

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

HUGO RIBEIRO MORAIS

**Gordura da medula óssea e condição corporal como
parâmetros de negligência na leishmaniose visceral canina**

Araçatuba - SP
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

HUGO RIBEIRO MORAIS

**Gordura da medula óssea e condição corporal como
parâmetros de negligência na leishmaniose visceral canina**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientadora: Prof. Dra. Gisele Fabrino Machado

Araçatuba - SP
2019

M827g **Morais, Hugo Ribeiro**
Gordura da medula óssea e condição corporal como
parâmetros de negligência na leishmaniose visceral canina /
Hugo Ribeiro Moraes. -- Araçatuba, 2019
72 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Gisele Fabrino Machado

1. Leishmania spp. 2. Maus tratos. 3. Caquexia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

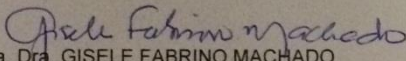
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

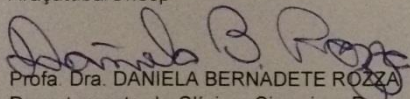
Título: GORDURA DA MEDULA ÓSSEA E CONDIÇÃO CORPORAL COMO PARÂMETROS DE
NEGLIGÊNCIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

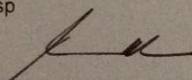
AUTOR: HUGO RIBEIRO MORAIS

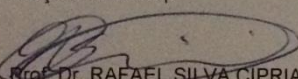
ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

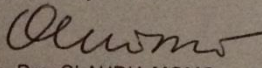
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO
Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - Araçatuba/SP


Profa. Dra. CLAUDIA MOMO
Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

Araçatuba, 31 de maio de 2019.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Gisele Fabrino Machado por me acompanhar durante esses anos, pela disposição, pelos ensinamentos e por me mostrar o vasto caminho da Medicina Veterinária Legal.

À Livia Castanhas Bregano, pela paciência, pelo papel essencial na condução do trabalho, pelo companheirismo e amizade.

À FMVA – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – SP, que mesmo tendo sido minha casa por tão pouco tempo, forneceu tudo que foi necessário para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Setor de Patologia (FMVA/UNESP) e Laboratório de Patologia Aplicada (LAPAP) (FMVA/UNESP) e toda sua equipe, professores e residentes, pelo auxílio nas análises e fornecimento de equipamento e material.

Ao Laboratório de Análise de Alimentos de Origem Animal da FMVA/UNESP, em especial o Dr. Thiago Luís Magnani Grassi e a Prof. Dra. Elisa Helena Giglio Ponsano, pelo material e equipamentos fornecidos e pelo auxílio imprescindível nas análises.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal (FMVA/UNESP) pelo suporte contínuo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa (Processo nº 20160284-9).

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Araçatuba pelo auxílio imprescindível na execução do trabalho e por fornecer a estrutura física.

Aos membros da banca do Exame Geral de Qualificação, Prof. Dra. Daniela Bernadete Rozza e Prof. Dr. Rafael Cipriano por auxiliarem no aperfeiçoamento do trabalho.

À Superintendência da Polícia Técnico Científica do Estado de São Paulo, especialmente o Núcleo de Perícias Criminalísticas de Ribeirão Preto – SP, por acreditar no potencial da pesquisa técnico científica, por compreenderem a importância das ciências veterinárias na elucidação de crimes, representada pela Medicina Veterinária Legal, que se torna cada vez mais uma demanda social.

A meus pais Vânia e José e a meu irmão Henrique por toda a confiança depositada em mim, pela toda força e amor de sempre.

À minha sobrinha Izabel, que nesse finalzinho de doutorado, chegou me ensinando a importância da pureza e simplicidade.

À Bruno, Naldo e Leandro por estarem em todos os momentos, por acreditarem em mim e torcerem para que tudo desse certo.

A todos os meus familiares e amigos que sempre estiveram de braços abertos em todos os momentos, e que contribuíram para que essa caminhada fosse extremamente proveitosa.

A todos os cães que involuntariamente eram parte deste estudo. Todo meu respeito.

MORAIS, H. R. **Gordura da medula óssea e condição corporal como parâmetros de negligência na leishmaniose visceral canina**. 2019. 55 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

Em cães com leishmaniose visceral (LVC), é comum a emaciação corporal crônica, a qual pode caracterizar negligência. Objetivou-se verificar as condições corporais e quantificar gordura de medula óssea (GMO), buscando estabelecer parâmetros que possam caracterizar casos de negligência em cães com LVC. Foram utilizados 39 cães naturalmente infectados e com diagnóstico de LVC, provenientes de Araçatuba/SP. Os animais foram divididos em três grupos: multissintomáticos (MULTI; n=25); oligo/assintomáticos (OLIGO; n=14); o grupo controle (CONT; n=11) foi constituído de cães com sorologia e PCR negativos para LVC. Foi determinado o score corporal e o índice de massa corporal (IMC) por meio da divisão do peso do animal (kg) pelo comprimento da coluna (m). A medula óssea foi colhida de ossos longos (fêmur e úmero), homogeneizada e separada em duas alíquotas para mensuração da gordura, por meio da porcentagem (método Soxhlet) e gordura sobrenadante (mm em tubo de 15mL). O grupo MULTI apresentou score corporal (1,88) inferior ao OLIGO (2,93) e CONT (3,27). O IMC do MULTI (18,33) foi menor que o do OLIGO (28,59). O IMC do CONT foi de 22,92, sem diferença ($p < 0,05$) em relação aos animais positivos. A quantidade de GMO do MULTI foi de 1,6mm e 21,64%, valores inferiores e significativamente diferentes ($p < 0,05$) aos do OLIGO (4mm; 58,47%) e CONT (5,5mm; 64,1%). Portanto, a avaliação macroscópica da GMO e sua quantificação é eficaz na determinação de condições corporais na LVC crônica, podendo ser um parâmetro utilizado em casos de negligência e maus tratos nesta espécie.

Palavras-chave: *Leishmania* spp. Maus tratos. Caquexia.

MORAIS, H. R. **Bone marrow fat and body condition as negligence parameters in canine visceral leishmaniasis**. 2019. 55 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

In dogs with visceral leishmaniasis (CVL), chronic body wasting is common, which may characterize neglect. The objective was to verify body conditions and quantify bone marrow fat (BMF), seeking to establish parameters that can characterize cases of neglect in dogs with CVL. 39 naturally infected dogs with a diagnosis of leishmaniasis from Araçatuba/SP were used. The animals were divided into three groups: multisymptomatic (MULTI; n=25); oligo/asymptomatic (OLIGO; n=14); the control group (CONT; n=11) consisted of dogs with negative serology and PCR for CVL. Body score and body mass index (BMI) were determined by dividing the weight of the animal (kg) by the length of the column (m). The bone marrow was harvested from long bones (femur and humerus), homogenized and separated into two aliquots to measure the fat, by means of the percentage (Soxhlet method) and supernatant fat (mm in 15mL tube). The group MULTI presented lower body score (1.88) than OLIGO (2.93) and CONT (3.27). The BMI of MULTI (18.33) was lower than that of OLIGO (28.59). The BMI of CONT was 22.92, with no difference ($p < 0.05$) in relation to the animals in CVL groups. The amount of BMF in MULTI was 1.6mm and 21.64%, lower and significantly different values ($p < 0.05$) than those observed in OLIGO (4mm; 58.47%) and CONT (5.5mm, 64.1%). Therefore, the gross evaluation of bone marrow fat and its quantification is effective in determining body conditions in chronic CVL and may be a parameter used in cases of neglect and abuse in this species.

Keywords: *Leishmania* spp. Abuse. Cachexia.

SUMÁRIO

	Página
1 CAPÍTULO 1	9
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	9
1.1.1. Complexo Leishmanioses	9
1.1.2. Inanição, emaciação e caquexia	10
1.1.3. Metabolismo de gordura e medula óssea	13
1.1.4. Maus tratos e negligência	19
REFERÊNCIAS	22
2 CAPÍTULO 2	27
2.1. RESUMO	27
2.2. ABSTRACT	28
2.3. INTRODUÇÃO	29
2.4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.4.1. Cães	30
2.4.2. Exame Necroscópico	32
2.4.3. Colheita e avaliação da gordura da medula óssea	33
2.4.4. Análise estatística	35
2.5. RESULTADOS	36
2.6. DISCUSSÃO	43
2.7. CONCLUSÃO	49
2.8. DECLARAÇÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO A	54
ANEXO B	55
ANEXO C	56

1 CAPÍTULO 1

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1.1. Complexo Leishmanioses

A leishmaniose visceral é uma protozoonose negligenciada, veiculada por vetores e considerada uma doença atribuída a países de clima tropical. Embora principalmente distribuída em países pobres do Sudeste Asiático, África Oriental e América Latina, a doença também é endêmica em vários países europeus mediterrâneos, tornando esta parasitose uma doença importante, tanto para habitantes locais como para turistas (PACE, 2014).

As leishmanias são classificadas em dois subgêneros: *Leishmania*, que se encontra nas Américas e no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e a *Viannia*, apenas endêmica no Velho Mundo (WHO, 2010), os quais se diferenciam com base em diferenças dos locais de desenvolvimento dos protozoários no interior do vetor. No trato alimentar do flebótomo, o crescimento de espécies do subgênero *Leishmania* é restrito a partes anteriores ao piloro, na junção do intestino médio e posterior (desenvolvimento suprapilar), enquanto que o das espécies do subgênero *Viannia* ocorre no intestino médio e posterior (desenvolvimento peripilar). O flebótomo fêmea é o único vetor responsável pela transmissão da leishmaniose.

A sobrevivência do parasita depende da transmissão zoonótica ou antroponótica bem-sucedida entre o vetor flebótomo e um mamífero como reservatório. Seres humanos com calazar, leishmaniose cutânea pós calazar e, em menor grau, aqueles com infecção assintomática são os únicos reservatórios em ciclos antroponóticos. A transmissão zoonótica ocorre nos ciclos domésticos, em que o cão é o reservatório principal, ou em ciclos silvestres, como nas florestas tropicais das Américas ou nos desertos da Ásia Central, onde a transmissão enzoótica ocorre entre animais selvagens, com humanos sendo hospedeiros finais se infectados (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008).

A leishmaniose visceral canina é uma doença crônica que pode atingir praticamente todos os sistemas do organismo, com manifestações clínicas que incluem febre, anemia, perda progressiva de peso, linfadenopatia generalizada, hepato e esplenomegalia, lesões cutâneas, alterações renais, digestórias, cardiorrespiratórias, locomotoras, neurológicas e oculares (BANETH et al., 2008; CIARAMELLA et al., 1997; FEITOSA et al., 2000; KOUTINAS et al., 1999; SILVESTRINI et al., 2016; ZOBBA et al., 2017).

A variabilidade e a inespecificidade de sinais clínicos refletem o resultado combinado de uma imunidade celular ineficiente, que leva à inflamação granulomatosa compensatória e imunidade humoral exacerbada, o que resulta na deposição de imunocomplexos em tecidos-alvo e formação de auto-anticorpos (KOUTINAS e KOUTINAS, 2014).

O desenvolvimento de nefropatia é uma das principais causas de morte em animais com leishmaniose e, apesar de ser um processo multifatorial, é, na verdade, o resultado da deposição de complexos imunes nos glomérulos, secundária à antigenemia persistente culminando em glomerulonefrite (ARESU et al., 2012).

O aumento da deposição de tais complexos causada pela resposta imune, a qual provoca a reação de órgãos relacionados ao sistema imunológico (linfadenomegalia e esplenomegalia), também provoca inflamação de tecidos diversos (ex. uveíte, pneumonia intersticial), fazendo com que o tratamento na clínica seja dificultado (ACERO et al., 2015). Ainda segundo estes autores, manifestações cutâneas podem variar de reação nodular localizada a alopecia, úlceras e dermatite, acompanhada de atrofia muscular com emagrecimento, diarreia e onicofrigose.

1.1.2. Inanição, emaciação e caquexia

A produção do fator de necrose tumoral (TNF) ou caquexina e interleucina-1 por macrófagos também é estimulada por imunocomplexos, e em

casos de leishmaniose visceral já é relacionada há tempos como causa do desenvolvimento de subnutrição e de perda de peso em hamsters com leishmaniose visceral (HARRISON et al., 1986; PEARSON et al., 1990; PEARSON et al., 1992; TRACEY e CERAMY, 1992). Ainda segundo os autores, esta perda de peso é progressiva com o decorrer da doença, devido a sua característica catabólica, causando atrofia de miócitos e adipócitos, com consequente liberação de ácidos graxos livres. Conforme a doença avança, o consumo de alimento também decresce, resultando em emaciação, a qual é agravada em cães cujos proprietários possuem baixa renda, os quais geralmente não fornecem alimentação de nível nutricional adequado.

O animal caracterizado como emaciado é aquele que apresenta uma perda grave e difusa de gordura e músculo esquelético. Quando um animal nestas condições é submetido à necropsia, normalmente é procurada a causa da emaciação, e a privação negligente ou intencional de alimentos pode ser uma das suspeitas (GERDIN et al., 2015).

Existe uma associação estatisticamente significativa entre a positividade de *Leishmania* spp na sorologia e na cultura esplênica e a emaciação observada nos cães com leishmaniose (DOS-SANTOS et al., 2008). Entretanto, embora a leishmaniose visceral possa levar à perda de peso e emaciação, outras doenças infecciosas associadas à má nutrição podem contribuir para o agravamento dos sinais (ANDREOTI et al., 2006; BARROUIN-MELO et al, 2006).

Muitos cães com leishmaniose visceral apresentam mioatrofia, inicialmente nos músculos das fossas temporais, seguida, sucessivamente, pelo resto da musculatura do corpo. A atrofia muscular progressiva pode ser mais proeminente nos músculos mastigatórios, e é atribuída à natureza catabólica da doença (FEITOSA et al., 2000; VAMVAKIDIS et al., 2000). Há relatos de casos de miosite em decorrência de leishmaniose visceral (FERRARO et al., 2012; MACRI e GUARDA, 1987; VAMVAKIDIS et al., 2000), geralmente decorrente da presença de amastigotas e deposição de imunocomplexos, ocasionando inflamação, degeneração e fibrose do tecido muscular.

Conforme Freeman (2012), a caquexia, caracterizada como perda de massa corporal magra, desempenha um papel chave para a sobrevivência ou não

dos animais, uma vez que suas manifestações clínicas deletérias (anorexia, perda de peso, má qualidade de vida) podem indicar opção para eutanásia por parte do proprietário, ressaltando a importância da identificação precoce e do tratamento efetivo. Ainda segundo o autor, o aumento das necessidades energéticas, a diminuição da absorção de nutrientes e da ingestão de energia e as alterações no metabolismo são quatro aspectos marcantes na fisiopatologia da caquexia, a qual deve ainda ser melhor estudada em animais domésticos para o desenvolvimento de tratamentos eficazes, já sabido que seu diagnóstico deve ser feito nos estágios iniciais.

A inanição e a má nutrição são termos utilizados muitas vezes como sinônimos, mas existe definição específica para cada termo. A inanição pode ser definida como a privação prolongada de alimento, e seus efeitos mórbidos. Entretanto, a má nutrição, caracterizada pelo fornecimento de quantidades inadequadas de alimento ou baixa qualidade nutricional, pode resultar em efeitos mórbidos semelhantes. Uma das formas mais cruéis de abuso é a inanição, a qual é justificada no caso de doenças crônicas, a menos que o animal se encontre sob atendimento direto ou cuidados do médico veterinário (SINCLAIR; MERCK; LOCKWOOD, 2007).

A inanição refere-se a uma série de restrições energéticas, desde transientes e discretas até a prolongadas e severas, podendo envolver restrição calórica global ou déficit em macronutrientes específicos (proteína, gordura, carboidratos) ou micronutrientes (DEVLIN, 2011), que provoca modificações fisiológicas que podem ser subdivididas em três fases, conforme McCue (2010):

Fase I: Inicia assim que o último alimento é digerido e o corpo entra no estado de pós-absorção, e é de pouca duração. Na prática, é mais a necessidade do cérebro de um suprimento constante de glicose entre as refeições do que uma adaptação à falta de alimentos em longo prazo.

Fase II: Na medida em que as reservas de glicogênio estão completamente esgotadas, a Fase II da inanição se inicia marcada por uma maior mobilização dos estoques de gordura. O metabolismo da gordura libera glicerol e ácidos graxos voláteis, sendo que este fornece substrato para a oxidação beta, formando acetil-CoA que pode ser metabolizado no ciclo do ácido cítrico e

acetoacetil-CoA que pode ser convertido em corpos de cetona para substrato energético do tecido cerebral. Há mudanças fisiológicas profundas, inclusive interferindo na formação de gordura de medula óssea.

Fase III: Se a privação de alimentos for prolongada, as reservas de gordura são exauridas, o cérebro já não pode depender de corpos cetônicos e começa a Fase III da inanição. O organismo utiliza como substrato energético o tecido muscular para que os aminoácidos possam ser convertidos em glicose no fígado para manter a função cerebral. Este processo, por poder levar rapidamente à morte, indica a necessidade de uma forte pressão de seleção favorecendo qualquer adaptação que atrase o início desta fase, e especula-se que a gordura da medula óssea constitui-se em uma destas adaptações.

Há diversas alterações fisiológicas associadas com a inanição e consequente caquexia, como níveis baixos de leptina e/ou estrógeno na circulação sanguínea, resistência ao hormônio do crescimento, diminuição do fator de crescimento da insulina (IGF-1), aumento dos fatores de transcrição para formação de adipócitos (PPAR γ 2) ou combinação de fatores (DEVLIN, 2011).

1.1.3. Metabolismo de gordura e medula óssea

O tecido ósseo e adiposo surge de células tronco mesenquimais, que são ativadas por fatores de transcrição específicos que modulam a expressão do gene alvo. O rastreamento de linhagem genética revela concomitantemente uma fonte não endotelial e não hematopoiética para adipócitos de medula óssea, os quais podem estar implicados em múltiplos processos que interferem na manutenção apropriada do reparo do tecido ósseo e no sistema hematopoiético, por meio da regulação celular da linhagem mesenquimal, a qual afeta, portanto, a morfologia óssea e o microambiente funcional do tecido (AMBROSI et al., 2017).

