

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ALTERAÇÕES CLÍNICAS, PROTÉICAS DO HUMOR AQUOSO,
SOROLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS EM OLHOS DE
CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758), INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE, POR VIA CONJUNTIVAL, COM
Leishmania (Leishmania) chagasi (CUNHA & CHAGAS, 1937)**

Andréa Gomes Ribeiro

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ALTERAÇÕES CLÍNICAS, PROTÉICAS DO HUMOR AQUOSO,
SOROLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS EM OLHOS DE
CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758), INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE, POR VIA CONJUNTIVAL, COM
Leishmania (Leishmania) chagasi (CUNHA & CHAGAS, 1937)**

Andréa Gomes Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Junho de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉA GOMES RIBEIRO – nascida em 27 de setembro de 1970, em Fortaleza, Ceará. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Ceará – UECE, em agosto de 1996, e em Direito pela Universidade de Fortaleza – UNIFOR, em dezembro de 1999. Especializou-se em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais pela Escola Superior de Agricultura de Mossoró – ESAM, em agosto de 2004. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal, em nível de mestrado, sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus, em Março de 2005. Em março de 2006, ingressou como professora substituta da Universidade Estadual do Ceará – UECE, sendo responsável pelas disciplinas de Clínica Médica de Pequenos Animais e de Cinotecnia.

Dedico

*Aos meus dois amores, Afrânio e Caio, por todo o amor e
compreensão do tempo subtraído de convívio, e das tantas horas
de ausência.*

Ofereço

À minha mãe Ivoneide, por seu incomensurável amor, seu infinito zelo e sua dedicação. Não teria palavras para agradecer-lá, tampouco uma forma equivalente de retribuí-la.

Amo você, mamãe!

Agradecimentos

A Deus, sem o qual nada seria possível.

Ao Prof. Dr. José Luiz Laus, pela confiança depositada, e, sobretudo pela oportunidade de partilhar seus admiráveis conhecimentos em Oftalmologia Veterinária. Saiba que o admiro e respeito. Tenho orgulho de ser sua orientada.

Ao Prof. Dr. Leucio Câmara Alves. Não encontro palavras para descrevê-lo. Mestre, talvez! Que além de trabalho, ensina a amar. Mostra que o importante é ser feliz e ajudar o próximo. Faz da sua equipe, uma família solidária. Conhecê-lo tornou-me uma pessoa melhor! Suas lições me acompanharão por toda a vida. Obrigada.

Ao Prof. Dr. Fábio Luis da Cunha Brito, pelo ilimitado apoio na realização desse trabalho, e pela amizade despendida.

A todos os professores e pós-graduandos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelos ensinamentos, pela disponibilidade em ajudar e pela amizade despretensiosa. É um prazer conviver com vocês!

Aos professores e colegas da pós-graduação da UNESP, pela ajuda do dia-a-dia e, sobretudo, pelo apoio nas horas de "Saudades da Família".

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento da pesquisa.

Aos meus funcionários, tão queridos e solícitos, pelo apoio técnico incondicional na realização da parte experimental.

Bianca! Como se agradece uma amizade? Adoro conviver e compartilhar minha vida com você. Obrigada por existir e tornar a minha pós-graduação mais leve!

Virgínia! Nós somos a prova de que a primeira impressão "não é a que fica"! Adoro você, acredita?

À minha família, em especial ao meu marido Afrânio Melo, fonte inesgotável de apoio e incentivo. Amo você... mais do que ontem... menos do que amanhã!

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Sinais Clínicos da LVC.....	3
2.2 Sinais Oculares Associados à LVC.....	4
2.3 Imunopatologia da Doença Ocular na LVC.....	6
2.4 Anticorpos Séricos e Oculares na LVC	8
2.5 Histopatologia da Doença Ocular na LVC.....	9
2.6 Diagnóstico.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Aspectos Éticos.....	13
3.2 Seleção dos Animais.....	14
3.2.1 Avaliação Clínica.....	14
3.2.2 Avaliação Oftálmica.....	14
3.2.3 Coleta do Material Destinado à Parasitologia	15
3.2.3.1 Biópsia de Medula Óssea.....	15
3.2.3.2 Raspado de Pele Íntegra.....	15
3.2.4 Coleta de Material Destinado à Sorologia.....	15
3.2.5 Sorologia.....	16
3.2.6 Coleta do Material para Hemograma e Pesquisa de Hematozoários.....	16
3.3 Terapêutica Utilizada nos Animais após a Avaliação Clínica e Hematológica.....	17
3.4 Grupos Experimentais.....	17
3.5 Infecção Experimental	17
3.5.1 CEPA de <i>Leishmania</i> sp.....	17
3.5.2 Inoculação.....	18
3.5.3 Acompanhamento dos Animais dos Grupos Inoculado (GI) e Controle (GC).18	

