com leishmaniose. Devido às alterações hepáticas, o cão relatado foi tratado com silimarina, que proporciona efeito estimulante e protetor específico das células hepáticas, acelerando o processo regenerativo celular, resultando em recuperação das hepatopatias (SCHOSSLER *et al.*, 1998).

Neste trabalho, o resultado do PCR em tempo real, de uma amostra de sangue total, se mostrou negativo, assim como também os testes sorológicos (RIFI e ELISA). Este fato vem confirmar a importância de se realizar múltiplas formas de diagnóstico para a leishmaniose. Não se pode descartar a doença sem a execução de exames com maior especificidade como o exame parasitológico. A técnica molecular de reação em cadeia de polimerase (PCR) pode ser realizada como diagnóstico da leishmaniose, porém um único resultado negativo não deve descartar a doença. Acrescenta-se a este fato, a possibilidade de que resultados conflitantes em amostras de diferentes locais de um mesmo animal possam ocorrer (MAIA; CAMPINA, 2008).

No parasitológico de sangue periférico foram encontradas formas amastigotas de leishmaniose, confirmando a doença e corroborando com estudos que também observaram estas formas do parasita em vários

leucócitos circulantes (neutrófilos, monócitos, macrófagos) e também livres no sangue (GIUDICE; PASSANTINO, 2011). Contudo, a desvantagem deste método de diagnóstico, como afirmado por ALVAR *et al.*, (2004), é a difícil visualização do parasita em cães sem sintomatologia clínica.

O exame parasitológico realizados no sangue periférico, na citologia conjuntival, bem como na biopsia conjuntival deste cão foram positivos para a leishmaniose, o animal não foi submetido à aspiração de linfonodos e de medula óssea, que seriam as próximas etapas do diagnóstico corroborando com Alvar *et al.*, (2004) onde descrevem que a observação de formas amastigotas também pode ser feita em sangue periférico, medua óssea, fragmentos de pele e linfonodos de animal infectado.

O diagnóstico parasitológico é considerado um exame de suma importância, onde se observam formas amastigotas de *Leishmania*, podendo ser executado como citologia aspirativa de diversos órgãos e em biópsia hepática (SCHIMMING; SILVA, 2012). Peña *et al.* (2000) e Pilatti *et al.* (2009) já haviam citado a identificação do organismo em espécimes citológicos de raspado conjuntival como uma forma de diagnóstico parasitológico da leishmaniose canina. Razeghinejad *et al.*, (2016) observaram formas amastigotas na conjuntiva de um paciente humano. Nos estudos de Peña *et al.* (2008), a conjuntiva foi a estrutura ocular mais comumente envolvida. A única diferença da metodologia aplicada no relato do presente caso clínico, com relação aos autores supracitados, foi a forma de coleta das células conjuntivais, utilizando-se a esfoliação através de escova própria para a citologia.

A uveíte anterior do animal foi tratada com pomada oftálmica à base de dexametasona a 0,1%, baseando-se na já consagrada forma de tratamento destas condições clínicas, onde os corticosteróides são a primeira escolha (NAKAO *et al.*, 2007).

Devido ao animal apresentar ceratite ulcerativa autoinflingida, a corticoterapia tópica foi suspensa e prescreveu-se antibiótico tópico à base de ofloxacino, em forma de colírio. Estudos mostram que o ofloxacino penetra de forma muito mais extensa no globo ocular quando comparada com a ciprofloxacino e possui efeito colateral mínimo (REVIGLIO *et al.*, 2003).

A terapia para o animal em questão foi baseada em referências bibliográficas que descrevem o alopurinol como um fármaco leishmanioestático,

metabolizado pelo parasita para produzir um análogo de iosina, o qual é incorporado por um ácido ribonucleico e leva a alterações na tradução protéica, e à diminuição da multiplicação do parasita (GREENE, 2015).

O tratamento instituído para o animal do presente relato resultou em melhoras corroborando com GÓMES UCHOA *et al.* 2009 onde relata que a domperidona é indicada no tratamento da leishmaniose, pois sua administração pode ser via oral e não foram observados nenhum efeito colateral. Domperidona deve ser administrada na dose 0,5mg/ kg, SID, durante quatro semanas (HMA,2013).