Além de serem os principais locais de armazenamento de energia, o tecido adiposo tem revelado, durante essas últimas décadas, sua diversidade em relação à sua composição celular, localização anatômica e propriedades

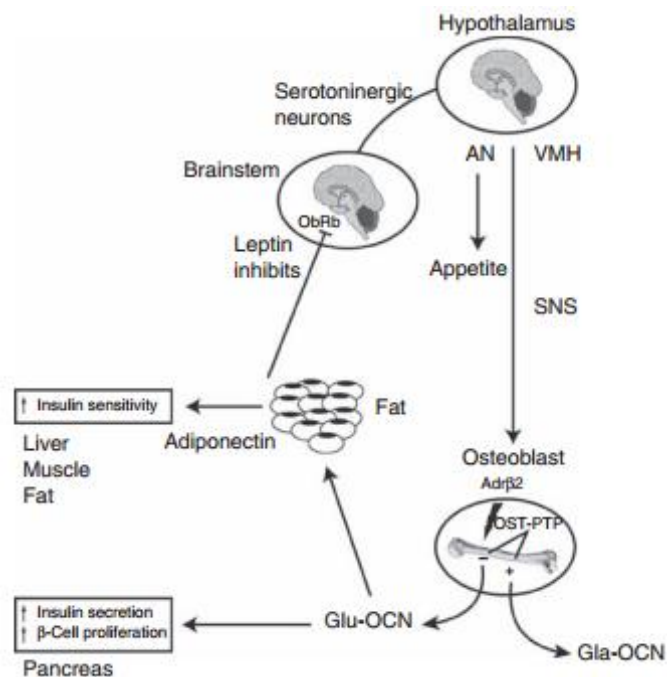
fisiopatológicas. Os adipócitos brancos armazenam o excesso de fornecimento de energia em uma gota de triglicerídeos unilocular para liberar ácidos graxos em períodos de depleção de energia (HARDOUIN; RHARASS; LUCAS, 2016).

Constituído como a gordura corporal mais abundante, o tecido adiposo “branco” de alta densidade é uma reserva de baixo custo energético, servindo também como órgão endócrino, secretor de hormônios que sinalizam o estado energético para o cérebro e regulam o apetite e a sensibilidade à insulina, além de secretar leptina (HAMRICK, 2004; TRAYHURN e BEATTIE, 2001). Este hormônio, com origem em adipócitos e responsável pela saciedade, interfere na remodelação da massa óssea por meio da neuromediação da serotonina e pelo tônus simpático gerado pelo hipotálamo, indicando que a gordura (metabolismo energético) tem um papel no controle da massa óssea (CONFAVREUX, 2011).

Além da sustentação, proteção de órgãos e homeostase de cálcio e fósforo, que constituem as três funções clássicas do tecido ósseo, a remodelação óssea, por meio da osteocalcina, também regula o metabolismo de energia, por meio do controle de secreção e sensibilidade à insulina. Isso se deve ao fato de que o gene da osteocalcina está localizado em uma área genômica que confere risco para diabetes, o que explica a situação de animais deficientes em osteocalcina apresentarem alta glicemia e hipoinsulinemia. Ademais, tal metabolismo de energia afeta os osteoblastos, por meio do controle central da massa óssea, envolvendo neurônios serotoninérgicos, hipotálamo e sistema nervoso simpático (CONFAVREUX, 2011). Tais mecanismos estão indicados na figura 01.

A leptina, por meio da regulação do apetite e do metabolismo energético, fornece *feedback* ao cérebro sobre o armazenamento de energia. Ademais, ela controla a função dos osteoblastos, os quais, por sua vez, controlam o metabolismo energético por meio da osteocalcina, cuja bioatividade é diminuída quando há comprometimento da secreção de insulina, causada também pela leptina (FERNANDES; GONÇALVES; BRITO, 2017). Portanto, a osteocalcina e leptina têm sido associadas à regulação da homeostase de glicose e energia.

Figura 01 - Interações entre o metabolismo ósseo e energético. A leptina inibe a formação óssea por meio de uma transmissão central da serotonina (tronco cerebral para o hipotálamo) e por meio do tônus simpático gerado pelo hipotálamo. Por sua vez, os osteoblastos secretam osteocalcina, um hormônio que regula o metabolismo energético, por meio de sua estimulação na secreção e sensibilidade à insulina. Adrb2, receptor b2-adrenérgico; AN, núcleo arqueado; Gla-OCN, osteocalcina carboxilada; Glu-OCN, osteocalcina não carboxilada; ObRb, receptor de leptina; OST-PTP, proteína tirosina fosfatase osteotesticular; SNS, sistema nervoso simpático; VMH, núcleo hipotalâmico ventromedial.



Fonte: CONFAVREUX (2010)

Segundo Devlin (2011), o baixo nível de leptina é o principal mecanismo que está por trás do acúmulo de gordura na medula óssea, o qual é desencadeado pela inanição; tal achado foi realizado por meio de testes em animais com baixos níveis de leptina e seu receptor, sendo que eles apresentavam maior adiposidade na medula óssea.

Fernandes, Gonçalves e Brito (2017) ressaltam que a interação entre tecido adiposo e ósseo é significativa. Adipocinas como leptina e adiponectina, secretadas por adipócitos, controlam a homeostase de energia, mas também têm ações complexas em células ósseas. A adiponectina é um importante regulador da massa óssea e do metabolismo energético: além de sua capacidade de diminuir a atividade do sistema nervoso simpático, aumentando a massa óssea e diminuindo o gasto energético, também atua diretamente sobre osteoblastos, inibindo sua proliferação e favorecendo a apoptose.

Dietas ricas em gordura resultam na expansão do tecido adiposo da medula óssea e na alteração de seu microambiente, juntamente com ação pró-inflamatória, o que contribui para um efeito negativo no metabolismo ósseo. Atualmente, o meio pelo qual o metabolismo da gordura afeta o tecido ósseo ainda não é clara, e são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos pelos quais ela atua. Estudos sobre o impacto do metabolismo da gordura no metabolismo ósseo também fornecem pistas sobre se as mudanças na composição lipídica da dieta podem ser uma estratégia terapêutica na prevenção de perda óssea (TIAN e YU, 2017).

Ao nascimento, as cavidades dos ossos longos são preenchidas com medula vermelha hematopoiética ativa, composta na sua maioria de células imunes em diferentes estágios de maturação. No momento em que é atingido o pico de massa óssea, o tecido adiposo da medula pode, dependendo do compartimento ósseo, ocupar até 70% do espaço da medula (DEVLIN, 2011; JUSTESEN et al., 2001). Conforme a idade avança, há substituição gradativa da medula óssea vermelha pela amarela, influenciando também nesta mudança e nas alterações de sua composição outros fatores, como câncer, quimioterapia, influência hormonal, radiação e neoplasias malignas hematopoiéticas (GEORGIU; HUI; XIAN, 2012). Segundo Abreu et al. (2011), a medula óssea é um importante órgão hematopoiético

e local de armazenamento de amastigotas em cães infectados por *Leishmania* spp, o que facilita a ocorrência de disfunções na produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Devlin (2011) ressalta que o acúmulo de gordura na medula é correlacionado positivamente com diminuição da hematopoiese.

O desenvolvimento da adiposidade da medula óssea é dependente da idade, gênero e tecido ósseo. O acúmulo de gordura de medula óssea ocorre de forma ordenada e centrípeta: o processo começa nas falanges terminais em torno do nascimento, continua no esqueleto apendicular (da diáfise às extremidades distal e proximal dos ossos longos) e, finalmente, surge no esqueleto axial (HWANG e PANICEK, 2007; SCHELLER e ROSEN, 2014). A adiposidade da medula pode ser patológica em alguns casos, como na osteoporose ou uso de glicocorticóides, mas de efeito neutro ou até benéfico em outras situações, como por exemplo, durante o desenvolvimento puberal normal (DEVLIN et al., 2010).

Segundo Fazeli et al. (2013), em um estudo com roedores, a adipogênese segue um padrão comparável a outros mamíferos. Conforme a idade aumenta, há maior porcentagem de gordura nas cavidades da medula óssea e ocorrem evidentes variações nos níveis de gordura e uma alta correlação positiva entre presença elevada de gordura em medula óssea e o tamanho do animal, com significativa densidade mineral óssea (FAZELI et al., 2013). Bertolo et al. (2015), utilizando diferentes raças caninas, em um estudo para avaliar a habilidade de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea em diferenciarem-se em fenótipos adipogênico, osteogênico e condrogênico, eles observaram que todas as raças avaliadas preservaram o mesmo potencial de diferenciação adipogênica.

A gordura da medula óssea é um tecido dinâmico, cuja massa aumenta durante a inanição, indicando um estado de equilíbrio energético crônico negativo. Em outras palavras, mesmo quando as gorduras subcutâneas e viscerais são consumidas, as reservas adiposas da medula óssea se expandem (DEVLIN et al., 2010). Segundo Devlin (2011), a razão deste aumento do tecido adiposo contido na medula óssea pode ser devida a três fatores: preenchimento em espaços teciduais deixados por células ósseas mortas, consequência patológica da formação óssea suprimida ou uma adaptação para sobrevivência na inanição, sendo este o fator

mais especulativo. Além disso, o acúmulo de gordura na medula é correlacionado positivamente com diminuição da hematopoiese.

Em animais, Meyerholtz et al. (2011) e Gerdin et al. (2015) evidenciam que a mensuração de gordura de medula óssea femoral permite uma avaliação quantitativa do status nutricional. Gerdin et al. (2015) relataram que a atrofia de tal gordura, juntamente com a do omento, pericárdio e perirenal é ocasionada concomitantemente com a perda de gordura e massa muscular corporal em animais com inanição e emaciação, cujos tecidos, em exames histopatológicos, apresentam atrofia do fígado, rins, testículos, glândula tireoide, além de hemossiderose esplênica.

Os adipócitos de medula que se acumulam sob condições fisiológicas ou homeostáticas modulam o tecido ósseo e também a hematopoiese, a qual demanda alto requerimento energético (SCHELLER et al., 2016). Contudo, em caso de prolongada privação de alimento, observa-se a substituição da coloração amarelada da gordura da medula óssea por uma cor acastanhada, devido à atrofia serosa da gordura, de aspecto gelatinoso (STERN, 2013). Segundo Devlin (2011), carência alimentar induz a balanço energético negativo, que provoca as seguintes modificações fisiológicas: redução do gasto de energia e utilização da gordura armazenada como principal fonte de combustível do corpo, em substituição à glicose.

A transformação gelatinosa de gordura de medula óssea, acometendo principalmente indivíduos adultos, é caracterizada por mudanças morfológicas que associam atrofia de adipócitos e perda de células hematopoiéticas, com a deposição de substâncias gelatinosas nos espaços medulares (ex: ácido hialurônico), e é associada com caquexia e inanição, assim como em quadros de anemia e outros estados patológicos, comprometendo a eritropoiese (BÖHM, 2000). Ainda segundo o autor, tais mudanças não são caracterizadas como doença específica da medula, mas um sinal morfológico de doença e estão associadas à perda de peso na maioria dos casos, além de quadros infecciosos, câncer, desordens metabólicas e insuficiência cardíaca.

Em cães com leishmaniose, a proliferação de macrófagos na medula óssea pode causar danos ao mudar a arquitetura desse órgão e ocupar o espaço de

células hematopoiéticas. Do mesmo modo, tais eventos podem prejudicar o funcionamento e a diferenciação desses tipos de células devido à liberação de citocinas, fatores de crescimento e óxido nítrico (MOMO et al., 2014). Ainda segundo os autores, na medula óssea, há interferência na diferenciação celular e ativação de fatores de transcrição, levando à displasia de diferentes linhagens celulares e afetando diretamente a população de células presentes no sangue periférico.

1.1.4. Maus tratos e negligência

A disponibilidade de tratamento é pequena para a leishmaniose visceral canina (BRASIL, 2006), sendo até recentemente proibida no Brasil. Algumas alternativas podem ser buscadas, como melhorar o sistema imunológico do paciente, a nutrição e, definitivamente, informar as autoridades de saúde sobre os casos positivos, evitando o retorno de cães para zonas endêmicas, uma vez que há o risco de serem fonte de parasitas para os vetores (ACERO et al., 2015).

O governo brasileiro, desde 1963, por meio do Decreto-Lei 51.838/63 (BRASIL, 1963), já estabelece as normas técnicas especiais para o combate às leishmanioses, a fim de interromper a transmissão da doença do animal ao homem, e/ou inter-humana, sendo que previa a eliminação de animais domésticos doentes, tipificando em seu artigo 9º o sacrifício sem crueldade.

A portaria interministerial número 1.426/08 (BRASIL, 2008), do Ministério da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), determina a proibição do tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, considerando a falta de eficácia de medicamentos, a possibilidade de manutenção de cães como reservatórios e a indução de cepas de *Leishmania* resistentes.

O Ministério da Saúde brasileiro determina que animais portadores de leishmaniose visceral sejam eutanasiados, ressaltando que, apesar de haver cura clínica, não existe comprovação de cura parasitológica e os cães, além de apresentarem recidiva do quadro clínico após o término do tratamento, permanecem reservatórios da doença (BRASIL, 2006). Recentemente, desde 2016, o tratamento é disponibilizado por meio da portaria interministerial do Ministério da Saúde da Agricultura com o uso do produto Milteforan® (Miltefosina, Virbac), mas ainda de

forma pouco abrangente e possuindo alto custo, além do fato de que se deve respeitar a necessidade de reavaliação clínica dos animais submetidos ao tratamento.

A resolução nº 1000/12 (BRASIL, 2012) do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia, tem em seu artigo 3º a ameaça à saúde pública, no caso da leishmaniose visceral canina, como uma das situações elencadas para adoção da eutanásia como procedimento clínico.

Maiores incidências de casos de leishmaniose são usualmente encontradas em regiões de baixa renda *per capita* (MATHERS; EZZATI; LOPEZ, 2007), geralmente na periferia de municípios. Isso propicia a impossibilidade de proprietários em arcar adequadamente com os custos de manutenção da higiene dos animais, assim como tais regiões peridomiciliares possuem maiores infestações do vetor (PAULAN et al., 2012), e onde a população possui menor escolaridade (MENEZES et al., 2016), favorecendo o aparecimento da doença.

O Decreto 24.645, de 10/07/1934 (BRASIL, 1934), já estabelecia as medidas de proteção aos animais, tipificando em seu artigo 3º as situações que são caracterizadas como maus tratos, dentre elas os atos de abuso e crueldade, lugares impróprios de abrigo, abandono de animais doentes (comum em casos avançados de leishmaniose visceral, quando o proprietário se abstém de realizar o tratamento do cão doente) e não dar morte rápida (sugerindo o uso de métodos adequados de eutanásia, com assistência veterinária integral).

A Lei 9605, de 12/02/1998 (BRASIL, 1998) traz em seu artigo 32 a tipificação de maus tratos e a pena respectiva:

Art. 32. Praticar ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos:

Pena - detenção, de três meses a um ano, e multa.

§ 1º Incorre nas mesmas penas quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos.

§ 2º A pena é aumentada de um sexto a um terço, se ocorre morte do animal.

O estado de São Paulo, a fim de coibir as práticas de maus tratos, inclusive de proprietários com histórico de agressão contra animais, estabeleceu na Lei nº 16.308/2016 (SÃO PAULO, 2016) as penalidades às pessoas que cometerem maus tratos a animais domésticos, determinando o decurso de cinco anos para nova guarda de animal, contando-se a partir do acometimento da infração.

Incorrem, pois, em maus tratos as situações de abuso ocasionadas pela negligência de proprietários no cuidado com o cão acometido de leishmaniose visceral, embora tentem evitar o sofrimento dos animais mediante a não aceitação da eutanásia, o que pode resultar na apresentação de más condições corpóreas e em emaciação. Geralmente, o Centro de Controle de Zoonoses do município, em seu procedimento de rotina, recolhe esse animal e procede à eutanásia, a qual é regulamentada pelas Leis 11.977/05 (SÃO PAULO, 2005) e 12.916/08 (SÃO PAULO, 2008).

REFERÊNCIAS

- ABREU R. T.; CARVALHO, M. G.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; COURA-VITAL, W.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.
- ACERO, V. P.; ÁNGEL, P. B.; FONSECA, E. B.; FERRER, L.; ROURA, X. Canine Leishmaniosis: tools for diagnosis in veterinary practice in Colombia **Rev. MVZ Córdoba**, v. 20, n. 3, p. 4822-4842, 2015.
- AMBROSI, T. H.; SCIALDONE, A.; GRAJA, A.; GOHLKE, S.; JANK, A. M.; BOCIAN, C.; WOELK, L.; FAN, H.; LOGAN, D. W.; SCHURMANN, A. Adipocyte accumulation in the bone marrow during obesity and aging impairs stem cell-based hematopoietic and bone regeneration. **Cell Stem Cell**, v. 20, p. 771–784, 2017.
- ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J.M.; SILVA, E.A.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M.D. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Vet Parasitol** v. 135, p. 375–379, 2006.
- ARESU, L.; BENALI, S.; FERRO, S; VITTONI, V.; GALLO, E.; BROVIDA, C.; CASTAGNARO, M. Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from *Leishmania* seropositive dogs. **Vet Pathol**, v. 50, n. 5, p. 753–760, 2012.
- 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 Parasitol**, v.24, n.7, p.324-330, 2008.
- BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; DE ANDRADE FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIAO, F. S.; FRANKE, C. R.; PALIS AGUIAR, P. H.; DOS-SANTOS, W. L. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Vet J** v. 171, p. 331–339, 2006.
- BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, 2008.
- BERTOLO, A.; STEFFEN, F.; MALONZO-MARTY, C.; STOYANOV, J. Canine mesenchymal stem cell potential and the importance of dog breed: implication for cell-based therapies. **Cell Transplant**, v. 24, p. 1969–1980, 2015.
- BÖHM, J. Gelatinous transformation of the bone marrow. **Am J Surg Pathol**, v. 24, n. 1, p. 56–65, 2000.

BRASIL. Decreto nº 24.645, de 10 de julho de 1934. Estabelece medidas de proteção aos animais. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jul. 1934. Seção 1.

BRASIL. Decreto nº 51.838, de 14 de março de 1963. Baixa normas técnicas especiais para o combate às leishmanioses. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 mar. 1963. Seção 1.

BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 fev. 1998. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006, 120 p.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Dispõe sobre a proibição do tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 jul. 2008. Seção 1.

BRASIL. Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 maio 2012. Seção 1.

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*. **Vet Rec**, v.141, n.21, p.539-543, 1997.

CONFAVREUX, C. B. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. **Kidney Int**, v. 79 (Suppl 121), p. 14–S19, 2011.

CONFAVREUX, C. B. Interactions between bone tissue and energy metabolism. **Joint Bone Spine**, v. 77, p. 287–289, 2010.

DEVLIN, M. J. Why does starvation make bones fat? **Am J Hum Biol**, v. 23, n. 5, p. 577-585, 2011.

DEVLIN, M. J.; CLOUTIER, A. M.; THOMAS, N. A.; PANUS, D. A.; LOTINUN, S.; PINZ, I.; BARON, R.; ROSEN, C. J.; BOUXSEIN, M. L. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 9, p. 2078–2088, 2010.

DOS-SANTOS, W. L. C.; JESUS, E. E.; PARANHOS-SILVA, M.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, J. C.; BALEEIRO, C. O.; NASCIMENTO, E. G.; MOREIRA, E. D.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Vet Immunol and Immunopathol**, v. 123, p. 251–259, 2008.

- FAZELI, P. K.; HOROWITZ, M. C.; MACDOUGALD, O. A.; SCHELLER, E. L.; RODEHEFFER, M. S.; ROSEN, C. J.; KLIBANSKI, A. Marrow fat and bone—new perspectives. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, p. 935–945, 2013.
- FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Clinical aspects from dogs naturally infected with visceral leishmaniasis in Araçatuba, São Paulo State, Brazil. **Clínica Veterinária**, v.5, n.28, p.36-44, 2000.
- FERNANDES, T. A. P.; GONÇALVES, L. M. L.; BRITO, J. A. A. Relationships between bone turnover and energy metabolism. **J Diabetes Res**, v. 2017, Article ID 9021314, 11p, 2017.
- FERRARO, G. C.; MACHADO, G. F.; LAURENTI, M. D.; CAMARGO, M. H. B.; GOMES, A. A. D.; COSTA, D. C.; VIEIRA, C. M.; SIMÕES, C. B.; LIMA, V. M. F.; MARCONDES, M. Alterações eletromiográficas e histopatológicas da musculatura de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. **Braz J Vet Res Anim Sci**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 404-413, 2012.
- FERRON M.; WEI, J.; YOSHIZAWA, T.; FATTORE, A.; DePINHO, R. A.; TETI, A.; DUCY, P.; KARSENTY, P. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. **Cell**, v. 142, p. 296–308, 2010.
- FREEMAN, L. M. Cachexia and sarcopenia: emerging syndromes of importance in dogs and cats. **J Vet Intern Med**, n. 26, p. 3–17, 2012.
- GEORGIU, K. R.; HUI, S. K.; XIAN, C. J. Regulatory pathways associated with bone loss and bone marrow adiposity caused by aging, chemotherapy, glucocorticoid therapy and radiotherapy. **Am J Stem Cells** v. 1, p. 205–224, 2012.
- GERDIN, J. A.; McDONOUGH, S. P.; REISMAN, R.; SCARLETT, J. Circumstances, descriptive characteristics, and pathologic findings in dogs suspected of starving. **Vet Pathol**, v. 53, n. 5, p. 1087-1094, 2015.
- HAMRICK, M. W. Leptin, bone mass, and the thrifty phenotype. **J Bone Miner Res**, v. 19, n. 10, p. 1607–1611, 2004.
- HARDOUIN, P.; RHARASS, T.; LUCAS, S. Bone marrow adipose tissue: to be or not to be a typical adipose tissue? **Front Endocrinol**, v. 7, n. 85, 2016.
- HARRISON, L. H.; NAIDU, T. G.; DREW, J. S.; ALENCAR, J. E.; PEARSON, R. D. Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. **Rev Infect Dis**, v. 8, n. 3, 1986.
- HWANG, S.; PANICEK, D. M. Magnetic resonance imaging of bone marrow in oncology, part 1. **Skeletal Radiol**, v. 36, p. 913–920, 2007.
- JUSTESEN, J.; STENDERUP, K.; EBBESEN, E. N.; MOSEKILDE, L.; STEINICHE, T.; KASSEM, M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. **Biogerontol**, v. 2, p. 165–171, 2001.
- KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*, **Vet Pathol**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

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). **J Am Vet Med Assoc**, v. 35, n. 5, p. 376-383, 1999.

MACRI, B.; GUARDA, F. A case of dermatomyositis due to leishmaniasis in a dog. **Schweiz Arch Tierhailkd**, v. 129, n. 5, p. 265-270, 1987.

MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, n. 2, 2007.

McCUE, M. D. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. **Comp Biochem Physiol**, v. 156, n. 1, p. 1-18, 2010.

MENEZES, J. A.; LUZ, T. C. B.; SOUSA, F. F.; VERNE, R. N.; LIMA, F. P.; MARGONARI, C. Fatores de risco peridomiciliares e conhecimento sobre leishmaniose visceral da população de Formiga, Minas Gerais. **Rev Bras Epidemiol**, v. 19, n. 2, p. 362-374, 2016.

MEYHERHOLTZ, K. A.; WILSON, C. R.; EVERSON, R. J.; HOOSER, S. B. Quantitative assessment of the percent fat in domestic animal bone marrow. **J Forensic Sci**, v. 56, n. 3, p. 775-777, 2011.

MOMO, C.; JACINTHO, A. P. P.; MOREIRA, P. R. R.; MUNARI, D. P.; MACHADO, G., F.; VASCONCELOS, R. O. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Med Internat**, v. 2014, 5p, 2014.

PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect**, v. 69, p. 10-18, 2014.

PAULAN, S. C.; SILVA, H. R.; LIMA, E. A. C. F.; FLORES, E. F.; TACHIBANA, V. M.; KANDA, C. Z.; JÚNIOR, A. C. F. N.; DOBRE, P. R. Distribuição espacial da leishmaniose visceral canina em Ilha Solteira, São Paulo, Brasil. **Eng Agríc Jaboticabal**, v. 32, n. 4, p. 765-774, 2012.

PEARSON, R. D.; COX, G.; EVANS, T.; SMITH, D. L.; WEIDEL, D.; CASTRACANE, J. Wasting and macrophage production of tumor necrosis factor/cachectin and interleukin 1 in experimental visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 43, n. 6, p. 640-649, 1990.

PEARSON, R. D.; COX, G.; JERONIMO, S. M. B.; CASTRACANE, J.; DREW, J. S.; EVANS, T.; ALENCAR, J. E. Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 47, n. 1, p. 8-15, 1992.

SÃO PAULO. Lei nº 11.977, de 25 de agosto de 2005. Institui o Código de Proteção aos Animais do Estado e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 27 ago. 2005, p. 01.

SÃO PAULO. Lei nº 12.916, de 16 de abril de 2008. Dispõe sobre o controle da reprodução de cães e gatos e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 17 abr. 2008, p. 01.

SÃO PAULO. Lei nº 16.308, de 13 de setembro de 2016. Dispõe sobre penalidades às pessoas que cometerem maus tratos a animais domésticos na forma que especifica. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, Acesso em 14 jun. 2018.

SCHELLER, E. L.; CAWTHORN, W. P.; BURR, A. A.; HOROWITZ, M. C.; MACDOUGALD, O. A. Marrow adipose tissue: trimming the fat. **Trends Endocrinol Metab** v. 27, p. 392–403, 2016.

SCHELLER, E. L.; ROSEN, C. J. What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health: marrow adipose tissue and skeletal health. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1311, p. 14–30, 2014.

SILVESTRINI, P.; BATCHELOR, D.; ALLENSPACH, K.; MAUNDER, C.; SETH, M.; MAS, A.; HILL, T.; SERRANO, G.; ROURA, X.; PLANELLAS, M.; GERMAN, A. J.; PASTOR, J. Clinical leishmaniasis in dogs living in the UK. **J Small Anim Pract**, v. 57, p. 453–458, 2016.

SINCLAIR, L.; MERCK, M.; LOCKWOOD, R. Forensic investigation of animal cruelty: a guide for veterinary and law enforcement professionals. **Can J Vet Res**, v. 48, n. 9, p. 941-942, 2007.

STERN, A. W. Starvation due to neglect: a canine case series. **J Veterinar Sci Technol**, v. 4, p. 131, 2013.

TIAN, L.; YU, X. Fat, sugar and bone health: a complex relationship. **Nutrients**, v. 9, n. 506, 17p., 2017.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor in the malnutrition (cachexia) of infection and cancer. **Am J Trop Med Hyg**, v. 47, n. 1, p. 2-7, 1992.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proc Nutr Soc**, v. 60, n. 3, p. 329–339, 2001.

VAMVAKIDIS, C.D.; KOUTINAS, A.F.; KANAKOUDIS, G.; GEORGIADIS, G.; SARIDOMICHELAKIS, M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Vet Rec**, v. 146, n. 24, p. 698-703, 2000.

ZOBBA, R.; EVANGELISTI, M. A.; MANUNTA, M. L.; ALBERTI, A.; ZUCCA, D.; PARPAGLIA, M. L. P. A case of canine neurological leishmaniasis. **Vet Ital**, v. 53, n. 4, p. 321-326, 2017.

2 CAPÍTULO 2 – Gordura da medula óssea e condição corporal como parâmetros de negligência na leishmaniose visceral canina

2.1. RESUMO – Em cães com leishmaniose visceral (LVC), é comum a emaciação corporal crônica, a qual pode caracterizar negligência. Objetivou-se verificar as condições corporais e quantificar gordura de medula óssea (GMO), buscando estabelecer parâmetros que possam caracterizar casos de negligência em cães com LVC. Foram utilizados 39 cães naturalmente infectados e com diagnóstico comprovado de LVC, provenientes de Araçatuba/SP. Os animais foram divididos em três grupos: multissintomáticos (MULTI; n=25); oligo/assintomáticos (OLIGO; n=14); o grupo controle (CONT; n=11) foi constituído de cães com sorologia e PCR negativos para LVC. Foi determinado o *score* corporal e o índice de massa corporal (IMC) por meio da divisão do peso do animal (kg) pelo comprimento da coluna (m). A medula óssea foi colhida de ossos longos (fêmur e úmero), homogeneizada e separada em duas alíquotas para mensuração da gordura, por meio da porcentagem (método Soxhlet) e gordura sobrenadante (mm em tubo de 15mL). O grupo MULTI apresentou *score* corporal (1,88) inferior ao OLIGO (2,93) e CONT (3,27). O IMC do MULTI (18,33) foi menor que o do OLIGO (28,59). O IMC do CONT foi de 22,92, sem diferença ($p<0,05$) em relação aos animais positivos. A quantidade de GMO do MULTI foi de 1,6mm e 21,64%, valores inferiores e significativamente diferentes ($p<0,05$) aos do OLIGO (4mm; 58,47%) e CONT (5,5mm; 64,1%). Portanto, a avaliação macroscópica da GMO e sua quantificação é eficaz na determinação de condições corporais na LVC crônica, podendo ser um parâmetro utilizado em casos de negligência e maus tratos nesta espécie.

Palavras-chave: *Leishmania* spp. Maus tratos. Caquexia.

Bone marrow fat and body condition as negligence parameters in canine visceral leishmaniasis

2.2. ABSTRACT - In dogs with visceral leishmaniasis (CVL), chronic body wasting is common, which may characterize neglect. The objective was to verify body conditions and quantify bone marrow fat (BMF), seeking to establish parameters that can characterize cases of neglect in dogs with CVL. 39 naturally infected dogs with a proven diagnosis of leishmaniasis from Araçatuba/SP were used. The animals were divided into three groups: multisymptomatic (MULTI; n=25); oligo/asymptomatic (OLIGO; n=14); the control group (CONT; n=11) consisted of dogs with negative serology and PCR for CVL. Body score and body mass index (BMI) were determined by dividing the weight of the animal (kg) by the length of the column (m). The bone marrow was harvested from long bones (femur and humerus), homogenized and separated into two aliquots to measure the fat, by means of the percentage (Soxhlet method) and supernatant fat (mm in 15mL tube). The group MULTI presented lower body score (1.88) than OLIGO (2.93) and CONT (3.27). The BMI of MULTI (18.33) was lower than that of OLIGO (28.59). The BMI of CONT was 22.92, with no difference ($p<0.05$) in relation to the animals in CVL groups. The amount of BMF in MULTI was 1.6mm and 21.64%, lower and significantly different values ($p<0.05$) than those observed in OLIGO (4mm; 58.47%) and CONT (5.5mm, 64.1%). Therefore, the gross evaluation of bone marrow fat and its quantification is effective in determining body conditions in chronic CVL and may be a parameter used in cases of neglect and abuse in this species.

Keywords: *Leishmania* spp. Abuse. Cachexia.

2.3. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma antropozoonose que acomete homens, animais domésticos e silvestres. As espécies relacionadas formam o complexo *Leishmania donovani*, composto por *L. donovani* e *L. infantum* (= *chagasi*)^{26,29}. É transmitida principalmente por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, sendo o cão o principal reservatório do parasita na área urbana¹

O Ministério da Saúde brasileiro⁶ determina que animais portadores de leishmaniose visceral sejam eutanasiados devido ao risco de permanecerem como reservatórios da doença. Desde 2016, a Portaria Interministerial do Ministério da Saúde e da Agricultura permite o tratamento individual de cães com o produto MILTEFORAN® (Miltefosina, Virbac), o qual foi registrado para tratamento individual em casos confirmados, respeitando a necessidade de reavaliação clínica.

Há uma grande polêmica na questão da eutanásia de cães positivos para leishmaniose visceral, com regulamentação pelas Leis 11.977/05³⁶ e 12.916/08³⁷. A eutanásia é frequent¹emente não aceita pelos tutores, os quais, muitas vezes, acabam mantendo os animais no domicílio, mas negligenciam no seu cuidado, potencializado pelo fato do alto custo do tratamento. Muitas vezes, a manutenção dos cães nessas situações ocorre até que apresentem condições corpóreas precárias, caracterizadas por lesões e severa emaciação corporal, quando então são encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses – CCZ.

A avaliação de condições corpóreas e orgânicas gerais do animal, como o índice de massa corporal⁸ e a quantidade de gordura de medula óssea de ossos longos^{19,46}, pode servir como parâmetro de referência para avaliação de maus tratos de cães, os quais são caracterizados por situações de abuso, muitas vezes por ignorância, podendo caracterizar crime ambiental.⁵

O presente trabalho propõe verificar as condições corpóreas e avaliar a quantificação de gordura de medula óssea de cães com leishmaniose visceral, buscando estabelecer um parâmetro que possa caracterizar casos de negligência e/ou abuso dos cães.

2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1. Cães

Foram utilizados 50 cães, sendo 33 machos e 17 fêmeas, de 01 a 05 anos de idade, sem raça definida, provenientes de bairros variados de Araçatuba – SP. Trinta e nove dos 50 animais, naturalmente infectados por *Leishmania* spp, foram diagnosticados com leishmaniose visceral por meio de teste sorológico ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para a detecção de anticorpos anti-leishmania, e foram consideradas amostras positivas com densidade óptica acima de 0,270²⁵, além da investigação da presença de DNA do parasito em amostras de baço por qPCR (Real Time Quantitative PCR).¹⁰

Os cães foram divididos em três grupos (Figura 02), de acordo com os sinais clínicos apresentados^{6,27}: 25 cães multissintomáticos (MULTI), 14 cães oligo/assintomáticos (OLIGO) e 11 cães controle com resultados negativos no ELISA e PCR para leishmaniose (CONT).

Cães multissintomáticos (MULTI) foram caracterizados por apresentar alterações orgânicas visíveis e variadas, como lesões cutâneas (dermatite, crostas, úlceras), onicogribose, caquexia, palidez de mucosa (anemia), atrofia muscular, dentre outros sinais clínicos. Cães oligo/assintomáticos (OLIGO) foram categorizados como sem sinais clínicos aparentes ou com sinais discretos da doença, como linfadenomegalia e perda de peso.

Figura 02 – A – Cão com leishmaniose visceral apresentando múltiplos sinais clínicos (multissintomático). Observar pele com áreas de alopecia, crostas e dermatite, além de onicogrifose, caquexia e atrofia muscular. Em B, cão com leishmaniose visceral sem sinais clínicos evidentes ou com sinais discretos da doença (oligo/assintomático).



A



B

Fonte: Imagem registrada pelo autor

O score corporal foi avaliado por meio da classificação Purina²¹, variando de um (1 = muito magro) a cinco (5 = clinicamente obeso) e o índice de massa corporal (IMC) foi calculado por meio da divisão do peso do animal (em kg) pelo comprimento da coluna (em m). As medidas foram realizadas da articulação atlanto occipital até a sacro-ilíaca.⁸

Para melhor caracterizar as condições de higidez dos cães, outros exames complementares foram realizados. Foram colhidas, de maneira asséptica, amostras de sangue de veia jugular, 1mL armazenado em tubo a vácuo com EDTA, para realização imediata de hemograma; e 10mL em tubo sem anticoagulante para a realização do perfil bioquímico e teste ELISA. Após 20 minutos, foi realizada centrifugação (800xg por 10 minutos) dos tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro, que foi separado em alíquotas e armazenado a -20°C. Foram realizados exames bioquímicos de determinação da função renal (ureia/creatinina) para estadiamento da doença.⁴¹

A avaliação bioquímica do sangue foi realizada para verificação da função hepática e renal. Assim, foram utilizados kit comerciais para a determinação da Fosfatase Alcalina LiquiformVet® (1011-4/30); Creatinina KVet® (1010-300); Ureia UV LiquiformVet® (1013-4/50); ALT/GPT LiquiformVet® (1008-4/30); Albumina Vet® (1007-1/250); Proteínas Totais® (99-250) (Labtest Diagnóstica®), de acordo com as recomendações do fabricante.