3.6 Pesquisa parasitológica de formas amastigotas de <i>Leishmania (L.) chagasi</i>	19
3.7 Testes Sorológicos.....	19
3.7.1 Coleta do Humor Aquoso.....	19
3.7.2 Teste ELISA do Humor Aquoso.....	20
3.8 Histopatologia.....	20
3.9 Análise à Estatística.....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1 Sinais Clínicos dos Animais dos Grupos Inoculado (GI) e Controle (GC).....	21
4.1.1 Secreção Ocular.....	21
4.1.2 Opacidade Corneal.....	22
4.1.3 Hiperemia Conjuntival.....	23
4.1.4 Uveíte.....	25
4.2 Sorologia.....	25
4.3 Biópsia de Medula Óssea.....	25
4.4 Histopatologia do Globo Ocular.....	25
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÕES.....	40
7. REFERÊNCIAS	41

ALTERAÇÕES CLÍNICAS, PROTÉICAS DO HUMOR AQUOSO, SOROLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS EM OLHOS DE CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758), INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE, POR VIA CONJUNTIVAL, COM *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)

RESUMO – Avaliaram-se as alterações oftálmicas, protéicas do humor aquoso, sorológicas e histopatológicas em cães infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) chagasi* por via conjuntival. Selecionaram-se dez cães saudáveis após exame clínico, prova sorológica de ELISA para *Leishmania* sp e microscopia de luz de esfregaços de medula óssea. Dois grupos de cães compuseram o estudo. O Grupo Inoculado (GI) foi constituído por sete animais, que receberam 150µL de uma solução de cultura de *Leishmania (Leishmania) chagasi* por via conjuntival, e o Grupo Controle (GC) por três animais, inoculados com solução salina fisiológica, pela mesma via. Os cães foram monitorados quanto às alterações oculares às 2, 4, 6, 12 e 24h após a instilação. Em seguida, diariamente por uma semana, e a partir daí, uma vez por semana, até que se completassem os 60 dias pós-infecção. Amostras de sangue e de humor aquoso de ambos os olhos e esfregaços de medula óssea foram coletados aos 60 dias, para sorologia, análise protéica e parasitologia, respectivamente. Todos os animais do GI mostraram sinais oculares unilaterais ou bilaterais, particularmente opacidades corneais. Não somente os resultados dos anticorpos anti-*Leishmania* sp no soro e no humor aquoso, como também a parasitologia, resultaram negativos. A histopatologia dos olhos de cães do grupo infectado por *Leishmania* revelou resposta inflamatória caracterizada por infiltração de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas, notadamente na terceira pálpebra, na conjuntiva e na glândula lacrimal. Edema, congestão e perivasculite difusa envolvendo o trato uveal, igualmente foram observados.

Palavras – chave: calazar canino, olho, patologia

**OCULAR SIGNS, PROTEIN OF AQUEOUS HUMOUR, SEROLOGICAL AND
STRUCTURAL CHANGES IN THE DOGS' EYES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758),
INFECTED EXPERIMENTALLY BY THE CONJUNCTIVAL ROUTE OF EXPOSURE WITH
Leishmania (Leishmania) chagasi (CUNHA & CHAGAS, 1937)**

SUMMARY - The aim of this study was to evaluate the ocular signs protein of aqueous humour, serological and structural changes in the dogs' eyes infected experimentally by the conjunctival route of exposure with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. A total of 10 healthy dogs were submitted to clinical examination, assayed by the ELISA test for anti- *Leishmania* sp antibodies and also microscopic examination of bone marrow smears. Two groups of dogs were studied. The first, Inoculated Group (IG) consisted of seven animal which one received a 150µL of *Leishmania (Leishmania) chagasi* suspension by the conjunctival route and the Control Group (CG) consisted of three animals inoculated by the saline physiological solution at the same route. The dogs were ophthalmology monitored at 2, 4, 6, 12 e 24 hours pos instillation. After this period, they were monitored once a day for one week and then, once a week until 60 days were complete. Blood samples, aqueous humor of both eyes and bone marrow smears were collected at 60 days for serology , protein of aqueous humour analyses and parasitological examination. All animals from IG showed unilateral or bilateral ocular signs, particularly corneal opacification. Not only the results of anti- *Leishmania* sp antibodies in sera and aqueous humor but also the parasitological examinations were negative. The histopathologic evaluation of eyes in the *Leishmania*-infected dogs revealed inflammatory response characterized by macrophages infiltration, lymphocytes and plasma cells particularly on the third eyelid, the conjunctive tissue and lacrimal gland. Edema, congestion and a diffuse perivasculitis involving the uveal tract were also observed.