Solano Gallego *et al.*, (2009) onde descrevem que a associação de antimoniato de meglumina com alopurinol é o protocolo terapêutico mais eficaz para leishmaniose canina. A dose recomendada do alopurinol é de 10 mg/kg, BID, por via oral, de acordo com Paradies *et al.* (2012).

O protocolo de tratamento com a vacinação deve contabilizar três doses, aplicadas em intervalos de 21dias, contendo duas doses em cada aplicação (MORENO *et al.*, 2014), tal como foi realizado no cão deste relato. Atualmente, a vacina composta por antígeno de *Leishmania* produzido com *Escherichia coli*, sob a forma de proteína recombinante e comercializada com o nome de Leish-Tec®, é a única vacina licenciada pelas autoridades brasileiras (SILVA, 2015).

5. CONCLUSÃO

A apresentação atípica do quadro ocular desenvolvido por este cão com leishmaniose vem enriquecer ainda mais a miríade de sinais clínicos apresentados pela doença. O trabalho também revela a importância de se realizar vários meios de diagnóstico, antes de se descartar a doença, enfatizando um método simples e de fácil execução para o diagnóstico parasitológico, que é a citologia conjuntival esfoliativa.

6. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S.; GOLDENBERG, S.; GOLDENBERG, A.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y. EFEITO DA RANITIDINA E DO OMEPRAZOL SOBRE O pH GÁSTRICO EM CÃES. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 14, n.1, jan-mar, 1999.

ADAMAMA-MORAITOU, K.K.; RALLIS, T.S.; KOYTINAS, A.F.; TONTIS, D.; PLEVRAKI, K.; KRITSEPI, M. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 76, n.1, p. 53-57, January. 2007.

AKILOV, O.E.; KACHEMOUNE, A.; HASAN, T. Clinical manifestations and classification of old world cutaneous Leishmaniasis. **International Journal of Dermatology on the go**, Boston, v.46, n. 2, p.132-142, February. 2007.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, [s.l.], v. 57, p. 1-88, 2004.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 106, n. 4, p. 315-324, july. 2002.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 24, n. 7, p. 324–330, july, 2008.

BARATA, R.A.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R. T.; FORTES-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; PAULA, E. V.; PRATA, A.; MONTEIRO, E. M.; DIAS, E. S. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, aug. 2004.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina. Teste Rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para Leishmania. **Bio Manguinhos**, Rio de Janeiro, 2011.

BOGGIATTO, P. M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; METZ, K. GALLUP, J. M.; HOSTETTER, J. M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C. A. Transplacental transmission of leishmania infantum as a means for continued disease incidence in north america. **PLoS. Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 5, n. 4, april. 2011.

BONAGURA, J. D.; TWEDT, D. C. **Kirk's Current Veterinary Therapy XV**. St. Louis: Saunders Elsevier. 2009. 1456p.

CAMBIER, J.; MASSON, M.; DEHEN, H. **Manual de neurologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Medsi. 1999. 590p.

CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; GOMES, S.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v.76, n. 3, p. 173-180, april. 1998.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. **Veterinary Record**, [s.l.], v. 141, p. 539-543, November. 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **COMPENDIUM ON CONTINUING EDUCATION FOR THE PRACTISING VETERINARIAN-NORTH AMERICAN EDITION**. v. 25, n. 5, p. 358-369, 2003.

COSTA, F. A. L.; GUERRA, J. L.; SILVA, S. M. M. S.; KLEIN, R. P.; MENDONÇA, I. L.; GOTO, H. CD4+ cells participate in the nephropathy of

canine visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 33, n. 12, p. 1455-1458, December. 2000.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Teresina, v. 34, n. 2, p. 223-228, mar-abr, 2001.

COSTA, F.A.L., GOTO, H., SALDANHA, L.C.B., SILVA, S.M.M.S., SINHORINI, I.L., SILVA, T.C., GUERRA, J.L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, São Paulo, v.40, n. 6, p. 677-684, November, 2003.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Bahia, v. 75, n. 1, p. 3-17, jan-jun. 2005.

COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l], v.44, n.2, p.232-242, mar-abr. 2011.

COSTA, M. P. **AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA DE SANGUE E MEDULA ÓSSEA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE POR HEMOPARASITAS**. Belo Horizonte, 2014. 82p. Dissertação (Mestrado em ciência animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

DESJEUX, P. Human Leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Statistics**, Geneva, v. 45, n. 2-3, p. 267-275, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases**, [s.l], v.27, p. 305–318, 2004.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 7. ed. Saunders Elsevier. 2010. 2208p.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; BONELLO, F. L.; CIARLINI, P. C.; GONÇALVES, M. E.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V. Avaliação líquórica de cães, com ou sem sintomatologia neurológica, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 11, n. 2, p. 61-69, 2005.

FERRER, L. **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM**. Barcelona. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Barcelona: Hoechst Roussel Vet, 1999, p. 6-10.

FERNANDEZ-BELLON, H.; SOLANO-GALLEGO, L.; BARDAGI, M.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v.135, n. 2, p. 181–185, January. 2006.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**, 4 ed. São Paulo: Ícone editora LTDA. 2004, 607p.

FUNED. Fundação Ezequiel Dias. Funed valida teste mais rápido para leishmaniose visceral canina. **FUNED**, Minas Gerais, 2010. Disponível em: <http://www.isaude.net/pt-BR/noticias/6636/geral/funed-valida-teste-mais-rapido-para-leishmaniose-visceral-canina.htm>. Acesso em: 19 junho de 2016.

GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D.; SERRANO, F. J.; ALONSO, C.; NIETO, C. G. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s.l.], v. 18, n. 12, p. 617-623, december.1996.

GIMÉNEZ, A.A.; MENÉNDEZ, N.C. Leishmaniosis canina: modelos radiográficos de las lesiones óseas y articulares en la leishmaniose canina. **Información Veterinaria: Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España**, [s.l.], v. 8, p. 34-38, 2005.

GIUDICE, E; PASSANTINO, A. Detection of Leishmania amastigotes in peripheral blood from four dogs — Short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, [s.l], v. 59, n. 2, jun. 2011.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitologic**, [s.l], v. 181, n. 1, p. 23 – 30, september, 2011.

GREENE, C.E. *Doenças Infeciosas em cães e gatos*. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2015. 1354p.

GÓMEZ-OCHOA, P.; CASTILLO, J.A.; GASCÓN, M.; ZARATE, J.J.; ALVAREZ, F.; COUTO, C. G. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. **The Veterinary Journal**, [s.l], v. 179, n. 2, 259–263, february. 2009.

HEADS of medicines agencies (HMA), 2013. Veterinary MRIndex: Leis-guard 5 mg/ml Oral Suspension for Dogs, <http://mri.medagencies.org/download/>, ES V 0170 001 FinalPI.pdf. Acesso em 20 abril de 2016.

JAIN, N.C. **Hematologia Veterinaria**. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 417 p, 1997.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989– 1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, Colorado, v. 35, n. 5, p. 376–383, September/October 1999.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Rio Grande do Sul, v. 37, n. 3, p. 907-910, junho. 2007.

LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B.; DA SILVA, R. C.; CASTRO, A. P. B.; PAES, A. C. American visceral leishmaniasis: **A case report. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases** , Botucatu, v. 11 n. 3 p. 360-371, july/ sept. 2005.

LAUS, J. L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e em gatos**. 1. Ed. São Paulo: Roca. 2007. 230 p.

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral canina. **Bepa**, São Paulo, v.67, n. 6, p.13-23, 2009.

LEISHMAN, W.B. On the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India. **British Medicine Journal**, [s.l], v. 1, n. 2213, p. 1252-1254, may. 1903.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, [s. l], v. 42, p 43-53, 2004.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALES, M.; GINEL, P. J.; MARTIN, E.; MOLLEDA, M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Medicine**, [s.l], v. 43, n. 1-10, p. 469-474, January-December . 1996.

MAIA, C.; CAMPINO, C. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, [s.l], v.158, n. 4, p. 274–287, december. 2008.