A sorologia para pesquisa de anticorpos para outros agentes etiológicos foi determinada com testes sorológicos de ELISA para *E. canis* e *Babesia* spp.^{15,42} e RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) para *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*.⁴⁷

2.4.2. Exame Necroscópico

A eutanásia foi realizada no Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba – SP, seguindo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde⁶ e a Resolução Nº 1.000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que dispõe detalhadamente sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Foram utilizados 15-20mg/kg IV de barbitúricos (Thiopental, Cristália Itapira, SP), como recomendado no código de ética para uso

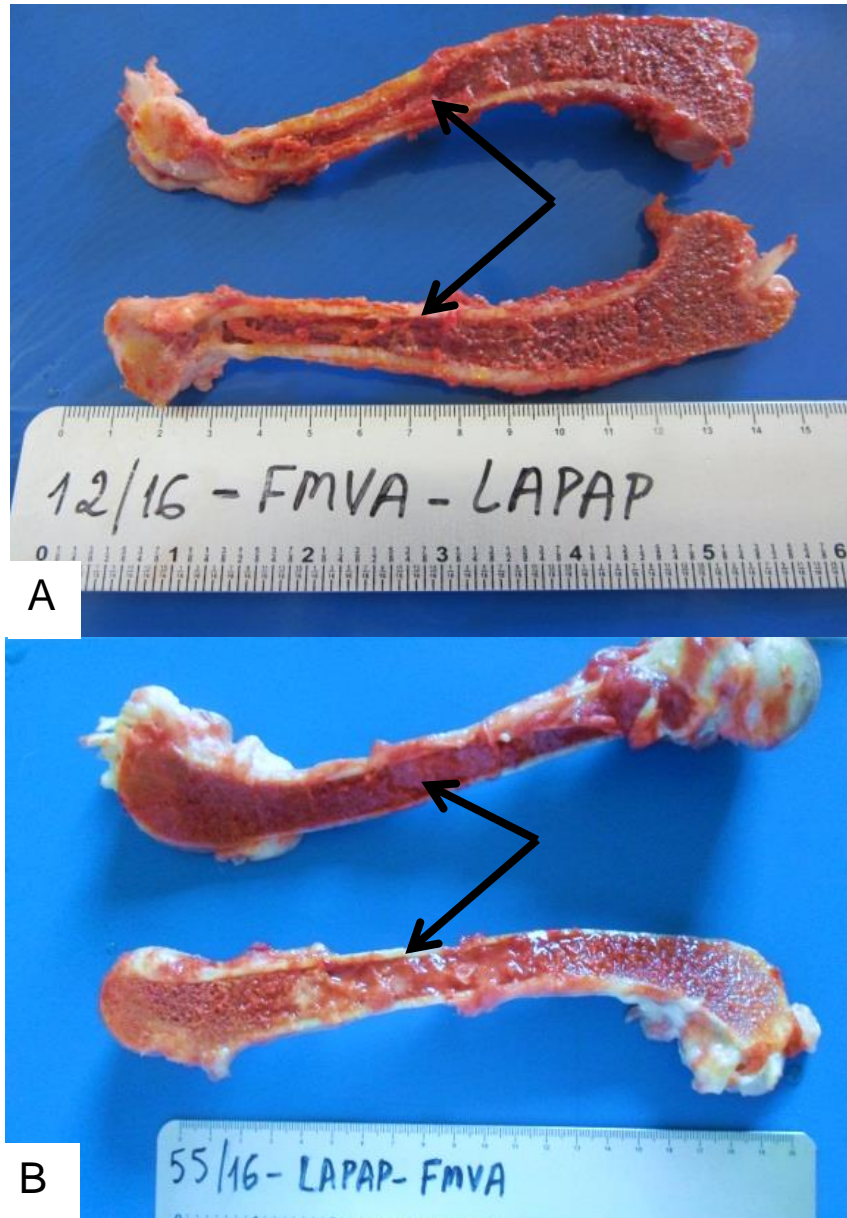
de animais em pesquisa científica (AVMA, 2001), seguido de injeção intravenosa de 100mg/kg IV de cloreto de potássio 19%.

O exame macroscópico do cadáver foi realizado segundo método de rotina, mas sendo dada especial atenção à distribuição e características macroscópicas do tecido adiposo (ex. perirenal, subcutâneo, base do coração) e ao conteúdo gástrico (quantidade, corpos estranhos).

2.4.3. Colheita e avaliação da gordura da medula óssea

De cada animal foram colhidos os ossos longos (fêmur e tíbia) para avaliação morfológica do tecido hematopoiético e adiposo⁴⁶, e pesquisa de atrofia serosa. Foram feitos cortes longitudinais para a colheita da medula óssea e a mesma foi acondicionada em tubos Falcon de 15mL. Em alguns animais foi possível observar já ao exame macroscópico a escassez de tecido adiposo medular (Figura 03), entretanto, devido à subjetividade do exame, foram feitos testes quantitativos. Em alguns animais, devido ao pequeno porte, foi necessária a colheita suplementar de medula óssea dos úmeros, o que não diferencia a porcentagem de gordura, em comparação com o fêmur.²²

Figura 03 – Medula óssea de fêmur de um cão multissintomático (A), onde nota-se a presença de atrofia serosa de gordura de medula óssea (setas). Em B, medula óssea de um cão oligo/assintomático, onde é possível visualizar a gordura macroscopicamente (setas).



Fonte: Imagem registrada pelo autor.

O processamento para quantificação da gordura ocorreu por meio da homogeneização do conteúdo medular em cadinho de porcelana, seguido de colheita de 2g do material, que foi armazenado em *freezer* a -20°C até o momento do processamento, para análise de quantificação de gordura.¹⁹ Outra alíquota, de 3g do mesmo material após a devida homogeneização, foi imersa em 8mL de água destilada em tubos graduados de capacidade de 15mL, sendo posteriormente submetida à centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos.⁴⁶ Após esta etapa, foi medida a altura da gordura sobrenadante do referido tubo, em mm (Figura 04). A amostra de gordura (2g) colhida para quantificação bioquímica foi processada por meio do método de extração de lipídeos baseado na lixiviação exaustiva por meio de solvente orgânico (éter etílico) em aparelho extrator Soxhlet® completo, seguida de remoção por evaporação do referido solvente.¹⁹

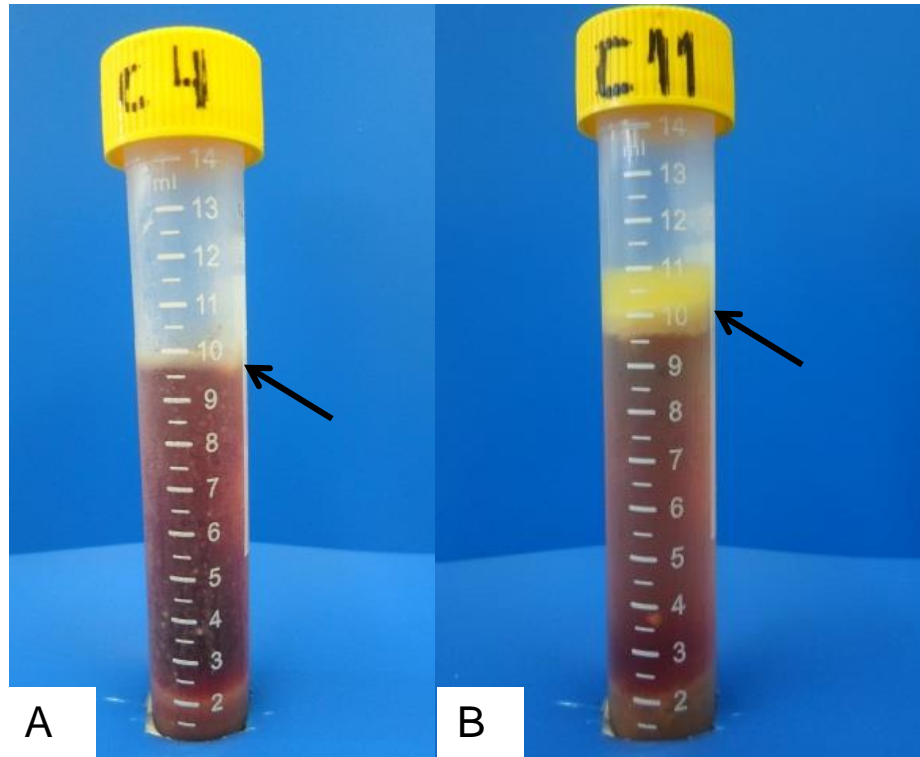
2.4.4. Análise estatística

As diferenças entre os grupos infectados e controle foram determinadas por correlação, avaliada pelo teste de Spearman. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism (v6.05, GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

2.5. RESULTADOS

Com o estadiamento clínico⁴¹, constatou-se que, dentre os cães do grupo MULTI, 44% deles foram clinicamente classificados como estágio 2, seguido de estágio 3 (28%), 1 (24%) e apenas 4% em estágio clínico 4. Dentre os cães do grupo OLIGO, 50% deles encontravam-se clinicamente em estágio 1, seguido de estágio 2 (28,57%), estágios 4 (14,29%) e 3 (7,14%). Esta classificação, que se baseia em sinais clínicos e determinação da função renal dos cães com LV, não foi a utilizada neste estudo para categorização dos animais, visto a dispersão dos valores de IMC e gordura dentre os vários estágios. Com isso, a classificação e separação dos cães MULTI e OLIGO ocorreram por meio de sinais clínicos.^{6,27}

Figura 04 – Gordura sobrenadante em mm (setas) em tubos com amostras homogeneizadas de medula óssea de fêmur de cão multissintomático (A) e oligo/assintomático (B), respectivamente. Nota-se a maior quantidade de gordura sobrenadante em tubos de medula óssea de cães oligo/assintomáticos.



Fonte: Imagem registrada pelo autor.

O *score* corporal médio avaliado foi de 2,48, sendo que os cães do grupo MULTI apresentaram *score* corporal médio de 1,88 (1-3) e portanto inferior ($p < 0,05$) aos cães do grupo OLIGO (2,93) e CONT (3,27), sendo que estes dois últimos não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si (Tabela 01; Figura 05). O IMC médio dos cães do grupo MULTI (18,33) foi menor que o do grupo OLIGO (28,59). O IMC do grupo CONT foi de 22,92 e não apresentou diferença ($p < 0,05$) em relação aos grupos de cães MULTI e OLIGO (Tabela 01; Figura 05).

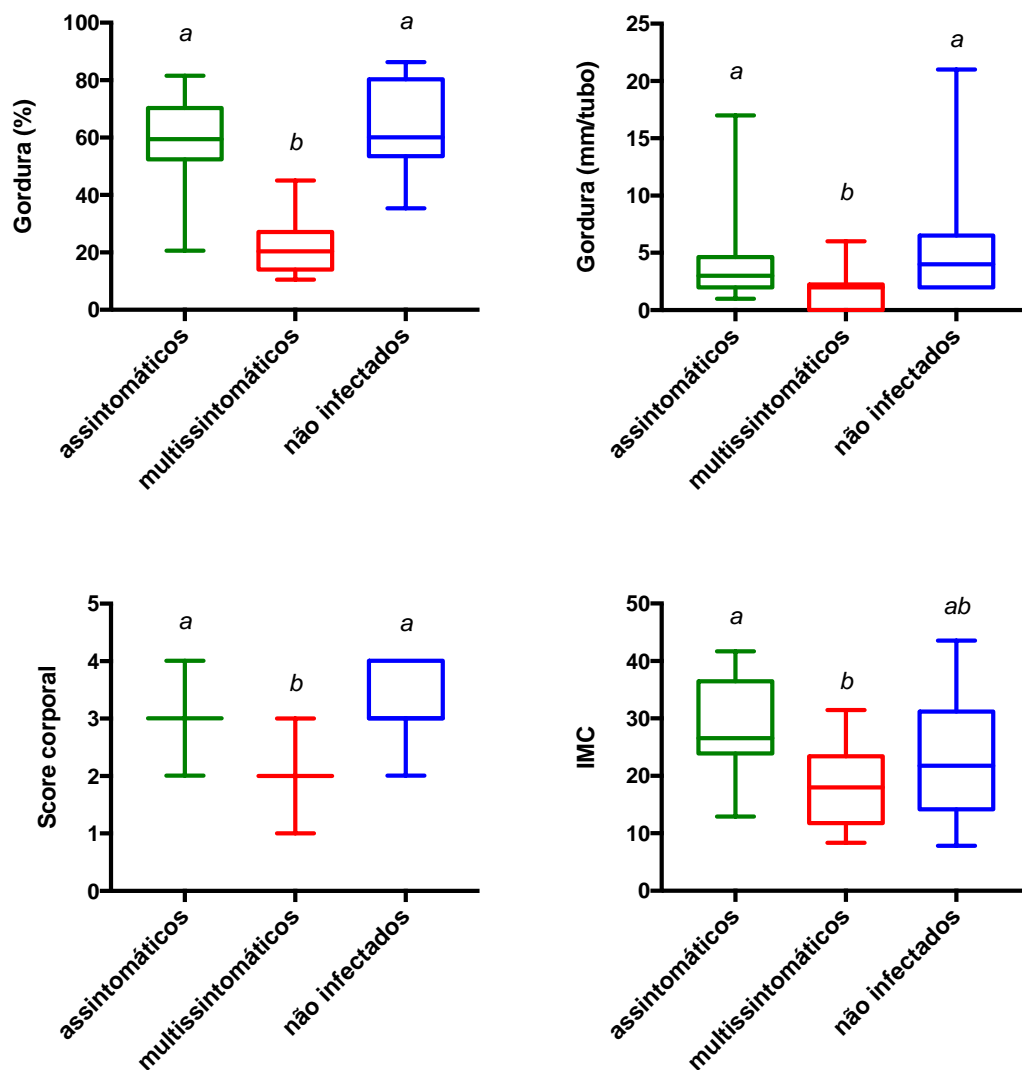
A quantidade de gordura da medula óssea (Tabela 01; Figura 05) do grupo MULTI foi de 1,6 (mm tubo) e 21,64 (em %), respectivamente, portanto inferior ($p < 0,05$) ao observado nos grupos OLIGO (4; 58,47) e CONT (5,5; 64,1). O *score* corporal e os métodos de quantificação de gordura não diferiram entre os cães incluídos nos grupos OLIGO e CONT ($p < 0,05$).

Tabela 01 – Valores médios de gordura, score e IMC de animais multissintomáticos, oligo/assintomáticos e controle para leishmaniose visceral canina.

Cães	Score	Gordura Tubo (mm)	% Gordura	IMC
Multissintomáticos	1,88 ^a	1,6 ^a	21,64 ^a	18,33 ^a
Oligo/Assintomáticos	2,93 ^b	4 ^b	58,47 ^b	28,59 ^b
Controle	3,27 ^b	5,5 ^b	64,1 ^b	22,92 ^{ab}

Obs: Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) e letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), Spearman Test (v6.05, GraphPad, La Jolla, CA, USA). Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 05 – Resultados da quantificação de gordura da medula óssea, representados em relação ao score corporal e ao IMC de animais com LVC multissintomáticos, oligo/assintomáticos e controle. Nota-se que os cães com vários sintomas (MULTI) apresentam menor porcentagem de gordura de medula óssea, além de menor score e IMC ($p < 0,05$; Spearman test).



Fonte: Imagem elaborada pelo autor.

O exame necroscópico dos animais, bem como os testes bioquímicos, foram realizados com o intuito de demonstrar outras características que pudessem agravar a situação de negligência dos cães com LV, mantidos por seus tutores. Assim, foi constatado que 90% dos cães avaliados, considerando os três grupos, apresentavam ectoparasitismo por carrapatos. A atrofia muscular generalizada atingiu 30,77% dos animais positivos, sendo que a atrofia do músculo temporal apareceu com maior frequência (38,36%). 84% dos MULTI apresentaram úlceras cutâneas, mais frequente que nos OLIGO (42,86%) (Tabela 02).

Lesões cutâneas e alopecia também foram sinais externos comuns evidenciados nos cães do grupo MULTI (80% e 68%, respectivamente), comparadas com os achados observados no cães do grupo OLIGO (42,86% para ambas) e CONT (27,27% para ambas). A lesão em ponta de orelha acometeu 51,28% dos cães positivos, porcentagem semelhante à onicogribose, que atingiu 56,51% dos animais positivos, sendo que 80% dos MULTI apresentaram crescimento anormal das unhas (Tabela 02). Portanto, em relação ao exame externo, observa-se maior comprometimento da higiene dos MULTI em relação ao OLIGO e CONT, uma característica comum em situações que o animal é negligenciado em seu cuidado.

Tabela 02 – Sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral classificados como multi, oligo/assintomáticos e em cães do grupo controle

Sinais	MULTI	OLIGO/ASSINT	CONTROLE
Lesão Ponta Orelha	56% (14/25)	42,86% (6/14)	72,73% (8/11)
Alopecia	68% (17/25)	42,86% (6/14)	27,27% (3/11)
Hiperqueratose	12% (3/25)	0	0
Lesão cutânea	80% (20/25)	42,86% (6/14)	27,27% (3/11)
Úlceras	84% (21/25)	42,86% (6/14)	0
Onicogribose	80% (20/25)	14,29% (2/14)	9,09% (1/11)
Ixodiose	88% (22/25)	92,86% (13/14)	90,9% (10/11)
Pulciose	56% (14/25)	50% (7/14)	45,45% (5/11)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação aos achados da necropsia (Tabela 03), a esplenomegalia foi a alteração anatomopatológica mais frequente nos três grupos analisados, com 84% dos cães MULTI apresentando esta alteração. A esplenomegalia também foi observada em cães dos grupos OLIGO (71,43%) e CONT (72,73%). Hepatomegalia e linfadenomegalia, que são outras alterações comuns observadas em cães com LV, acometeram com maior frequência, respectivamente e em ordem decrescente, os cães dos grupos MULTI (72%; 56%), OLIGO (57,14%; 50%) e CONT (36,36%; 9,09%).

Tabela 03 – Alterações anatomopatológicas observadas em cães com leishmaniose visceral agrupados como multi e oligo/assintomáticos e em cães do grupo controle.