Keywords: canine Kalazar, eye, pathology.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) ou calazar canino exhibe ampla miríade de sinais clínicos que, na dependência da resposta imune apresentada pelo hospedeiro (SANTOS-GOMES et al., 2002), pode se manifestar sob a forma aguda ou crônica, evoluindo, na maioria dos casos, para o óbito (ALMEIDA et al., 2005).

No Brasil, a despeito da diversidade de espécies de protozoários pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* (MARZOCHI et al., 1985), apenas a *Leishmania (Leishmania) chagasi* tem sido imputada como agente causal da leishmaniose visceral ou calazar, tanto no homem quanto no cão doméstico. O cão se destaca por seu importante papel na cadeia epidemiológica da doença, porquanto é o principal reservatório urbano da infecção, cuja transmissão é dependente de populações de *Lutzomyia longipalpis* (CAMARGO & BARCINSKY, 2003).

As repercussões clínicas suscitadas pela LVC comumente incluem lesões cutâneas (CIARAMELLA et al., 1997), hepatoesplenomegalia, linfadenopatia (STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001), alterações renais e articulares (ALBUQUERQUE, 2006). Lesões oculares foram descritas acometendo principalmente o segmento anterior (MOLLEDA et al., 1993; PEÑA et al., 2000; BRITO et al., 2004; BRITO, 2006). Sobressaem-se as blefarites e as ceratopatias, além das lesões conjuntivais e das uveítes. Alterações retinianas têm sido reportadas (FERRER et al., 1988; SLAPPENDEL et al., 1988; FERRER, 1999; DE COPEGUI, 2000; FEITOSA et al., 2000; LEIVA et al., 2002).

KOUTINAS et al. (1999) referem que o parasitismo direto pode ser determinante na etiopatogenia das lesões oculares, no entanto, mecanismos imunemediados estão, habitualmente, associados.

A despeito do grande número de estudos sobre a patogenia e as lesões que cursam com a LVC, ainda permanece obscura a patofisiologia de uma série de lesões oculares, onde a barreira hemato-ocular e a conjuntiva participam como obstáculo à entrada de microorganismos e, adjunto, conferem proteção imune. Em virtude da importância do calazar canino na clínica de pequenos animais, notadamente em regiões

endêmicas, e das oftalmopatias que a ele se associam, estudaram-se as alterações clínicas, oftálmicas, protéicas do humor aquoso, à sorologia e à histopatologia, ensejadas pela infecção experimental por *Leishmania chagasi* por via tópica ocular em cães. Outrossim, se tal via de infecção configura-se como factível e experimentalmente viável na LVC.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SINAIS CLÍNICOS DA LVC

A despeito de serem inoculadas na pele, diferentes espécies de *Leishmania* têm preferência por órgãos distintos, causando lesões maiores ou menores, produzindo ou não metástases, podendo ou não ser autocuráveis. Induzem à imunidade permanente ou temporária e, às vezes, a nenhuma imunidade. Esse conjunto de fatores e suas possíveis combinações, aliados à capacidade de resposta do paciente, são os responsáveis pelas diversas formas clínicas da doença (CAMARGO & BARCINSKI, 2003).

Atualmente, a LVC é considerada uma enfermidade em que participam eventos mediados pelo sistema imune, porquanto alterações na atividade das células T e B provocam a gênese de imunocomplexos circulantes, que motivam desordens em diversos órgãos (GARCIA-ALONSO et al., 1996a; NOLI, 1999). Trata-se de enfermidade de natureza consumptiva e imunossupressora (CAMARGO & BARCINSKI, 2003), cuja apresentação crônica é mais comum que a aguda (KOUTINAS et al., 1999).

Cães acometidos exibem diversidade de quadros clínicos, com espectro de características que varia de aparente hígidez a severo estágio terminal (FERRER, 1999). Animais acometidos podem ser classificados em assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos (BRASIL, 2004).

As manifestações clínicas gerais na LVC incluem anorexia, decréscimo da atividade física, intolerância ao exercício, depressão, atrofia de musculatura mastigatória atribuída à progressiva polimiosite imunemediada (KOUTINAS et al., 1999), emagrecimento progressivo, febre irregular, apatia (FEITOSA et al., 2000), rinite, secreção nasal, tosse e claudicação (DE COPEGUI, 2000; STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001).

BEVILACQUA et al. (2002) relataram a existência de alterações osteoarticulares, notadamente a osteoartrite, envolvendo diferentes graus de osteólise, em ossos e articulações de cães acometidos pela LV.