MARQUES, M.I.L.M. **LEISHMANIOSE CANINA**. Lisboa, 2008. 150p. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

MARTIN-SANCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUNOZ-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in

cats: epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 145, n. 3-4, p. 267–273, april.2007.

MEDEIROS, C. M. O.; MELO, A. G. C.; LIMA, A. K. F.; SILVA, I. G.; OLIVEIRA, L. C.; SILVA, M. C. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de fortaleza, ceará. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 18, n. 1, p. 43-50, jun 2008.

MEREDITH, S.E.; KROON, N.C.; SONDRORP, E.; SEAMAN, J.; GORIS, M. G.; INGEN, C. W. V.; OOSTING, H.; SCHOONE, G. J.; TERPSTRA, W. J.; OSKAM, L. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniases. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 7, p. 1742- 1745, july. 1995.

MICHALICK, M. S. M. **Parasitologia Humana** Gênero Leishmania. 11. ed. São Paulo: Atheneu. 2004. P. 41-46.

MICHALSKY, É. M.; GUEDES, K. S.; SILVA, F.O.L.; FRANÇA-SILVA, J.C.; DIAS, C. L. F.; BARATA, R. A.; DIAS, E. S. Infecção natural de Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis (Diptera: Psychodidae) por Leishmania infantum chagasi em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. [s.l.], v. 44, n. 1, p. 58-62, jan-fev. 2011.

MINISTÉRIO da Saúde, PORTARIA Interministerial de 11 julho de 2008. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html, acessado em 25 de maio de 2016.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis –new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 24, n. 8, p. 371-377, august. 2008.

MORENO J. ; VOULDOUKIS I. ; SCHREIBER P. ; MARTIN V. ; MCGAHIE D. ; GUEGUEN S. ; CUISINIER AM. , Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) produces a cellmediated immune response which is still present 1 year later. **Veterinary Immunology and Immunopathology**; [s.l], vol.158, n. 3-4,p.199-207, 2014.

NAKAO, S.; HATA, Y.; MIURA. M.; NODA, K.; KIMURA, Y. N.; KAWAHARA, S.; KITA, T.; HISATOMI, T.; N, T.; JIN, Y.; DANA, M. R.; KUWANO, M.; ONO, M.; ISHIBASHI, T.; HAFEZI-MOGHADAM, A. Dexamethasone Inhibits Interleukin-1 β -Induced Corneal Neovascularization : Role of Nuclear Factor- κ B-Activated Stromal Cells in Inflammatory Angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, Japão, vol. 171, n.3, p. 1058–1065, september. 2007.

NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; PEÑA, T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, [s.l], v. 133, n. 1, p. 37-47, October. 2005.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**. Germany, p.1-5, 2012.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Manual de medicina interna de pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2006. 1128p.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G.; **MEDICINA INTERNA DE PEQUENOS ANIMAIS**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 1474 p.

NOVO, S. P. C. **Levantamento da fauna de flebotomíneos, vetores de leishmanioses, na Ilha de Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil**. Rio de Janeiro, 2011. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2011.

OLIVEIRA, G. G. S.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Scielo Brasil**, Salvador, v. 88, n. 2, p. 243-248, april-june. 1993.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; JUNIOR, H. F. A., MALAFRONTA, R. S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 87-94, jan. 2007.

PARADIES, P.; SASANELLI, M.; AMATO, M. E. ; GRECO, B, PALO DE P.; LUBAS G. Research in Veterinary Science Monitoring the reverse to normal of clinico-pathological findings and the disease free interval time using four different treatment protocols for canine leishmaniasis in an endemic area. **Research in Veterinary Science**; [s. l] v. 93 n. 2, p. 843-847, 2012.

PEDROSO, T. C. **EFICÁCIA DA DOXICICLINA E DA COMBINAÇÃO COM O DIPROPIONATO DE IMIDOCARB NO TRATAMENTO DE Ehrlichia canis EM CÃES. Campo Grande, 2006. 65 p.** Dissertação (Mestrado em ciência animal), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

PEÑA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, [s.l], v. 3, n. 1, p. 35-41, march. 2000.