Sinais	MULTI	OLIGO/ASSINT	CONTROLE
AMT	56% (14/25)	7,14% (1/14)	18,18% (2/11)
AMG	48% (12/25)	0	9,09% (1/11)
Mucosa Hipocorada	44% (11/25)	7,14% (1/14)	18,18% (2/11)
Mucosa Perlácea	16% (4/25)	21,43% (3/14)	0
Mucosa Ictérica	4% (1/25)	0	0
Linfadenomegalia	56% (14/25)	50% (7/14)	9,09% (1/11)
Hepatomegalia	72% (18/25)	57,14% (8/14)	36,36% (4/11)
Esplenomegalia	84% (21/25)	71,43% (10/14)	72,73% (8/11)
PTGI	12% (3/25)	7,14% (1/14)	0
SNE	16% (4/25)	14,29% (2/14)	0
Secreção Ocular	20% (5/25)	7,14% (1/14)	18,18% (2/11)
METGI	4% (1/25)	0	0
CEP	16% (4/25)	7,14% (1/14)	9,09% (1/11)

AMT: atrofia do músculo temporal. AMG: atrofia muscular generalizada. PTGI: parasitos no trato gastrointestinal. SNE: secreção nasal/epistaxe. METGI: material estranho no trato gastrointestinal. CEP: congestão/edema pulmonar. Fonte: Elaborado pelo autor.

O conteúdo gástrico (Tabela 04) observado com maior frequência foi caracterizado pela presença de ração em cães dos grupos MULTI (60%) e OLIGO (71,43%). Entretanto, 63,64% dos cães do grupo CONT e 28% dos cães dos grupos MULTI e OLIGO apresentaram estômago vazio. A ingestão de corpos estranhos, uma característica de privação de alimento, foi observada com mais frequência em cães do grupo OLIGO (21,43%).

Tabela 04 – Conteúdo estomacal observado em cães com leishmaniose visceral agrupados como multi e oligo/assintomáticos, e em cães do grupo controle.

Conteúdo	MULTI	OLIGO/ASSINT	CONTROLE
Vazio	28% (7/25)	28,57% (4/14)	63,64% (7/11)
Ração	60% (15/25)	71,43% (10/14)	27,27% (3/11)
Comida Caseira	8% (2/25)	0	9,09% (1/11)
Corpo Estranho	16% (4/25)	21,43% (3/14)	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação ao hemograma (Tabela 05), 96% dos cães do grupo MULTI apresentaram anemia, porcentagem superior à observada nos animais do grupo OLIGO (57,14%) e do grupo CONT (18,18%). A leucocitose e trombocitopenia foram observadas com baixa frequência nos cães dos grupos MULTI (24; 16%), OLIGO (35,71; 28,57%) e CONT (18,18; 18,18%), respectivamente. Entre os cães MULTI, 52% apresentaram linfopenia (Tabela 05).

A hiperproteinemia foi detectada em 69,23% dos animais diagnosticados com LV, com percentuais quase iguais nos dois grupos positivos (Tabela 05). Em relação aos testes bioquímicos, os cães MULTI apresentaram maiores níveis de ureia (61,16) e fosfatase alcalina e menores índices de albumina (1,48) e creatinina (1,13), em comparação aos OLIGO e CONT (Tabela 06).

Tabela 05 – Principais alterações hematológicas observadas em cães com leishmaniose visceral agrupados como multi e oligo/assintomáticos, e em cães do grupo controle

Alteração	MULTI	OLIGO/ASSINT	CONTROLE
Anemia	96% (24/25)	57,14% (8/14)	18,18% (2/11)
Leucocitose	24% (6/25)	35,71% (5/14)	18,18% (2/11)
Linfopenia	52% (13/25)	35,71% (5/14)	36,36% (4/11)
Trombocitopenia	16% (4/25)	28,57% (4/14)	18,18% (2/11)
Hiperproteinemia	68% (17/25)	71,43% (10/14)	36,36% (4/11)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 06 – Valores médios dos exames bioquímicos em cães com leishmaniose visceral agrupados como multi e oligo/assintomáticos, e em cães do grupo controle

Exame	MULTI	OLIGO/ASSINT	CONTROLE
ALT (U/L)	45,28	30,21	41,9
FA (U/L)	96,8	54,93	31,67
PT (mg/dL)	8,48	8,76	7,64
Albumina (mg/dL)	1,48	2,22	2,87
Creatinina mg/dL)	1,13	1,42	1,14
Ureia (mg/dL)	61,16	58,36	27,1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Outros fatores que podem caracterizar o agravamento das condições de higidez dos cães é a presença de sorologia positiva para outros patógenos (Tabela 07). Para isto foram feitos exames complementares que constataram que 92% dos MULTI apresentaram sorologia positiva para *Neospora* spp, sendo este número superior aos do OLIGO (71,43%) e CONT (45,45%). Já para *Toxoplasma* spp, OLIGO foram os que apresentaram maior positividade (57,14%), enquanto que os MULTI e CONT apresentaram porcentagem média de infecção de cerca de 40% e 27,27%, respectivamente (Tabela 07).

Tabela 07 – Presença de anticorpos detectados no exame sorológico em cães com leishmaniose visceral agrupados como multi e oligo/assintomáticos, e em cães do grupo controle

Agente etiológico	MULTI	OLIGO/ASSINT	CONTROLE
<i>Toxoplasma</i> spp	40% (10/25)	57,14% (8/14)	27,27% (3/11)
<i>Neospora</i> spp	92% (23/25)	71,43% (10/14)	45,45% (5/11)
<i>Ehrlichia</i> spp	92% (23/25)	64,29% (9/14)	72,73% (8/11)
<i>Babesia</i> spp	76% (19/25)	85,71% (12/14)	45,45% (5/11)

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.6. DISCUSSÃO

A quantidade de gordura (método Soxhlet) dos cães do grupo MULTI foi inferior à observada em cães dos grupos OLIGO e CONT (Tabela 01, Figura 05). Os valores observados neste estudo (21,64 a 58,47%) estão de acordo com um estudo³¹ que relatou maiores quantidades de gordura de medula óssea em cães com boa condição corporal e porcentagens menores em cães emaciados (em média de 17%), com índices variando de <1 a 64%. Entretanto, neste mesmo trabalho, os valores para cães normais foram descritos com resultado médio de 82% (variando entre 65-98%), um pouco maiores do que os observados no grupo dos cães CONT. Estas diferenças possivelmente decorreram devido à utilização de metodologias diferentes de quantificação de gordura, baseado na secagem da gordura a 100°C seguida de resfriamento à temperatura ambiente, previamente à sua medição.³¹

Em estudo com animais com bom *score* corporal, há relato²² de porcentagem média de gordura (59,4%) semelhante ao observado nos cães com melhor *score* deste experimento (CONT). Por outro lado, resultados opostos¹² ao deste estudo observaram que camundongos submetidos à restrição calórica apresentaram maior adiposidade na medula óssea do que camundongos que recebiam dieta normal. Isso pode ser explicado pelo fato de que os autores utilizaram como estudo somente a restrição de calorias, não avaliando doenças crônicas concomitantes, como a leishmaniose visceral, onde é evidente a participação de citocinas na perda de peso e subnutrição^{18,33,34,45}, com possibilidade portanto de esgotamento das reservas lipídicas, incluindo a da medula óssea.

Foi verificada uma correlação positiva nos cães de melhor *score* corporal e melhor índice de massa corporal com maior quantidade de gordura de medula óssea (Tabela 01, Figura 05), por outro lado, quanto maior a quantidade de sinais clínicos, que incluem a perda de peso, de um animal com diagnóstico de leishmaniose, menor é a adiposidade de medula.

Neste estudo, foram utilizados animais adultos jovens (01 a 05 anos de idade), não sendo possível, portanto, determinar a influência da idade na quantidade de gordura de medula óssea. Quanto maior a idade, maior o estoque de adipócitos nas cavidades de ossos longos, o que afeta a regeneração osteogênica e

hematopoiética.² Não foram avaliados animais idosos neste trabalho. O tipo de alimentação ofertada aos cães deste estudo não foi avaliado, devido à procedência dos animais (CCZ). Entretanto, dietas ricas em gordura reprogramam a linhagem mesenquimal para, preferencialmente, originar células adipogênicas na medula óssea,² o que prejudicam a reconstituição e a consolidação da fratura óssea. Embora o estudo de fraturas não seja o objetivo desta pesquisa, este foi o único trabalho encontrado na literatura que fez referência ao tipo de dieta de cães e à quantidade de gordura na medula óssea. Nós inferimos, devido à procedência dos cães, que dietas ricas em gordura não foram oferecidas aos animais deste experimento.

Em um estudo retrospectivo envolvendo 40 casos de cães emaciados, com suspeita de inanição, observou-se atrofia e depleção de gordura de medula óssea em cerca de 67% de animais que apresentavam alguma doença que ocasionou caquexia, e em 80% de cães desnutridos por causas exógenas.¹⁷ Estes resultados foram baseados em registros macroscópicos e/ou histopatológicos. A inspeção visual da gordura da medula óssea no exame macroscópico é um método subjetivo, por este motivo, neste estudo, a determinação da quantidade de gordura da medula (em mm tubo e pelo método Soxhlet) constitui-se em um meio mais acurado para a sua quantificação.

O valor do *score* corporal médio dos animais com LV (2,26) foi semelhante a um estudo¹¹ que relatou *score* de 2,2 em cães com leishmaniose visceral em uma área rural da mata atlântica brasileira. Cinquenta e oito por cento destes cães apresentavam *score* de até 2, corroborando com este estudo, onde a maioria dos cães positivos eram multissintomáticos, e cujo *score* corporal médio foi de 1,88. A graduação de *score* corporal utilizada neste trabalho foi a mesma preconizada por um estudo de avaliação do percentual de gordura corporal em cães de pequeno e médio portes.²⁴ Os autores associaram a importância da suplementação do *score* corporal de cinco pontos, o qual foi utilizado neste estudo, com medidas morfométricas para a sensibilidade da detecção de adiposidade dos referidos cães, propiciando, pois, nesses animais, o aumento da validação do status de sobrepeso, o que foi feito neste trabalho.

O índice de massa corporal dos cães do grupo MULTI foi inferior ao observado nos cães OLIGO. Essa medida apresenta correlação positiva com a soropositividade para *Leishmania* spp.¹¹ A altura está relacionada com o maior comprimento e quantidade de medula óssea existente no fêmur. Este osso foi eleito para colheita de medula neste estudo, junto com o úmero de cães de porte menor. Não há diferença na quantidade porcentual de gordura de medula óssea de acordo com o osso longo escolhido.¹³

O IMC de cães do grupo CONT não diferiu ($p < 0,05$) do grupo OLIGO (Tabela 1, Figura 5), indicando que a medida morfométrica é mais efetiva para diferenciar cães em mau estado, caracterizando os cães do grupo MULTI, que são os mais comumente enviados para centros de zoonoses pelos tutores, que geralmente têm baixo poder aquisitivo.

A frequência de infestação por carrapatos em animais com leishmaniose (89,74%) foi semelhante ao encontrado por outro estudo¹¹, de 86%, onde também encontraram porcentagens altas, mesmo mediante tratamento prévio antiparasitário realizado em 77% dos animais. O alto índice de ectoparasitismo é indicativo de negligência dos tutores.

Em um estudo de associação estatística entre 21 sinais clínicos comuns atribuídos à leishmaniose visceral, 11 deles, dentre os quais a atrofia muscular, mostraram-se estatisticamente mais comuns em cães soropositivos do que em animais controle.⁴⁰ A ocorrência de atrofia muscular generalizada e do músculo temporal encontrada neste estudo (Tabela 03) foi bem menor do que a observada em um estudo em que alterações musculares foram detectadas em 92% dos cães.¹⁴ No entanto, segundo tais autores, tais alterações podem ser ainda maiores, devido à polimiosite crônica de animais infectados. A atrofia muscular é um dos sinais clínicos de maior relevância em termos de negligência no cuidado com o animal, visto que é correlacionada negativamente com nutrição e alimentação adequada.

A linfadenomegalia foi observada em 56% dos cães MULTI e 50% dos cães OLIGO (Tabela 03). Porcentagem maior desta alteração, de 85%,²⁸ foi encontrada em um estudo envolvendo 329 cães infectados naturalmente por *Leishmania* spp e também em um outro estudo³⁸, onde observaram linfadenomegalia em 83,93% dos cães, em Teresina – PI. Avaliando 37 cães de

Araçatuba – SP, observou-se que 70,3% deles apresentavam linfadenomegalia.⁴⁴ Por outro lado, semelhante a este estudo, foi encontrada porcentagem de 58% em animais positivos para leishmaniose.³⁹ Como mostra a literatura, a linfadenomegalia é um importante sinal clínico a ser avaliado em um cão positivo para *Leishmania* spp, uma vez que sua prevalência é significativa, sendo um dos sinais mais frequentes e iniciais da doença, e as variações de porcentagem descritas nos trabalhos podem estar associadas aos diferentes estadiamentos clínicos da LV nos animais avaliados.

A onicogribose, outro sinal clínico muito comum, foi observada em 80% dos cães do grupo MULTI e em 14,29% dos cães OLIGO, totalizando um acometimento médio de 56,41% dos animais com infecção por *Leishmania* spp. Porcentagem semelhante foi encontrada respectivamente, de 58,93% e 73%.^{38,44}

As alterações cutâneas representaram grande fração das alterações clínicas e anátomo patológicas (Tabela 02), principalmente as lesões ulcerativas (69,23%). Outro tipo de lesão cutânea observada com frequência neste estudo foi a dermatite de ponta de orelha, com valores em porcentagem semelhante ao reportado por outros autores.³⁸ Alterações dermatológicas foram encontradas em 63% dos animais.³⁹ Foi encontrada porcentagem deste tipo de alteração em 75,7% de cães com LV, também provenientes de Araçatuba – SP.⁴⁴ Alterações de pele manifestam-se tardiamente (18 meses de infecção) e com baixa frequência²⁸, sendo portanto, importantes sinais clínicos para caracterizar a cronicidade da doença nos cães deste estudo, os quais geralmente apresentam redução da gordura medular.

Ao exame macroscópico do conteúdo gástrico, observou-se que 64,1% dos animais com leishmaniose visceral apresentaram predominantemente ração em seu conteúdo estomacal e os demais 28,21% deles apresentaram ausência de qualquer conteúdo no estômago (Tabela 04). Observou-se esvaziamento gástrico em 30% dos animais que foram mortos devido à emaciação por causas exógenas e em 86% dos animais mortos por emaciação devido a alguma doença concomitante.¹⁷ Mesmo considerando que a ausência de conteúdo estomacal seja um achado comum em animais emaciados, neste estudo, os cães do grupo CONT foram os que apresentaram maior porcentagem de ausência de conteúdo gástrico (63,64%). É importante frisar que a possível causa de maior porcentagem de

animais com leishmaniose apresentar ração em seu conteúdo estomacal deve ser decorrente da alimentação fornecida no CCZ, onde ração e água são oferecidos aos animais dependendo do período de estadia nas baias.

Semelhante aos cães do grupo OLIGO (Tabela 05), observou-se anemia em 60% dos cães em um inquérito realizado no Reino Unido,³⁹ assim como alteração hematológica em 53,3% dos cães,²⁰ e frequência de anemia de 63,16%⁷; tais porcentagens encontram-se abaixo da encontrada nos animais MULTI deste experimento (96%). Avaliando 36 cães com LV e categorizando-os em oligo, multi e assintomáticos, observou-se, assim como neste estudo, maior frequência de anemia nos animais infectados, sendo que cães assintomáticos apresentaram menores índices de alterações hematológicas, como seria esperado para animais com melhor estado nutricional e parasitológico.³⁵

Ao contrário do presente estudo (Tabela 05), foi encontrada trombocitopenia em 87% de cães infectados por *Leishmania* spp,²⁸ atribuindo este fato à detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia* em alguns animais, sugerindo um efeito patológico combinado. Por outro lado, corroborando com este trabalho, os autores também encontraram índices de 71% de animais anêmicos. Neste estudo, 69,23% dos cães com LV apresentaram hiperproteïnemia, provavelmente correlacionada à hipergamaglobulinemia. A hiperproteïnemia neste estudo foi mais frequente do que a relatada em um estudo⁴⁴, de 56,75%, provavelmente devido ao uso de cães em estágios clínicos diferentes da LV.

Em relação à pesquisa de anticorpos para *Babesia* spp, todos os grupos experimentais apresentaram valores superiores aos 1,3% relatados por outro estudo¹¹, provavelmente devido à região onde as amostras foram colhidas, visto que um levantamento³² conduzido no mesmo estado da federação observou índices de cerca de 74,3% de positividade concomitante (*Babesia* spp e *Leishmania* spp), semelhante aos índices deste estudo, de 76 e 85,71% de animais MULTI e OLIGO, respectivamente.

Os animais com leishmaniose deste estudo apresentaram índices elevados de ureia, diferentemente dos animais controle, indicando que este é um exame bioquímico importante para avaliar a situação dos animais e progressão da doença,⁴¹ resultado também observado em outro estudo.³⁵ Os aumentos dos níveis

de ureia e creatinina aparecem tardiamente pós infecção,²⁸ e são característicos de animais em estado crônico e de emaciação, o que foi principalmente, mas não exclusivamente, observado nos cães do grupo MULTI. A categorização de animais positivos para *Leishmania* spp⁴¹ não foi a utilizada neste estudo, visto a dispersão dos valores de IMC e gordura dentre os vários estágios. Com isso, a classificação e separação dos cães MULTI e OLIGO ocorreram por meio de sinais clínicos.^{6,27}

Neste estudo, os níveis de creatinina nos três grupos analisados apresentaram-se dentro da normalidade, assim como reportado em um estudo³⁵ onde não observou-se diferença nos grupos de acordo com sinais clínicos (oligo e multissintomáticos). Esses autores relatam que tal normalidade indica uma incipiente nefropatia, já que os rins ainda conseguem manter os índices fisiológicos de creatinina. A limitação do aumento de creatinina no soro de cães infectados pode ser devida à atrofia muscular,^{43,44} fato evidenciado nos cães do grupo MULTI deste estudo. A quebra da creatina fosfato, durante a contração muscular, dá origem a creatinina, portanto a atrofia muscular reduz a produção de creatinina, que deve ser excretada na urina.