Os sinais cutâneos mais comuns incluem alopecia simétrica bilateral (KOUTINAS et al., 1999), seborréia seca difusa não pruriginosa, erosão nasal, facial e em extremidades (DE COPEGUI, 2000), cuja etiopatogenia associa-se, provavelmente, à vasculite ou à ação direta do parasita (KOUTINAS et al., 1999), descamação furfurácea da pele, presença de nódulos que, eventualmente, podem ulcerar-se, particularmente no focinho, orelhas e extremidades (MOLLEDA et al., 1993), onicogribose (DE COPEGUI, 2000 ; FEITOSA et al., 2000), com severo parasitismo no leito das unhas, hiperqueratose nasal, digital e nos coxins plantares (KOUTINAS et al., 1999). Pode haver piodermite superficial secundária e lesões semelhantes ao impetigo, abrigando formas amastigotas do parasita (KOUTINAS et al., 1999).

Estomatite ulcerativa e colite são relatadas como associadas à doença renal (KOUTINAS et al., 1999). Manifestam-se diarreia, melena e vômitos (DE COPEGUI, 2000; STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001). Pode haver ascite (KOUTINAS et al., 1999; STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001). A deposição de imunocomplexos circulantes em líquido sinovial induz a poliartrites (KOUTINAS et al., 1999).

A proliferação de linfócitos B, de histiócitos e de macrófagos resulta em linfadenopatia localizada, notadamente dos poplíteos e pré-escapulares (KOUTINAS et al., 1999) ou generalizada (SLAPPENDEL & GREENE, 1990; STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001).

No estágio terminal da doença, decorrem caquexia, com atrofia da musculatura facial, epistaxe (FERRER, 1999), por inflamação ou úlceras na mucosa nasal ou por trombocitopenia e diátese hemorrágica (KOUTINAS et al., 1999). Evidenciam-se, ainda, hepatoesplenomegalia, anemia, hematoquezia, paresia de membros pélvicos (BRASIL, 2004), poliúria e polidipsia, por falência renal (DE COPEGUI, 2000; STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001) e, não raramente, decorre o óbito (THOMÉ, 1999).

2.2 SINAIS OCULARES ASSOCIADOS À LVC

GARCIA-ALONSO et al. (1998) informaram que as oftalmopatias que cursam com a LVC podem ou não estar associadas a sinais sistêmicos e, na maioria dos casos,

se apresentam de forma bilateral. Diversos fatores estão relacionados à sua origem, quer seja em relação à espécie e ao tropismo do parasita, quer quanto ao tipo e a duração da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado (GARCIA-ALONSO et al., 1996a).

Em cães com LV, o segmento anterior é, comumente, o mais afetado (MOLLEDA et al., 1993). BRITO (2004), contudo, relatou coriorretinite em um cão naturalmente infectado, ressaltando a dificuldade de se realizar a oftalmoscopia, porquanto em animais acometidos normalmente decorre perda de transparência de estruturas do segmento anterior.

Lesões próprias ao olho e comprometendo os seus anexos têm sido descritas. Sobressaem as blefarites, que podem se apresentar na forma erosiva, nodular ou granulomatosa (FERRER et al., 1988) e, ordinariamente, estão associadas a dermatites faciais (MOLLEDA et al., 1993; KOUTINAS et al., 1999) ou à celulite orbital (PEÑA et al., 2000).

EL HASAN et al. (1998) observaram que a conjuntivite geralmente decorre da extensão direta das lesões cutâneas, podendo, no entanto, advir da via hematogena, sendo clinicamente representada por hiperemia, quemose e exsudato purulento (SLAPPENDEL et al., 1988; BRITO, 2004).

Edema, ulceração corneal e “melting” foram referidos por LEIVA et al. (2002), e “distrofia” corneal por ROZE (2002). BRITO et al. (2004) pioneiramente relataram a presença de formas amastigotas do parasita em um caso de úlcera corneal.

Ceratoconjuntivites, independentes da sua natureza (FERRER, 1999; KOUTINAS et al., 1999; FEITOSA et al., 2000; PEÑA et al., 2000), têm sido observadas em cães infectados com *Leishmania* sp. Decorrem edema corneal focal ou difuso, vascularização e infiltrado celular intersticial, geralmente próximo à junção esclerocorneal (MOLLEDA et al., 1993).

As uveítes se apresentam como uma condição freqüente (FERRER, 1999; FEITOSA et al., 2000). Associam-se hipópio, hifema e hemorragia retiniana (MOLLEDA et al., 1993), nódulos na íris, com ou sem sinéquias (EL HASSAN et al., 1998), e glaucomas (FERRER, 1999).