PEÑA, M.T.; NARANJO, C.; KLAUSS, G.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G.; DUBIELZIG, R.R. Histopathological features of ocular leishmaniasis in the dog. **Journal of Comparative Pathology**, [s.l], v. 138, n. 1, p. 32–39, January, 2008.

PILATTI, M. M.; FERREIRA, S. A.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S.R. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in Veterinary Science**, [S.L], v. 87, p. 255-257, february. 2009.

PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Clinical aspects of canine leishmaniasis.** Barcelona: Hoechst Roussel Vet, 1999. 105p.

RAZEGHINEJAD, M. R.; MONABATI, A.; KADIVAR, M. R.; ALBORZI, A. Conjunctival leishmaniasis in a case of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Tropical Doctor**, [s.l.], vol.0, n. 0, p. 1-3, February, 2016.

REVIGLIO, V. E.; HAKIM, M. A.; SONG, J. K.; O'BRIEN, T. R.; Effect of topical fluoroquinolones on the expression of matrix metalloproteinases in the cornea. *Biomed*, [s.l.], v.3, n. 10, october, 2003.

ROZE, M. Manifestations oculaires de la leishmaniose canine. *Rec Med Vet Ec Alfort*, v. 162, p. 19-26, 1986

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.S.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.I. 2005. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 73, n. 1, p. 82-86, july. 2005.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies; interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 255-257, January. 1993.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **J. Vector Borne Dis**, [s.l.], v. 45, p. 255–272, december. 2008.

SANTOS, L. M.; ROCHA, J. R.; MERLINI, G. P.; CABRINI, T. M. **QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA NO TRATAMENTO DE MASTOCITOMA DE BOLSA ESCROTAL EM BOXER -RELATO DE CASO. REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA.** Garça, n. 14, p. 1-6, janeiro. 2010.

SILVA, S. R. **Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com Leish-Tec® (Hertape Saúde Animal S/A) para Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae).** Belo Horizonte, 2015. 85p. Tese (Doutorado em ciência) Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz- Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte, 2015.

SOUSA, M. G.; HIGA, A. C.; GERARDI, D. G.; TINUCCI-COSTA, M.; MACHADO, R. Z.; TRATAMENTO DA ERLIQUIOSE CANINA DE OCORRÊNCIA NATURAL COM DOXICICLINA, PRECEDIDA OU NÃO PELO DIPROPIONATO DE IMIDOCARB. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.3, n.2, p. 126-130, 2004.

SCHIMMING, B. C.; SILVA, J. R. C. P. Leishmaniose visceral canina – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, Garça, Ano X, n. 19, p. 1-17, julho, 2012.

SCHOSSLER, D. R.; SCHOSSLER, J. E.; SILVA, C. F. Avaliação clínica e enzimática de cães com hepatite tóxica aguda tratados pela silimarina. **Revista brasileira de Ciências Veterinárias**, Santa Maria, v. 5, n. 3, p. 104-109, set./dez. 1998.

SOLANO- GALLEGO L.; MORELL P.; ARBOIX M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, Barcelona, v. 39, n. 2, p. 560-563, february. 2001.

SOLANO-GALEGO, L; KOUTINAS. A.; MIRO, G.;CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.;OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, [s.l], v. 165, n. 1-2, p. 1-18, October. 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet

guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**. [s.l.], v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011.

SONODA, M. C. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicoepidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, In Biblioteca digital de teses e dissertações, São Paulo, USP, 2007Disponível em:<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-12122007-171752/ptbr.php>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2016.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and vaccine Immunology**, India, v.9, n. 5, p 951-958, sept. 2002.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R.L. **Parasitologia Veterinária**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 742p.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL.; **HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA CLÍNICA VETERINÁRIA**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015. 678 p.

VULPIANI, M.; IANNETTI, L.; PAGANICO, D.; IANNINO, F.; FERRI, N. Methods of Control of the Leishmania infantum Dog Reservoir:State of the Art. **Veterinary Medicine International**, Italy, v. 2011, p. 1-13,may. 2011

WORLD health organization. WHO. *Programmes and projects. Leishmaniasis. Burden of disease*. Disponível em:<<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>> Acessado em: 5 abril. 2016.