Foram encontradas porcentagens de sorologia positiva para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, de cerca de 4,97% e 26,9%, respectivamente.²³ Todos estes valores são menores do que a sorologia destes mesmos agentes em todos os três grupos analisados neste estudo (Tabela 07), assim como em um estudo⁹ em que somente 4,17% de cães apresentavam positividade concomitante por *Toxoplasma gondii*. Ademais, foi observada sorologia menor por *Neospora* spp (32,6%);¹⁶ em relação ao *T. gondii*, a frequência de infecção concomitante foi de 41%, semelhante aos cães do grupo MULTI (Tabela 07). A razão pela qual os índices encontrados na literatura estão geralmente abaixo dos encontrados neste estudo pode ser devido ao fato de que os cães, principalmente os do grupo MULTI, encontravam-se em precárias condições de higiene, com manifestação de sinais clínicos variados e apresentando, portanto, sorologia alta para outros patógenos.

Foi observada frequência menor de cães com sorologia positiva para *Ehrlichia* spp (51,16%)⁴ do que o observado neste estudo. Tais autores observaram que animais com infecção concomitante apresentaram duas vezes mais frequência de amastigotas na ponta de orelha do que cães infectados somente por *Leishmania*

spp. Neste estudo, a dermatite ulcerativa em ponta de orelha acometeu 51,28% dos animais positivos, ressaltando o risco conjunto da co-infecção e lesão nessa região corporal. A alta porcentagem de animais do grupo CONT com lesão em ponta de orelha (72,73%) neste estudo mostrou-se atípica, necessitando um estudo mais específico para determinação da causa destas lesões.

2.7. CONCLUSÃO

A determinação da quantidade de gordura de medula óssea pelos dois métodos utilizados neste estudo constitui um parâmetro eficaz de determinação de condições corporais na leishmaniose visceral canina, podendo ser utilizada como base para estudos de negligência em casos envolvendo a medicina veterinária forense. O índice de massa corporal proposto (massa animal/comprimento da coluna) não apresentou resultados efetivos.

A observação de cães com leishmaniose visceral e com redução significativa da gordura da medula óssea alerta para a adoção de políticas educativas, visando à diminuição de situações de negligência e/ou maus tratos a estes animais.

2.8. DECLARAÇÃO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, UNESP (protocolo FOA 01084-2015).

REFERÊNCIAS

1. Acero VP, Ángel PB, Fonseca EB, et al. Canine Leishmaniosis: tools for diagnosis in veterinary practice in Colombia. *Rev.MVZ Córdoba*. 2015;20:4822-4842.
2. Ambrosi TH, Scialdone A, Graja A., et al. Adipocyte accumulation in the bone marrow during obesity and aging impairs stem cell-based hematopoietic and bone regeneration. *Cell Stem Cell*. 2017;20:771-784.
3. American Veterinary Medical Association. Report of the AVMA panel on euthanasia. *J Am Vet Med Assoc*. 2001;218:669-696.
4. Andrade GB, Barreto WT, Santos LL, et al. Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2014;23:509-515.
5. Brasil. *Lei nº 9.605*, de 12 de fevereiro de 1998. Available: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm. Acesso em 04 nov. 2015.
6. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. 2006, Brasília, DF: Ministério da Saúde do Brasil.
7. Braz PH, Sartoretto MC, Souza AS, et al. Comparação entre os valores da amplitude de distribuição de diâmetro dos eritrócitos e do volume corpuscular médio com a citometria de eritrócitos em cães com leishmaniose. *Pesq. Vet. Bras*. 2017;37:781-784.
8. Burkholder WJ, Toll PW. Controle da obesidade. In: HAND MS, TATCHER CD, REMILLARD RI, et al. *Small animal clinical nutrition*. 4th ed. Topeka: Mark Morris Institute; 1997:1-44.
9. Cardinot CB, Silva JES, Yamatogi RS, et al. Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Toxoplasma gondii* dna in the brain of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Parasitol*. 2016;102:275-279.
10. Colombo FA. Performance of a real time PCR for leishmaniasis diagnosis using a *L. (L.) infantum* hypothetical protein as target in canine samples. *Exp. Paras*. 2015;157:156-162.
11. Curi NHA, Paschoal AMO, Massara RL, et al. Factors associated with the seroprevalence of leishmaniasis in dogs living around Atlantic forest fragments. *PLoS ONE*. 2014;9.
12. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, et al. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res*. 2010;25:2078-2088.
13. Di Iorgi N, Rosol M, Mittelman SD, et al. Reciprocal relation between marrow adiposity and the amount of bone in the axial and appendicular skeleton of young adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:2281-2286.
14. Ferraro GC, Machado GF, Laurenti MD, et al. Alterações eletromiográficas e histopatológicas da musculatura de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 2012;49:404-413.

15. Furuta PI, Oliveira TMFS, Teixeira MCA, et al. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. *Rev. Bras. de Parasit. Vet.* 2009;18:41-45.
16. Gennari SM, Franco WAC, Ikeda FA, et al. Presence of anti- *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs with visceral leishmaniasis from the region of Araçatuba, São Paulo, Brazil. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.* 2006;43:613-619.
17. Gerdin JA, McDonough SP, Reisman R, et al. Circumstances, descriptive characteristics, and pathologic findings in dogs suspected of starving. *Vet. Pathol.* 2015;53(5):1087-1094.
18. Harrison LH, Naidu TG, Drew JS, et al. Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. *Rev. Of Inf. Diseases.* 1986;8(3).
19. Horwitz W, Latimer GW. *Official Method of Analysis of AOAC International* (Appendix E: Laboratory Quality Assurance), 18th Edition, Association of Official Analytical Chemists, 2006.
20. Lacerda MS, Sampaio RL, Rezende RS, Gomes AL. Perfil hematológico de cães (*Canis lupus familiaris*) soropositivos para *Leishmania* spp atendidos no hospital veterinário de Uberaba – MG. *Nucleus Animalium* 2017;9(1).
21. Laflamme DP. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Practice* 1997;22:10-15.
22. Lamoureux JL, Fitzgerald, SD, Church MK, et al. The effect of environmental storage conditions on bone marrow fat determination in three species. *J Vet Diagn Invest.* 2011;23:312-315.
23. Langoni H, Fornazari F, Silva RC, et al. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs. *Braz. J. of Microb.* 2013;44(4):1327-1330.
24. Li G, Lee P, Mori N, et al. Supplementing five-point body condition score with body fat percentage increases the sensitivity for assessing overweight status of small to medium sized dogs. *Vet. Med.: Research and Reports*, 2012;3:71-78.
25. Lima VMF, Gonçalves ME, Ikeda, FA, et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(4):485-489.
26. Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007;104:9375-9380.
27. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):566-567.
28. Manzillo VF, Muccio T, Cappiello S, et al. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(5).

29. Mauricio IL, Stohard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*, *Parasitol. Today*, 2000;16:188-189.
30. Meyer DJ, Harvey JW. *Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis*. 2.ed. Philadelphia: Sauders, 351p, 2004.
31. Meyerholtz KA, Wilson CR, Everson RJ, et al. Quantitative assessment of the percent fat in domestic animal bone marrow. *J. of For. Sci.* 2011;56(3):775-777.
32. Paulan SC, Lins AGS, Tenório MS, et al. Seroprevalence rates of antibodies against *Leishmania infantum* and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 2013; 22(1):162-166.
33. Pearson RD, Cox G, Evans T, et al. Wasting and macrophage production of tumor necrosis factor/cachectin and interleukin 1 in experimental visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1990;43(6):640-649.
34. Pearson RD, Cox G, Jeronimo SMB, et al. Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1992;47(1):8-15.
35. Ribeiro RR, Silva SM, Fulgêncio GO, et al. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2013;22(3):373-378.
36. São paulo. *Lei nº 11.977*, de 25 de agosto de 2005. Institui o Código de Proteção aos Animais do Estado e dá outras providências. Diário Oficial, Estado de São Paulo, 27 ago. 2005, p. 01.
37. São paulo. *Lei nº 12.916*, de 16 de abril de 2008. Dispõe sobre o controle da reprodução de cães e gatos e dá providências correlatas. Diário Oficial, Estado de São Paulo, 17 abr. 2008, p. 01.
38. Silva KR, Mendonça VRR, Silva KM, et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2017;112(1):53-62.
39. Silvestrini P, Batchelor D, Allenspach K, et al. Clinical leishmaniasis in dogs living in the UK. *J. Small Anim. Pract.* 2016;57:453-458.
40. Soccol VT, Pasquali AKS, Pozzolo EM, et al. More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. *PLoS ONE* 2017;12(12).
41. Solano-gallego L, Miro G, Koutinas A, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 2011;86(1).
42. Stillman BA, Monn M, Liu J, et al. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2014;245(1):80-86.
43. Suárez PCB, Martínez CAC, Ruiz IC et al. Standardization of serum creatinine levels in healthy dogs related to body weight at the South Valley of Aburra, Colombia. *Rev Med Vet*, 2014;27:33-40.

44. Torrecilha RBP, Utsunomiya YT, Bosco AM, et al. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev. Vet. Med.* 2016;132:83-87.
45. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor in the malnutrition (cachexia) of infection and cancer. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1992;47(1):2-7.
46. Tuljapurkar SR, McGuire TR, Brusnahan SK, et al. Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging. *J. Anatomy* 2011;219:574-581.
47. Zanette MF, Lima VMF, Laurenti, MD, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014;47(1):105-107.

ANEXO A – Valores de referência de exames hematológicos

Tabela 08 - Valores de referência utilizados nos exames hematológicos do presente trabalho. MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. *Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis*. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2004. 351p.

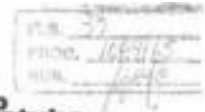
	Valores de referência	Unidade
Eritrócitos	5,50 - 8,50	$\times 10^6/\mu\text{L}$
Hemoglobina	12,00 - 18,00	g/dL
Volume Globular	37,00 – 55,00	%
VCM	60,00 – 77,00	fL
CHCM	32,00 – 36,00	%
Leucócitos	6.000 – 17.000	$/\mu\text{L}$
Segmentados	3.000 – 11.500	$/\mu\text{L}$
Linfócitos	1.000 – 4.800	$/\mu\text{L}$
Monócitos	150 – 1.350	$/\mu\text{L}$
Eosinófilos	150 – 1.250	$/\mu\text{L}$
Plaquetas	160 – 430	$\times 10^3/\mu\text{L}$
PPT	6 – 8	g/dL
ALT	21 – 73	U/L
FA	20 – 156	U/L
PT	5,40 – 7,10	g/dL
Albumina	2,6 – 3,3	g/dL
Creatinina	0,5 – 1,5	mg/dL
Ureia	21,40 – 59,92	mg/dL

Fonte: Elaborado pelo autor.

ANEXO B – Comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Investigação de condições de negligência em cães com *Leishmaniose visceral*", Processo FOA nº 01084-2015, sob responsabilidade de Gisele Fabrino Machado apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de março de 2016.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 10 de Janeiro de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Fevereiro de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Investigation of neglect conditions in dogs with visceral leishmaniasis", Protocol FOA nº 01084-2015, under the supervision of Gisele Fabrino Machado presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 24, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 10, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 10, 2019.


Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO C – Normas de submissão da revista Veterinary Pathology

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

Table of Contents

Submission and Evaluation of Manuscripts	3
Editorial Policies	4
Scope and Criteria for Acceptance	4
Authorship	4
Research Ethics, Ethical Treatment of Animals, and Consent of Animal Owners	5
Availability of supporting research data	5
Duplicate or Related Publication, and Plagiarism	6
Publication of Reprinted Material	6
Conflict of Interest Policy: Authors	6
Conflict of Interest Policy: Reviewers	7
Exclusive License to Publish	7
Wellcome Trust Open Access Policy	7
General Information for All Types of Manuscripts	8
Margins and Fonts	8
Arrangement of Sections	8
Use of Case Numbers	8
Citation of Figures and Tables	8
Abbreviations and Nomenclature	8
Title Page	9
Abstract	9
Keywords	9
Tables	9
Figures	10
Figure Legends	11
Acknowledgements	11
Declaration of Conflicting Interests	12
Funding	12
References	12
Supplemental Materials	12
Types of Manuscripts	13
Full Length Manuscripts	13
Brief Communications and Case Reports	14
Reviews	15
Meeting Reports	15
Letters to the Editor	15
Guest Editorials	15
Commentaries	16
Image Challenge	16
Obituaries	16
Production and Page Proof Corrections	16

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

Text of the manuscript: key points

- Microsoft Word file, Arial 12 point font, left-justified, 1 inch margins on all side, double-spaced, number every page, no line numbering
- **Full-length manuscripts:** Title page, Abstract (≤ 250 words), Keywords (119 characters, use MeSH terms), Introduction (heading omitted), Materials and Methods (include statement on ethical treatment of animals; follow ARRIVE guidelines when relevant), Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figure legends. Submit Tables as separate files.
- **Brief communications and case reports:** Abstract (≤ 150 words), Keywords, Body of the text (< 1700 words) with no subheadings, Acknowledgements, References ($n \leq 20$), Figure legends, No more than two plates of 8 figures total.
- Cite figures and tables in the order they appear in the text
- Title page: informative and descriptive title, authors names, institutions, contact information of corresponding author
- Copying material from other manuscripts, including the author's own work, constitutes plagiarism and is unacceptable

Figures: key points

- Number each figure separately (1, 2, ...). Letters (1a, 1b, ...) are used only for figures showing different staining methods on the same sample.
- Label each figure with the figure number: lower left corner, white, 14-point Arial font, no border
- Save images at 300 dpi, 90 or 180 mm wide, TIF file format
- Group photos as a rectangular plate 180 mm wide and ≤ 180 mm high (such as a plate 2 -3 photos wide x 2-4 photos high), with no white space between photos
- Exclude scale bars (except from electron micrographs)
- Typical legend format: Figure 1. Diagnosis, organ or tissue, species, case number. Sentence description. Staining method. Group similar figures to avoid repetition of text.
- Supplemental Figures: name as Supplemental Figure S1, etc.; include the name (S1) in the lower left corner of the figure. Supplemental Figure legends grouped in a separate Word file.

Reference format: key points

- In text citations are listed in superscript after the punctuation as shown.^{1,2-4,8}
- Arrange the list of references alphabetically, numbered consecutively
- Journal, ≤ 6 authors: Holman RT, Wiese HF, Smith AN. Essential fatty acid deficiency. *Am J Pathol.* 1976;95:255–257.
- Journal, > 6 authors: Ortega J, Uzal FA, Walker R, et al. Zygomycotic lymphadenitis in slaughtered feedlot cattle. *Am J Pathol.* 2009;47(1):108–114.
- Book chapter: Sligh EG. Neutral lipid storage disease. In: Dyer WJ, ed. *Biochemistry of Lipids*. 5th ed. London, UK: Academic Press; 1956:471–476.

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

Submission and Evaluation of Manuscripts

Submit all articles via Manuscript Central: <http://mc.manuscriptcentral.com/vetpath>

If you do not have access to the necessary resources for online submission, please contact Jill Findlay, Managing Editor (vetpathjournal@outlook.com).

Authors are urged to consult a recent issue of the journal and follow the style therein, as this follows the 10th Edition of the AMA Manual of Style. *Veterinary Pathology* will also consider manuscripts prepared according to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (*New Engl J Med* 336:309–315, 1997). Please indicate in your cover letter and as a footnote on the title page of your manuscript that you have prepared your manuscript in the Uniform Requirements format. Only original papers written in American English will be accepted. An [editing service](#) including translation from Spanish, Portuguese or Chinese is available from the publisher, SAGE; use of this service does not guarantee acceptance of the paper by the journal.

Submission of a manuscript requires each author to have an [Open Researcher and Contributor Identification](#) (ORCID ID). ORCID provides a unique and persistent digital identifier that distinguishes researchers from every other researcher, even those who share the same name, and, through integration in key research workflows such as manuscript and grant submission, supports automated linkages between researchers and their professional activities, ensuring that their work is recognized. The collection of ORCID IDs from corresponding authors is now part of the submission process of this journal. If you already have an ORCID ID you will be asked to associate that to your submission during the online submission process. We also strongly encourage all co-authors to link their ORCID ID to their accounts in our online peer review platforms. It takes seconds to do: click the link when prompted, sign into your ORCID account and our systems are automatically updated. Your ORCID ID will become part of your accepted publication's metadata, making your work attributable to you and only you. Your ORCID ID is published with your article so that fellow researchers reading your work can link to your ORCID profile and from there link to your other publications. If you do not already have an ORCID ID please follow this [link](#) to create one or visit our [ORCID homepage](#) to learn more.

You will be asked to provide contact details and academic affiliations for all co-authors via the submission system and identify who is to be the corresponding author. These details must match what appears on your manuscript. The affiliation listed in the manuscript should be the institution where the research was conducted. If an author has moved to a new institution since completing the research, the new affiliation can be included in a manuscript note at the end of the paper. At this stage please ensure you have included all the required statements and declarations and uploaded any additional supplementary files (including reporting guidelines where relevant).

Manuscripts submitted to *Veterinary Pathology* are evaluated by the editorial staff. If the manuscript is potentially suitable, peer reviewers are normally selected by the Associate Editor. *Veterinary Pathology* operates a single-blind reviewing policy in which the reviewer's name is concealed from the submitting author.

As part of the submission process, the corresponding author will be asked to provide the names of peers who could be called upon to review your manuscript. Recommended reviewers should be experts in their fields and should be able to provide an objective assessment of the manuscript. Authors should not recommend reviewers who would have a conflict of interest, including (but not limited to) the following guidelines:

- The reviewer should have no prior knowledge of your submission
- The reviewer should not have recently collaborated with or have a personal relationship any of the authors
- Reviewer nominees from the same institution as any of the authors are not permitted

Editors are not obliged to invite any recommended reviewers to assess your manuscript. Authors may

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

request that specific individuals be excluded as reviewers, but the decision to use or not use opposed reviewers is made by the editors.

Acceptance of a manuscript for publication is determined by the Editor and Associate Editor based on the peer review, scientific merit and value to readers. This decision may be made in consultation with other editorial staff and/or the Editorial Board. Appeals of decisions should be directed to the Managing Editor (Email: vetpathjournal@outlook.com).

When **re-submitting a revised manuscript**, upload a clean copy of the manuscript as the manuscript file, and also upload a marked-up copy as a Supplemental File (enabling editors and reviewers to see changes that were made from the original version). Authors must include a **response letter** that addresses each of the reviewer's and editor's comments, in order.