Considera-se como factível a diminuição da produção lacrimal decorrente da inflamação crônica da membrana nictitante e da glândula lacrimal (GARCIA-ALONSO et al., 1996a), ou pela ação destrutiva do parasita sobre o aparelho lacrimal. Outrossim, por adenite imunemediada (KOUTINAS et al., 1999).

Outros achados incluem catarata, ciclite, corioretinite, hemorragias retinianas (MOLLEDA et al., 1993), descolamento de retina (ROZE, 1986; PUMAROLA et al., 1991; FERRER, 1999; KOUTINAS et al., 1999; MARTINS & STILES, 2003) e retinites (DE COPEGUI, 2000). Mais raramente, o exoftalmo e o estrabismo (ROZE, 2002).

2.3 IMUNOPATOLOGIA DA DOENÇA OCULAR NA LVC

Células do sistema imune são organizadas e exercem funções específicas em sítios definidos do hospedeiro vertebrado. Podem ser observadas, em um mesmo hospedeiro, duas barreiras eficazes contra a invasão de patógenos: a hemato-encefálica (BHE) e a hemato-ocular (BHO), com alguma individualidade. A BHE compreende um conjunto complexo de defesa do cérebro, enquanto a BHO torna o interior do bulbo do olho praticamente isolado (PEIFFER JUNIOR, 1980).

As defesas imunes do olho possuem características próprias, contudo, acham-se intimamente ligadas ao restante do sistema imune, agindo em conjunto (EICHENBAUM et al., 1987). Compõe-se, essencialmente, por quatro sítios importantes: o fluido lacrimal e a conjuntiva, a esclera, a úvea e a retina (BIELORY, 1991).

Segundo EICHENBAUM et al. (1987), a ausência de vascularização corneal adjunto à inexistência de drenagem linfática, atuam como obstáculo à resposta imune. Por sua vez, a conjuntiva e a úvea representam os centros primários de atividade linfóide no olho. Tecido linfóide associado à conjuntiva (CALT) e células de Langerhans são primordiais para a apresentação de antígenos.

Fatores como a barreira hemato-aquosa, o seqüestro de antígenos na retina, a imunomodulação no humor aquoso, somados à evasão da resposta imune na câmara anterior, conferem ao olho um *status* de ambiente “imunologicamente privilegiado” (ROCHA et al., 1992, ROCHA et al., 1994).

A resposta imune ocular desencadeada agrega-se a diversos fatores, que podem agir isoladamente ou em associação (EICHENBAUM et al., 1987). Anticorpos podem ser encontrados em todas as estruturas oculares, por sua produção local. Na conjuntiva, posteriormente ao reconhecimento do antígeno pelo sistema linfóide, podem ser encontrados linfócitos B e, por conseguinte, imunoglobulinas das classes IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Não obstante, deve-se recordar a existência da imunidade mediada por células na córnea e, também, de proteínas do sistema complemento no limbo (EICHENBAUM et al., 1987).

Condições patológicas suscitadas pela *Leishmania* sp derivam de eventos inflamatórios e degenerativos que o parasita induz no hospedeiro, bem como pela gênese e deposição de imunocomplexos (NIETO et al., 1999). Como consequência da regulação de linfócitos T e da produção de linfócitos B, geram-se grandes quantidades de imunocomplexos circulantes (GOTO & LINDOSO, 2004), que se depositam nas paredes dos vasos sanguíneos em órgãos diversos (FERRER, 2002). Há sólidas evidências de que eles desempenham papel decisório, notadamente nas vasculites, nas glomerulonefrites, nas artrites e nas uveítes (COCHRANE & KOFLER, 1973; RAHI et al., 1973 THIRKILL et al., 1992). Segundo GARCIA-ALONSO et al. (1998), desencadeia-se uma enfermidade oftálmica própria, específica da LVC, à qual denomina Leishmaniose Ocular Canina (LOC), com características peculiares e próprias à resposta imune a antígenos do parasita.

A presença de imunocomplexos em diferentes componentes do olho, notadamente no limbo esclerocorneal, no corpo ciliar e na íris, induz a efeitos lesivos decorrentes da ação de mediadores inflamatórios que, juntamente com o sistema complemento, promovem a liberação de proteínas e de enzimas lisossomais, induzindo à lise celular e conseqüente lesão ocular (GARCIA-ALONSO, et al. 1996a).

Dentre as diversas oftalmopatias, as uveítes têm sido alvo de um número crescente de pesquisas, porquanto acham-se associadas a condições inflamatórias auto-imunes ou infecciosas (DA COSTA, 2006). Em uveítes acometendo cães naturalmente infectados, fatores imunogênicos intra-oculares estão envolvidos na gênese de anticorpos anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (BRITO, 2004).

Importantes lesões são visibilizadas na esclera, na córnea, no trato uveal e na retina, onde diferentes elementos participam da resposta imune em cães com LV (McCONNELL et al., 1970; GARCIA-ALONSO et al., 1998). Segundo BRITO (2006), a *Leishmania* sp induz a uma resposta imune humoral ocular em cães, em que há a participação de anticorpos da classe IgG.

Complexos antígeno-anticorpo foram identificados à imunoistoquímica, no processo ciliar e na sua inserção com o corpo ciliar (MOLLEDA et al., 1993; GARCIA-ALONSO et al., 1996a; GARCIA-ALONSO et al., 1998). BRITO (2006), valendo-se da mesma técnica, ratificou a sua ocorrência em diversas estruturas oculares.

2.4 ANTICORPOS SÉRICOS E OCULARES NA LVC

A LVC é considerada uma enfermidade imunemediada, em que a presença da resposta humoral associa-se à doença clínica. A resposta celular, por sua vez, tem sido observada em animais assintomáticos (MORENO et al. 1999).

O desenvolvimento da enfermidade clínica e, outrossim, o grau de severidade, têm relação imediata com o equilíbrio entre as respostas imune celular (Th1) e humoral (Th2) em animais que são acometidos pela afecção (PINELLI et al., 1994).

A resposta (Th1) está associada à produção de interferon- γ (INF- γ), de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e de interleucinas (IL) 2 e 12, que conferem imunidade celular e, por conseguinte, a eliminação da infecção (KOUTINAS et al.,1999; STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001). Por outro lado, a enfermidade crônica é mediada pela via (Th2), onde participam a IL 3, IL4, IL5, IL6 e IL10, como as principais citocinas da resposta humoral (NOLI,1999).

Um dos achados mais freqüentes na leishmaniose visceral é a hiperglobulinemia, decorrente da ativação policlonal de células B e da produção de anticorpos (CIARAMELLA et al.1997; FERRER, 1999; KOUTINAS et al., 1999). O incremento da produção de imunoglobulinas não confere proteção, sendo potencialmente prejudicial, uma vez que elas permanecem circulantes e tendem a se depositar em regiões específicas. Barreiras de filtração, notadamente a hemato-ocular, são muito sensíveis.

Análises à imunologia, relativamente a essa barreira, suportam a idéia da participação conjunta das respostas imune sistêmica e local, na patogenia das lesões oculares que cursam com a LVC (GARCIA-ALONSO et al., 1998).

Pesquisas de anticorpos no humor aquoso e em outros fluidos corporais têm sido realizadas com o objetivo de se esclarecer a patogenia da infecção por *Leishmania* sp (LOPES et al., 1993; SOLANO-GALEGO et al., 2002; LIMA et al., 2003). A detecção de imunoglobulinas no soro e no humor aquoso de cães infectados por *Leishmania* spp. vem sendo consignada por técnicas de Imunodifusão Radial Simples, Imunofluorescência Indireta (LIRA, 2005) e pelo teste ELISA (BRITO, 2004), contudo, não se encontraram correlação entre anticorpos encontrados nestes fluidos orgânicos. Não obstante, essa relação parece ser importante na vigência de uveítes (GARCIA-ALONSO et al., 1998).

BRITO (2006) informou não se saber a origem dos anticorpos oculares, admitindo a possibilidade de haver produção local ou sistêmica, e que a sua presença poderia motivar a ocorrência de lesões oculares.

Permanece, pois, a hipótese de transferência de anticorpos do sangue para o humor aquoso, como sugerido por GARCIA-ALONSO (1994), quando identificou a origem das imunoglobulinas da classe G no humor aquoso e propôs a existência de correlação positiva entre o soro e o humor aquoso.

2.5 HISTOPATOLOGIA DA DOENÇA OCULAR NA LVC

Estudos envolvendo estruturas oculares em cães acometidos com LV são reportados desde 1913, quando LEMAIRE et al. relataram a presença de formas amastigotas do parasita no estroma corneal.

Lesões inflamatórias, caracterizadas por infiltrados celulares de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, têm marcado os achados histopatológicos mais consistentes, sem que o parasita, contudo, esteja necessariamente presente (McCONNELL et al., 1970; LAUGIER & VERRO-BOULANGER, 1992; MOLLEDA et al., 1993; GARCIA-ALONSO et al., 1996a).

McCONNEL et al. (1970), ao estudarem a córnea, demonstraram vasos neoformados e DIAS (1998) relatou exsudação focal no estroma corneal. BRITO et al. (2004) demonstraram a separação das fibras estromais, edema, plasmócitos em pequenas quantidades e hiperplasia do epitélio anterior, com espessamento do estroma subjacente e da membrana de Descemet.