Reviewer's comments should be taken as constructive criticisms by experts in the subject area, and reviews lead to substantial improvement in the quality of scientific manuscripts. Nonetheless, authors are not obliged to make changes as suggested by the reviewers, if a compelling rebuttal or counter-argument can be stated. After one or more reviews of the manuscript, the editorial staff will decide if the reviewer's and editors' comments have been satisfactorily addressed.

Editorial Policies

Scope and Criteria for Acceptance

Veterinary Pathology publishes basic and applied research involving domestic, laboratory, and zoo animals, wildlife, poultry, and other animals. The scope of the journal includes novel descriptions of pathologic changes, clinical pathology and clinical-pathologic correlations for natural and experimental diseases of animals, investigations of the molecular and cellular mechanisms of disease (general pathology) and other aspects of pathogenesis, descriptions and use of animal models of human disease, and studies of pharmaceutical and environmental hazards.

Manuscripts considered for publication must:

1. have significant importance to animal and/or human health,
2. include new knowledge supported by valid data,
3. address disease mechanisms (pathogenesis, pathophysiology), or pathologic findings in important new or emerging diseases, or clinico-pathologic correlations, AND
4. be of sufficiently broad interest to be of substantial value to veterinary pathologists.

Thus, manuscripts should characterize previously unrecognized diseases, advance our ability to more accurately diagnose diseases, identify pathologic features that indicate prognosis or appropriate therapy, or provide an important comparative viewpoint. Results of in vitro experiments or genetic analyses may be suitable if they reveal aspects of pathogenesis, or advance knowledge in understanding of disease mechanisms, pathogenesis, pathologic diagnosis, or clinical relevance of pathologic findings. Descriptions of novel methods relevant to the practice of veterinary pathology are considered, as are papers that describe or validate animal models of human disease, enhance the translational study of animal models, or are relevant to animals used in pharmacologic studies.

Veterinary Pathology is the official journal of the American College of Veterinary Pathologists, the European College of Veterinary Pathologists, and the Japanese College of Veterinary Pathologists. The Editor-in-Chief is responsible for the editorial content of the journal—including peer-reviewed manuscripts—and the timing of its publication. The aforementioned Colleges do not interfere with the recruitment, evaluation or editing of individual scientific manuscripts submitted to the journal, but they do contribute to the strategic direction of the journal.

Authorship

Papers should only be submitted for consideration once consent is given by all contributing authors.

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors. The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This is all those who:

- (i) made a substantial contribution to the concept and design, acquisition of data or analysis and interpretation of data,
- (ii) drafted the article or revised it critically for important intellectual content, and
- (iii) approved the version to be published. Please refer to the [ICMJJE Authorship guidelines](#).

Research Ethics, Ethical Treatment of Animals, and Consent of Animal Owners

Submitted manuscripts should conform to the [ICMJJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#).

Studies involving live animals (or samples that were obtained from live animals for the purpose of the study) must be approved by an Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). In the Methods section of the manuscript, state the full name and institution of the IACUC, in addition to the approval number. Furthermore, studies must be carried out in accordance with all applicable institutional, local, and national guidelines and laws. These guidelines may include, but are not solely limited to, the National Institutes of Health's *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, which can be obtained from the [Office of Laboratory Animal Welfare](#), the *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*, available from the [Federation of Animal Science Societies](#), and the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Manuscripts may be rejected if the editors suspect unnecessary or unacceptable animal suffering, even if IACUC approval was provided.

Studies involving samples or records that are owned by the author's institution (such as archived samples owned by a diagnostic laboratory) may not require IACUC approval or informed consent of the animal's original owners, depending on the requirements of the institution and local laws. In such circumstances, the journal does not require a statement of IACUC approval or informed owner consent. Authors must ensure that they have obtained appropriate permission from the institution or individuals who own the samples or records, prior to submitting a manuscript that involves analysis of those samples.

For studies in which samples, data or photographs are collected from privately owned animals (such as client-owned animals), please state in the Methods whether written or verbal informed owner consent was obtained, or include a statement explaining why such consent was not necessary. Do not submit the actual written informed consent with your article, as this breaches confidentiality. As mentioned above, such consent may not be necessary if ownership of diagnostic specimens is transferred to the author's institution.

Reports that include surveys of human subjects must include a statement that the survey was approved by an institutional ethics board. In the Methods section of the manuscript, state the full name and institution of the research ethics board, in addition to the approval number.

Please also refer to the [ICMJJE Recommendations for the Protection of Research Participants](#)

Medical research involving human subjects must be conducted according to the [World Medical Association Declaration of Helsinki](#).

Availability of supporting research data

Manuscripts reporting original research must include a statement of the data availability at the end of the Methods, which informs readers of whether the underlying data will be made available or not, and if so the location at which readers can access the data (and, when relevant, the date when the data will be made available and any restrictions on availability). This statement may take the following form: *The data analyzed in this study are / are not available as Supplemental Materials* (or by stating the name of the repository, permanent weblink, request to the author, etc.).

Authors are strongly encouraged to include detailed tables of individual-animal raw data as Supplemental Materials, in an effort to promote transparency and openness in communication of scientific findings, to allow readers increased confidence in the findings, and to provide case series data as reference information to the scientific community.

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

At SAGE we are committed to facilitating openness, transparency and reproducibility of research. Where relevant, The Journal encourages authors to share their research data in a suitable public repository subject to ethical considerations and where data is included, to add a data accessibility statement in their manuscript file. Authors should also follow data citation principles. For more information please visit the [SAGE Author Gateway](#), which includes information about SAGE's partnership with the data repository Figshare.

Duplicate or Related Publication, and Plagiarism

Submission of a manuscript implies commitment to publish in *Veterinary Pathology*. Manuscripts submitted to the journal must not be under consideration for another journal, nor should manuscripts of similar form or with substantially similar content have been submitted, accepted or published elsewhere. In the cover letter accompanying the manuscript, the author must disclose to the editor all submissions and previous reports that might be regarded as prior, duplicate or related publication of the same or similar work, along with a statement of how the submitted and prior works differ. Copies of such material should be included with the submitted paper, as Word or PDF files that are uploaded as supplemental information files. Failure to notify editors of substantially similar previously published work would normally result in rejection of the manuscript.

As part of the submission process you will be required to warrant that you are submitting your original work, that you have the rights to the work and that you have obtained and can supply all necessary permissions for materials used in the study and for the reproduction of any copyright works not owned by you, that you are submitting the work for first publication in the Journal and that it is not being considered for publication elsewhere and has not already been published elsewhere. Please see our guidelines on [prior publication](#).

Studies forming a novel investigation of previously published case material must clearly state the relationship to the prior work. In circumstances in which the manuscript predominantly represents material already published, please contact the editor to determine if sufficient new material is presented to warrant publication. A poster or oral presentation at a conference (if the published abstract is less than 350 words), or publication of findings in a thesis as part of a graduate degree, are not normally considered to interfere with publication of the same material as a peer-reviewed paper.

The Journal may accept submissions of papers that have been posted on pre-print servers; please alert the Editorial Office when submitting (contact details are at the end of these guidelines) and include the DOI for the preprint in the designated field in the manuscript submission system. Authors should not post an updated version of their paper on the preprint server while it is being peer reviewed for possible publication in the journal. If the article is accepted for publication, the author may re-use their work according to the journal's author archiving policy. If your paper is accepted, you must include a link on your preprint to the final version of your paper.

Duplicate or redundant publication or copying from other manuscripts without disclosure is unethical. Plagiarism includes copying material from other publications, including copying from the author's own work that is already published elsewhere. Undisclosed duplicitous, redundant or plagiarized manuscripts will be rejected or retracted, and the author's institution may be notified.

Publication of Reprinted Material

Authors are responsible for obtaining permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. Note that most published material is protected by copyright, and reprinting such material without permission is prohibited. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the [SAGE Journal Author Gateway](#).

Conflict of Interest Policy: Authors

Authors should state any potential conflicts of interest at the time of submission of the manuscript. Such information will not alter established editorial and review policies but will assist the editorial staff in avoiding any potential conflicts that could give the appearance of a biased review.

Financial support. To comply with the guidance for Research Funders, Authors and Publishers issued by

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

the Research Information Network (RIN), *Veterinary Pathology* requires all Authors to acknowledge their funding in a consistent fashion under a separate heading. Please visit [Funding Acknowledgements](#) on the SAGE Journal Gateway to confirm the format of the acknowledgment text in the event of funding or state in your acknowledgments that: "This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors." This section is completed during the process of online submission of the manuscript. If those who provided financial support had a role in the research or its publication, this role should be stated. If the study evaluates a commercial or candidate pharmaceutical product or medical device, the authors must disclose support in a cover letter when the manuscript is submitted for initial review, unless the association of the author with the sponsoring company is obvious. The editor will hold such information in confidence. If the manuscript is accepted for publication, the editor will discuss with the authors how such information is to be communicated to the reader.

Financial interest. Authors must disclose in the submission letter as well as in the "Declaration of Conflicting Interests" any financial interest (including employment, consultancies, and honoraria) in a company (or its competitor) that produces or benefits from a product under discussion, or a diagnostic test or therapy of a disease relevant to the manuscript. The "Declaration of Conflicting Interests" section is completed during the process of online submission of the manuscript.

Publication of papers dealing with a commercial or candidate pharmaceutical product or medical device or diagnostic test does not convey or imply an endorsement by the journal *Veterinary Pathology* or the American College of Veterinary Pathologists, the European College of Veterinary Pathologists, or the Japanese College of Veterinary Pathologists.

Conflict of Interest Policy: Reviewers

Potential reviewers of all manuscripts submitted to *Veterinary Pathology* are asked to consider any potential conflicts of interest they may have before agreeing to review a manuscript.

Conflicts of interest include work at the same institution, current collaborative research, co-authorship in the past 5 years, close personal relationships, or competing business or academic relationships with any of the authors of the manuscript. Such associations or relationships may not disqualify a potential reviewer; however, if a reviewer is concerned about a possible conflict, the circumstances should be discussed with the editorial staff. We expect that reviewers with a substantial conflict of interest will disqualify themselves from reviewing a manuscript.

More information as well as general instructions to Reviewers is on the [journal website](#) and on the [publisher's website](#).

Exclusive License to Publish

To publish a manuscript, we require a signed Exclusive License to Publish agreement from one author (usually the corresponding author) with the understanding that all authors have seen and agreed to the contents of the manuscript. The form will be reviewed and signed online at the time of acceptance. Under the agreement, the author retains copyright to the work and grants an exclusive license to SAGE to publish the article and its contents.

Employees of the federal government are required to indicate this affiliation on the same form. Any financial disclosures or declarations of potential conflicts of interests should be listed on the agreement.

Wellcome Trust Open Access Policy

SAGE is fully compliant with the Wellcome Trust Open Access Policy. Any article published by SAGE that has had an Article Processing Charge (APC) funded by the Wellcome Trust will be published under a Creative Commons, Attribution (CC BY) licence, Version 4 (effective 1st April 2017) and will be automatically deposited in PubMed Central (PMC) on behalf of the author without embargo.

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

To facilitate this, it is essential that the corresponding author indicates that their work is Wellcome Trust funded when they submit their work by selecting the relevant FundRef ID in the manuscript submission.

SAGE audits the funding status of all of our Open Access articles on a regular basis. If for any reason the correct process has not been followed, SAGE undertakes to make any required adjustments in a timely manner.

These commitments also apply to APCs paid for by all other partners of the Charity Open Access Fund (COAF): Arthritis Research UK, Bloodwise, British Heart Foundation, Cancer Research UK, Parkinson's UK.

General Information for All Types of Manuscripts

Margins and Fonts

Electronic text files should be submitted as Word files. Manuscripts should be prepared using Arial 12 point font. Margins on all sides should be at least 25 mm (1 inch), with no right justification.

All sections of the manuscript should be double-spaced. Every page should be numbered. Line numbers are not used; these are added automatically when the manuscript is converted to PDF format.

Arrangement of Sections

There are more specific guidelines for full-length manuscripts, brief communications and case reports; however, the general arrangement of the sections of the manuscript is as follows:

- Title page
- Abstract
- Keywords
- Introduction (untitled; no heading is included)
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements
- Declaration of conflicting interests
- Funding
- References
- Figure legends
- Tables (submit as separate files)

Use of Case Numbers

Number cases starting with case 1 regardless of your particular numbering system. Laboratory case numbers should not be used. Include case numbers in all sections of the manuscript where the cases are described or discussed (eg, case 1–10, case 2, 3, and 5).

Citation of Figures and Tables

Figures and tables are numbered by the order they are cited in the text. For example, the first figure cited in the text is Figure 1, the second cited is Figure 2, etc.

Notes in the text (eg, the manufacturer name, or personal communications) are put in parentheses at the appropriate location within the text. Footnotes are used only for tables and are not used in the body of the text.

Abbreviations and Nomenclature

Abbreviations should be intuitive, kept to a minimum, only for words used ≥ 5 times in the manuscript, and defined at their first mention within the body of the article; for example, "neuron-specific enolase (NSE)."

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

Avoid abbreviations in the abstract. Abbreviations used in tables are spelled out in full in a footnote. Abbreviations used in figure legends should be defined once in each plate of figures.

For anatomic terminology, use the English equivalents of terms used in Nomina Anatomica Veterinaria, and Nomina Histologica Veterinaria. Names of infectious agents should follow published standards for viruses (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses), bacteria (List of prokaryotic names with standing in nomenclature, or Bacterial nomenclature up-to-date) and fungi (Species Fungorum or Mycobank). Bacterial names (genus and species) are italicized (*Mannheimia haemolytica*). Virus names are written in lower case (except for those which are a proper name) and are not italicized (bovine herpesvirus-1, West Nile virus) except when referring generally to the concept of the taxonomic grouping. For listing the genetic strains of mice, use the correct strain/stock/line designation available from the company providing the mice (for example, Mouse Genome Informatics, Jackson Laboratory). Disease names should be those in generally accepted use.

Title Page

The first page should include:

- the full title of the paper
- the full name of each author (eg. first name, middle initials if needed, last name)
- the names and locations of the institutions where the work was conducted, with the authors' initials in parentheses after the appropriate institution; for example: Tokyo University (SH, TK).
- the address, telephone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author.

Authors should create concise, informative and descriptive titles that clearly inform readers of the content of the manuscript. Titles should, where relevant, include the key aspects describing the nature of the work such as the species of animal, name of the disease, specific molecules or cells, disease mechanism, pathogenesis or the clinical-pathologic correlation that is the focus of the work. Titles that focus on the subject of the work are generally more effective than those based on the methods.

Abstract

The abstract should be informative rather than descriptive, and 250 words or less (≤ 150 words for Brief Communications and Case Reports). The abstract should briefly summarize the rationale and methods for the study, but most of the abstract should be a detailed summary of the findings and their significance. Absolute numbers of subjects (either animals or tissue samples) should be given with the percentage in parentheses (eg. "75/250 tissues (30%) stained positively" (but, do not state the percentage if the denominator is less than 10). The species of animal, the number of animals studied, the organ system or tissue evaluated, the technology or methods used, and the disease process should be mentioned in the abstract, as well as alternative names for the disease or causative agent when relevant. Abstracts of review papers should name the topics covered and provide a summary of the main content, rather than simply stating the objectives of the review.

Keywords

Identify key words (up to 119 characters with spaces) and place them after the abstract in alphabetic order. Where possible, use terms from the medical subject headings (MeSH) list of the U.S. National Library of Medicine. The species of animal, the organ system or tissue studied, the technology or methods used, and the disease process should be listed, as well as alternative names for the disease or causative agent when relevant, and other appropriate terms likely to be used by those conducting an internet search. Where possible, these keywords should be repeated in the abstract.

Tables

Tables are used to present key comparisons, summarized data, and selected information of major importance to the outcome of the study. In contrast, the following should be included only as Supplemental Tables: individual-animal data for >20 animals, raw data, data of lesser importance to the study's

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

conclusions, or large data tables that do not fit on a single page of the printed journal.

Tables should be submitted as separate Word or Excel files, not as part of the main document. Tables must be editable and cannot be embedded images in a Word document. Tables are named in the order that they are cited in the text (Table 1, Table 2, etc.).

Table must fit on a single page of the printed journal and must not contain more than 130 characters (including spaces) per row. Larger tables may be included as Supplemental Materials. The title of the table should be complete so that the reader is able to understand the content without reference to the text; the title may be more than one sentence. All parts of a table must be double-spaced and set in full-size type. Omit all vertical lines from the table format. The contents of cells within a column should be balanced to avoid disparity in the amount of text. Empty cells are not permitted; use n/d or n/a if the analysis was not done or not applicable. Rows or columns with identical values should be omitted and mentioned as a footnote or in the text.

Footnotes are designated by superscript letters in order of presentation within the table (^aThis is the note for the first notation in the table. ^bThis is the second note.). A note that applies to the table as a whole should be located at the end of the table title with a superscript letter a (Table Title^a). All abbreviations are included in a single footnote, and not shown by a superscript letter.

Figures

Figure numbering. Figures are numbered (Fig. 1, Fig. 2, etc.) in the order cited in the text. Do not use Fig. 1a, 1b, 1c, etc., except for different staining techniques on the same sample.

****Figure numbers must be placed in the lower left corner of images and should be set in white or black 14-point Arial font with no border.**

Image file format. Images should be TIF files with a resolution of 300 pixels per inch for color and 600 pixels per inch for black and white, and at 90 or 180 mm wide (i.e., one column width or two column widths). The image mode for color figures is RGB, and for black and white figures is Grayscale.

Grouping of images. Figures are usually grouped as a plate with edges directly apposed. Plates must consist of sequentially numbered figures, arranged horizontally in the appropriate order, and they must form a perfect square or rectangle with no white space between or around images. Do not add a border around images; white borders are added later by the publisher. See recent issues of the journal for examples of appropriate figure arrangement in plates. Plates are either 90 or 180 mm wide (1 or 2 columns) and no more than 180 mm high.

Each figure file should contain a single figure or plate. The editors may regroup figures as required to meet typesetting requirements.

Effective methods of presentation include plates that are 2-3 photos wide (180 mm) by ≤4 photos tall (≤180 mm), or 1 photo wide (90 mm) by 2 or 3 photos tall (≤180 mm). Other arrangements are acceptable, depending on the total number of photos to be submitted and how large the images need to be for optimal viewing.