Infiltrado mononuclear-plasmocitário na conjuntiva da terceira pálpebra, associado à metaplasia no epitélio, hiperplasia das células calciformes e infiltrado mononuclear-plasmocitário subepitelial, foram descritos por MOLLEDA et al. (1993) e BRITO et al. (2004).

GARCIA-ALONSO et al. (1998) classificaram como intenso o processo inflamatório da glândula lacrimal da terceira pálpebra. Identificaram zonas de infiltrados celulares focais ou difusos, compostos por linfócitos, plasmócitos e por macrófagos contendo amastigotas de *Leishmania* sp.

NARANJO et al. (2005) identificaram fibras musculares (musculatura extra-ocular) circundadas por infiltrado inflamatório de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas.

REINECKE et al. (2001) demonstraram infiltrados de amastigotas de *Leishmania* sp em histiócitos, em um caso de escleromalacia com perfuração escleral em cão. Áreas com infiltrado mononuclear-plasmocitário na esclera, associado à perivasculite, foram reportadas por BRITO (2006).

Quanto às alterações na túnica vascular de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, destacam-se intensos focos de inflamação, caracterizados por células redondas e por linfócitos, associados a alterações vasculares, com dilatação de vasos linfáticos e trombose, descamação de células glandulares e exsudato acidófilo, adjunto à presença de amastigotas de *Leishmania* sp (GARCIA-ALONSO et al. 1998; BARBALHO-LIMA et al. 2005; BRITO, 2006). Formas amastigotas de *Leishmania* sp na retina foram relatadas por DIAS (1998). Congestão vascular, coriorretinite, e exsudato inflamatório no nervo óptico, o foram por BRITO (2006).

2.6 DIAGNÓSTICO

Dentre os métodos factíveis para o diagnóstico da LVC, destacam-se os exames parasitológicos, os testes sorológicos e as provas moleculares (FERRER, 1999).

O exame parasitológico baseia-se na visibilização de formas amastigotas do parasita em esfregaços obtidos de aspirados esplênicos, hepáticos, de linfonodos, da medula óssea, de raspados de pele íntegra e lesionada (THOMÉ, 1999; STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001).

Formas amastigotas de *Leishmania* sp. vêm sendo descritas no interior de macrófagos do sistema fagocítico mononuclear, no baço, no fígado, nos linfonodos, nas tonsilas, na lâmina própria intestinal, na bexiga urinária, nos alvéolos pulmonares, na medula óssea, no plexo coróide, no fluido cérebro-espinhal, na urina, no sêmen, no fluido peritoneal e em úlceras mucocutâneas (SLAPPENDEL & GREENE, 1990; MAYWALD et al., 1996; NEVES, 1998; DE GOPEGUI, 2000).

Segundo FERRER (1999), o método parasitológico, se empregado isoladamente, não consiste num método seguro ao diagnóstico da LVC, devendo ser utilizado em conjunto com testes sorológicos.

Cães com calazar quase sempre apresentam resposta humoral, independentemente da presença de sinais clínicos. Diferentes métodos sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. têm sido admitidos, entre os quais destacam-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a técnica de imunoadsorção enzimática (ELISA) (STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001).

A RIFI começou a ser utilizada a partir da década de 60 do século passado. Sua sensibilidade varia de 90 a 100% e sua especificidade aproxima-se de 80% para amostras de soro, sendo o método mais comumente empregado e recomendado pela Fundação Nacional de Saúde (ALVES E BEVILACQUA, 2004). Não obstante a existência de reações cruzadas (THOMÉ, 1999), ela permanece como de eleição para inquéritos epidemiológicos, por sua simplicidade e rapidez, baixo custo, sensibilidade e especificidade, comparativamente a outras técnicas (ALVES E BEVILACQUA, 2004).

A busca por novas técnicas mais sensíveis e específicas, permitiu que se chegasse, a partir da década de 1970, à técnica de ELISA. Não obstante tratar-se de procedimento mais laborioso, tem se mostrado mais eficiente no diagnóstico da LVC, comparativamente à RIFI. A utilização de antígenos recombinantes ou purificados, como as glicoproteínas de membrana gp63, gp72, gp70 e rk39, específicas do gênero *Leishmania*, permitiu ganhos qualitativos de sensibilidade e de especificidade. Entretanto, reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos são, ainda, notificadas (ALVES E BEVILACQUA, 2004). A identificação de anticorpos específicos no humor aquoso de cães com calazar, é ainda, pouco reportada (BRITO, 2004). Registraram-se apenas os da classe IgG em animais com LVC (GARCIA-ALONSO et al., 1995).