Photographic quality and modifications. Gross and light microscopic images must be in color. Correct anatomic orientation should be maintained; for instance, the surface of the skin should be at the top of the figure, and where possible gross photos should be taken with the head to the right (but the orientation of existing photos must not be flipped).

Photos of microscopic lesions must not contain photographic or tissue artefacts. The images must be evenly lit, and backgrounds of photomicrographs must be white. Gross images should be presented against a clean, uniform, evenly colored background. Before the images are submitted, unacceptable backgrounds (grass, surgery drapes and other textured cloth, rulers, necropsy numbers, etc.) must be removed or the figure prepared with a uniform background of a suitable color.

Image modification or enhancement is acceptable if applied to the entire image, such as changing the brightness, contrast or color balance. It is acceptable to modify the background of specimen photos.

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

Changing a localized area of the tissue or lesion is not normally considered acceptable; it is essential that modifications do not affect the veracity of what is shown, and the image submitted must match the appearance of the real specimen.

Do not use scale bars in gross or histologic images, except in rare cases where their use is critical to the understanding of the image; justification for their use must be included in the cover letter. If required, the bar or scale should be about 1 cm long, placed in the lower right of the image, and its equivalent value (10, 25, 100 μm , etc.) given in the legend, never on the image itself. Scale bars should be included in electron micrographs.

Histologic photos may include an inset such as a higher magnification if needed.

For graphs, the text labels should be in Arial font, at sufficient size to be easily read in the published size of the figure.

Cost of color figures. Authors are allowed two free color plates (that is, two color pages up to 180 x 180 mm), and the cost of remaining plates will be the responsibility of the authors. The cost for each additional color plate will be US \$250. The author will be billed directly by SAGE.

Obtaining permission to publish reprinted material, including reprinting figures from published papers, is the responsibility of the corresponding author.

Figure Legends

Each figure must have a legend. Figure legends should be placed in a separate section at the end of the manuscript within the main Word document, and this section must not contain embedded figures. When uploading figure files to Manuscript Central, please do not upload the individual figure legends directly (leave this option blank).

Information described in the legend must be clearly visible in the photo; do not describe other findings of the study that are not visible in the photo. Abbreviations used in figure legends should be defined once in each plate of figures.

Figure legends should be concisely written. For gross and microscopic images, figure legends should be based on the following style as appropriate: **Figure 1.** Diagnosis, organ or tissue, species, case number if needed. Brief description of the change that is visible in the photo. Name of the stain or labeling method (eg. hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, immunohistochemistry for cytokeratin). For immunohistochemistry, other styles may be used to avoid repetition, such as "The neoplastic cells have cytoplasmic immunolabelling for cytokeratin".

For figure panels that include multiple images with the same diagnosis, figure legends should be grouped to avoid repetition. For example, **Figures 1-4.** *Leishmania infantum* chagasi infection, right atrial myocardium, dog. **Figure 1.** Amastigotes in the cytoplasm of a macrophage. Immunohistochemistry for *Leishmania*. **Figure 2.** Lymphocytes infiltrate the subepicardial region. Hematoxylin and eosin (HE). **Figure 3.** There is coagulative necrosis of cardiac myocytes. HE. **Figure 4.** The interstitium is expanded by collagen. Masson's trichrome.

For illustrations of other laboratory data such as graphs and photos of gels, figure legends should briefly mention the methodology and indicate the important findings where necessary, at a level of detail that allows the reader to understand the data being presented. However, the text of the materials and methods or the results should not be repeated.

Supplemental Figure legends should be submitted in a separate Word file.

Acknowledgements

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an 'Acknowledgements' section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Declaration of Conflicting Interests

State any potential conflicts of interest such as those related to financial support for the study or a financial interest in the study outcomes or product being tested (see also the above section "Conflict of Interest Policy"). If there are none, state: "The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article."

Funding

List the sources of funding for the study (see also the above section "Conflict of Interest Policy"). If there was none, state: "The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article."

References

Only published materials or material that has been accepted for publication should be listed in the References section. In the case of accepted articles that are not yet available online, a copy of the letter of acceptance and the manuscript itself should be provided; these are uploaded as supplementary files, for viewing by the editorial staff and reviewers. Personal communications and personal observations should be used sparingly and cited in parentheses in the text (eg. JB Williams, personal communication).

In the text, citations should be in superscript, have no parentheses, and follow all punctuation marks (eg. Previous studies have shown that mice are good models of this disease.^{1,7,9-11}).

The reference list should be arranged alphabetically and references numbered consecutively. Journal abbreviations should be those used in Index Medicus.

Article in a journal, ≤6 authors: Holman RT, Wiese HF, Smith AN. Essential fatty acid deficiency. *Am J Pathol.* 1976;95:255–257.

Article in a journal, >6 authors (list the first 3, then et al.): Ortega J, Uzal FA, Walker R, et al. Zygomycotic lymphadenitis in slaughtered feedlot cattle. *Am J Pathol.* 2009;47:108–114.

Supplement in a journal: Nardley HJ. Sterols and keratinization. *Br J Dermatol.* 1969;81(Suppl 2):29–42.

Chapter in a book (for which each chapter has a different author): Sligh EG. Neutral lipid storage disease. In: Dyer WJ, ed. *Biochemistry of Lipids.* 5th ed. London, UK: Academic Press; 1956:471–476.

Book (for which the entire book has the same authors): Modlin J, Jenkins P. *Decision Analysis in Planning for a Polio Outbreak in the United States.* San Francisco, CA: Pediatric Academic Societies; 2004.

Supplemental Materials

Supplemental material is published electronically on the journal website and does not appear in the print version of the journal, but is readily accessed from the journal's website (from the citation of the paper, and from the table of contents). In general, information that is necessary to understand and provide validity to the study (i.e. information used by most readers) is included in the main part of the manuscript, whereas information that is needed only for detailed analysis and critique (i.e. information to a small number of readers) should be moved to supplemental materials. By so doing, this can remove distractions, thereby making the paper easier to read and focusing readers' attention on the key outcomes of the study. Information that should be included in Supplemental materials and not in the main text of the paper includes:

- Tables describing semi-quantitative scoring systems, unless the scoring system is a main

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

outcome of the study

- Details of the methods that would be needed to replicate the findings or fully describe the methods, but are not needed for readers to understand the work that was done
- Tables of individual-animal data that are large or include >20 animals
- Tables containing large amounts of text, or are too large to be printed in portrait orientation on one page. Tables must not have more than 130 characters (including spaces) per row.
- Detailed tables of data that are adequately summarized in the text, or are included for completeness but not needed to understand the main outcome of the study
- Additional photographs of lesions, or videos.

Reference to each supplemental material should be made in the main text of the paper (eg. Supplemental Figure S1, Supplemental Table S2, etc.), and their legends/titles should be labeled in the same way.

Supplemental Materials should be submitted in the format for publication because they are not type-set or edited by the publisher and are not provided with the page proofs.

For Supplemental Figures, the figure name (Supplemental Figure S1) is included in the legend, and the abbreviated figure name (S1, S2, etc.) is added to the lower left corner of each photo. Figure size and formatting are as described above; submit as TIF files.

Supplemental figures legends are grouped and submitted as a separate Word document.

Supplemental tables should be single-spaced and may include borders as needed for clarity; the layout should be as published. Large tables of data may be posted online as an Excel file rather than a pdf file; please notify the editor of such requests.

Types of Manuscripts

Full Length Manuscripts

Full-length manuscripts contain the following sections, in order: Introduction (untitled; no heading is included), Materials and Methods, Results, Discussion, References, and Figure Legends. Logical subheadings (but not sub-subheadings) may be used for groups of ≥ 2 paragraphs. Tables should be uploaded to Manuscript Central as separate Word or Excel files, and Supplemental Figure legends should be grouped and uploaded in a separate Word file.

Titles should be concise and clearly inform readers of the content of the manuscript, with important words placed near the beginning of the title. Titles should, where relevant, include the key aspects describing the nature of the work such as the name of the disease, specific molecules or cells, and animal species that is the focus of the work. Titles that focus on the outcome of the work are generally more effective than those based on the methods. Reviews should include the word "review" in the title and keywords.

The Abstract should be informative rather than descriptive, and 250 words or less. The abstract should briefly summarize the rationale and methods for the study, but most of the abstract should be a detailed summary of the findings and their significance. Absolute numbers of subjects (either animals or tissue samples) should be given with the percentage in parentheses; for example, "75/250 tissues (30%) stained positively" (but, do not state the percentage if the denominator is less than 10).

The abstract should mention (as appropriate) the species of animal, the number of animals studied, the organ system or tissue evaluated, the technology or methods used, and the disease process, as well as alternative names for the disease or causative agent when relevant. Linnean nomenclature (eg. sugar glider, *Petaurus breviceps*) should be included in the abstract for all but common domestic species.

The Introduction may include a short summary of the disease or problem studied, a focused summary of relevant prior studies, the rationale for the investigation, and the specific objectives or hypotheses. The

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

Introduction is not a comprehensive review of the disease or topic, but instead is focused on providing adequate background information for the reader to understand the study. The last paragraph of the introduction should normally include a clear statement of hypothesis or objectives of the study. The introduction should not describe the experimental approach, methodology or results.

The Materials and Methods describe the selection of case material (including their provenance, and inclusion and exclusion criteria), the methodology at a level of detail allowing knowledgeable colleagues to repeat the study, and the statistical analysis. Tables of immunohistochemistry or PCR methods should be moved to Supplemental Materials. Where relevant, authors should consult published standards for minimum information about reporting animal studies ([ARRIVE guidelines](#)), experiments using microarrays ([MIAME](#)), proteomics ([MIAPE](#)), or quantitative real-time PCR ([MIQE](#)), and randomized clinical trials ([CONSORT](#)).

Manuscripts reporting original research must include a statement of the data availability at the end of the Materials and Methods, which informs readers of whether the underlying data will be made available or not, and if so the location at which readers can access the data (and, when relevant, the date when the data will be made available and any restrictions on availability).

This statement may take the following form: *The data analysed in this study are / are not available as Supplemental Materials* (or by stating the name of the repository, permanent weblink, request to the author, etc).

Results should not be exhaustive but instead focused on the major findings of the study. The text should not repeat the findings listed in tables or figures, but instead describe a different aspect of the findings. Results that are not critical to the conclusions of the study (including large tables of individual animal data, and scoring systems for semi-quantification of lesions) should be moved to Supplemental Materials. Summary data are reported as absolute numbers with percentages; eg. "positive staining in 15/20 cases (75%)" (but, do not state the percentage if the denominator is less than 10). Statistical results described in the text or figure legend should normally mention the method used and the number per group (eg. $P=0.015$, Student's t- test, $n=12$ cases per group).

The Discussion often begins with a brief re-iteration of the main hypothesis or objectives and a summary of the main outcomes in relation to this rationale. Depending on the nature of the study, subsequent paragraphs may: (a) summarize the findings without repeating what was stated in the Results, (b) discuss the suitability or validity of the cases, methodology, or experimental system studied, (c) consider the possible interpretations of the data including corroboration or contradiction of the hypothesis, (d) develop an argument in support of the favoured interpretation, (e) compare the findings with that of prior studies, (f) address any important limitations of the study, and (f) report the implications and importance of the findings without excessive speculation.

The final paragraph of the discussion should summarize the major findings and practical recommendations based on the outcomes of the study. The methodology is not normally mentioned, but instead summarize the key findings of the paper that will be of value to readers. The conclusions should be stated specifically rather than as a generality, and they should not be speculative, but based on the factual outcomes of the study.

Brief Communications and Case Reports

Brief communications are used when the extent of the investigation or the findings do not warrant a full paper.

Collections of ≤ 3 cases are normally considered a case report rather than a case series. A case report must provide a novel pathologic description of substantial value to veterinary pathologists. The following are not usually sufficient for publication as a case report: a known entity in an unusual species of animal, a neoplasm in an unusual location, concurrent finding of two unrelated conditions in the same animal, the first occurrence of a disease in a geographic region, or novel findings of trivial importance or that do not provide

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

substantial value to readers. Multiple-animal case series of such disease conditions are encouraged if they are novel and advance knowledge in pathologic diagnosis, clinical relevance of pathologic findings, or understanding of disease mechanisms.

Brief communications and case reports are limited to 4 pages of printed material: ≤ 1700 words in the body of the text, two plates of ≤ 8 figures total, no more than 1 table, and no more than 20 references. Additional information and photos, if relevant and of high quality, may be included as Supplemental materials.

Brief communications and case reports should have only the following headings: Abstract, Acknowledgements, References, and Figure Legends. Headings are not used for Materials and methods, Results, and Discussion.

Abstracts for brief communications and case reports are limited to 150 words. For descriptions of >1 cases, the findings should be described in aggregate rather than as a series of individual case reports. Case reports focus on presenting the findings of the case and their interpretation and implications, not a review of the associated literature. The concluding paragraph should be a summary of the important novel features of the case.

Reviews

Authors are encouraged to discuss the content with editorial staff prior to writing review papers, to ensure the topic and scope are suitable for the journal. Reviews should include a title page, abstract, and key words as described above.

The word "review" should be included in the title and keywords. Concise reviews focused on a narrowly defined topic are usually more effective than long reviews of a broad topic.

Meeting Reports

Veterinary Pathology does not normally publish meeting reports, but encourages submission of review papers arising from topics presented at meetings and conferences.

Letters to the Editor

Letters to the editor are considered for publication provided they have not been submitted or published elsewhere. Letters must provide scientific or educational value to readers. Subject matter can include useful critique of recent articles in *Veterinary Pathology*, current medical issues, and scientific issues relevant to the ACVP, ECVF and JCVF

Letters should be based on published references. Case descriptions, new unpublished data, or arguments promoting future research are not normally considered, unless they are of considerable timely significance. The suitability for publication is decided by the Editor.

Letters are submitted via the online system as described above. All individuals submitting a letter must sign or be willing to sign the letter, and they must provide their full names, titles, institutional affiliations, and addresses. The principal submitter should also provide telephone and fax numbers and an e-mail address. All individuals submitting a letter must disclose any financial associations or other possible conflicts of interest related to the letter.

Guest Editorials

Guest editorials are normally solicited from experts by editorial staff, and usually refer to a recently published paper in the journal. The objective is to highlight papers with particular novelty or impact, to provide additional insights and value to the paper, and to provide a second perspective on the findings that will enhance reader's understanding or appreciation of the findings. They should provide additional background or a concise review of the topic area, include insights and additional dimensions beyond those given in the accompanying paper, and explain the significance of the research findings or the current event.

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

Guest editorials must not be simply a summary of the paper's methods and findings. Guest editorials are normally less than 1000 words, with no abstract or keywords, should be directed to a non-specialized audience, and are not normally peer-reviewed. Authors are encouraged to include figures.

Commentaries

Commentaries provide insight, perspective and factually based opinion on a topic of current scientific interest to readers. A pre-submission inquiry to the editor is recommended. Commentaries may or may not be peer-reviewed, depending on the nature of the content.

Image Challenge

Veterinary Pathology invites submission of original, high-quality gross, histology or cytology images for consideration as an Image Challenge, along with a multiple choice question and answer. The aim is to share exceptional images and to help readers improve their knowledge. The Image Challenge is not a case report. It uses case-based images to illustrate and educate on a common theme. The primary criteria are 1) the condition is interesting, 2) the image shows a typical example, 3) readers must be able to formulate a diagnosis based on the single image without magnification, and 4) the image is of high quality. Images should show typical findings or common variants of known conditions rather than "once-in-a-lifetime" cases or atypical case presentations.

Each submission should include one original high-quality color image as a TIF file, and question and answer text submitted as a single Word file. One or 2 additional TIF images may be used to support the answer. The image must be in sharp focus and clearly show the features described, and readers must be able to formulate a diagnosis based on the single image without magnification. The image should be 90 mm wide, 300 dpi, and RGB (not CMYK) image mode. Do not include the figure number in the lower left corner, or a border. Images for questions should not have any annotations. If annotations (arrows, asterisks, etc.) are included in images for answers, please also send the same image without annotations. Do not include scale bars in gross or histologic images unless it is essential for diagnosis.

The multiple choice question should have 3-4 possible and viable answers. Indicate the species and anatomic location. The answer should be no more than 100 words, summarize the important features of the case, and may include one reference. For each question, the name of one contributor and their affiliation will be placed at the end of the answer. Unsuitable images will be returned; the publication of potentially suitable images may be delayed until a theme-based collection is assembled.

Contributors must agree to a non-exclusive grant of rights and a declaration of potential conflicting interests. Submissions must be original images and information that have not been published previously and are not under consideration for publication elsewhere.

For consideration, email the image, question and answer to: vpimagechallenge@gmail.com. Image Challenges are submitted via this email address, not through the usual website for submission of manuscripts.

Obituaries

Obituaries, normally of college members or those with a particular relationship with the colleges, are published without charge for the first page. Subsequent pages incur a cost of US\$100 per page. One page is approximately 480 words with a 90 x 70 mm photo, or 700 words text-only. Please submit through <http://mc.manuscriptcentral.com/vetpath> as for a usual manuscript.

Production and Page Proof Corrections

Your SAGE Production Editor will keep you informed as to your article's progress throughout the production process. Proofs will be made available to the corresponding author via our editing portal SAGE Edit or by email, and corrections should be made directly or notified to us promptly. Authors are reminded to check their proofs carefully to confirm that all author information, including names, affiliations, sequence and contact details are correct, and that Funding and Conflict of Interest statements, if any, are accurate.

Veterinary Pathology: Instructions to Authors

Please note that if there are any changes to the author list at this stage all authors will be required to complete and sign a form authorising the change.

Page proofs will be e-mailed to the author about 3 weeks from the date that the article was submitted to the publisher. Proofs should be checked carefully for typographical errors, mathematical errors, and any other necessary corrections. Please ensure that all tables and figures are correct, including their headers, content, and spacing and alignment. The journal editor will need to approve any substantial rewriting. These proofs are an opportunity to correct any errors that may have been introduced during the production process, not an opportunity for rewriting. In addition to journal editor approval, a fee of \$2 per line will be charged for extensive rewriting not due to SAGE error or request. Instructions for how to submit page proof corrections will be e-mailed with page proofs. Supplemental files are published online as submitted (they are not typeset or edited by the publisher) and are not included with the page proofs.

Version: 28-Apr-2019