Recentemente, desenvolveu-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), mais sensível e específica comparativamente à sorologia (STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001). Ela possibilita identificar e ampliar, seletivamente, o DNA do cinetoplasto do parasita (KOUTINAS et al., 1999; ALVES E BEVILACQUA, 2004), facilitando a sua identificação e possibilitando o diagnóstico em amostras menos concentradas (DE COPEGUI, 2000).

Limitações para o uso da PCR em inquéritos epidemiológicos recaem sobre o custo, a disponibilidade de reagentes e de equipamentos, e por sua pouca aplicabilidade para testes a campo (ALVES E BEVILACQUA, 2004).

O diagnóstico da leishmaniose visceral é considerado, ainda, como de difícil consecução. O extraordinário pleomorfismo e a pouca especificidade das lesões vistas à microscopia de luz, que são similares àquelas encontradas em outras enfermidades infecciosas ou imunemediadas, elencam-se entre os principais obstáculos. Consideram-se ainda, as falhas intercorrentes, uma vez que os testes não oferecem 100% de sensibilidade e de especificidade (KOUTINAS et al., 1999). Para a confirmação diagnóstica, há, portanto, que se congregarem ao exame físico, provas sorológicas, parasitológicas e em biologia molecular (FERRER, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo é apresentado em três partes, concebidas para facilitar a compreensão do leitor quanto à consecução das etapas experimentais.

A primeira discorre sobre os aspectos éticos e a seleção dos cães, que obrigatoriamente deveriam ser negativos para leishmaniose visceral. Ela encontra-se representada por protocolos clínicos e laboratoriais, descritos no item 3.2. A segunda compreende os itens que vão de 3.3 a 3.5 e descreve as etapas relativas ao manejo sanitário dos animais, à formação dos grupos, à infecção experimental e ao seu acompanhamento. A terceira amonta os protocolos de análises clínicas e laboratoriais (biópsia de medula óssea, sorologia e histopatologia), que se encontram descritos nos itens de 3.6 a 3.8.

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Para a realização da pesquisa, os animais foram classificados na categoria D, de acordo com os princípios internacionais em pesquisa biomédica envolvendo animais, adaptado do *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS)* – Genebra, 1985. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o *Consensus Recommendations on Effective Institutional Animal Care and Use Committes - NIH and USDA* – publicados pelo laboratório de Ciência Animal, edição especial, janeiro de 1987.

O estudo foi também aprovado pela Câmara de Ética e Bem Estar Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal. Por oportuno ressaltar, que cuidados bioéticos, relativamente às normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO (National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985)*, foram também obedecidos.

3.2 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram analisados 60 animais provenientes do Centro de Zoonoses da cidade de Fortaleza, Ceará. Empregaram-se, para tal, a avaliação clínica, o diagnóstico sorológico e parasitológico. Selecionaram-se, apenas, cães com sorologia negativa ao teste ELISA, exame parasitológico negativo para *Leishmania (L.) chagasi*, e sem sinais clínicos sugestivos da doença. Dos pré-selecionados, escolheram-se 10 animais, de raças e idades variadas, entre machos e fêmeas. Para cada um, anotaram-se todas as informações quanto às variáveis clínicas e laboratoriais, no curso de toda a pesquisa.

O cálculo da amostra foi realizado por conveniência não probabilística, de acordo com COSTA NETO (1977).

3.2.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A semiotécnica constou de exame físico geral e, principalmente, da inspeção da pele e dos fâneros e da palpação abdominal e dos linfonodos, para a identificação de sinais sugestivos de leishmaniose visceral canina, de acordo com FERRER (1999) e FERRER (2002).

3.2.2 AVALIAÇÃO OFTÁLMICA

O exame oftálmico alicerçou-se na inspeção dos anexos oculares e da câmara anterior, com o auxílio de iluminação¹ e magnificação², seguido do teste para a avaliação da produção lacrimal³, em ambos os olhos. Ato contínuo, realizou-se indução da midríase com tropicamida⁴ para a oftalmoscopia⁵ e, em seguida, o teste de fluoresceína⁶.

¹ Transiluminador Welch Allen

² Lupa para microcirurgia, Heine

³ Teste de Shirmer, Ophthalmos, São Paulo, Brasil

⁴ Midriacyl®, Alcon

⁵ Oftalmoscópio binocular Indireto, Opto

⁶ Fluoresceína, Ophthalmos, São Paulo, Brasil

3.2.3 COLETA DO MATERIAL DESTINADO À PARASITOLOGIA

3.2.3.1 BIÓPSIA DE MEDULA ÓSSEA

Procedeu-se à sedação dos animais, com acepromazina⁷, na dose de 0,1mg/kg, por via intramuscular, e, em seguida, realizou-se a biópsia de medula óssea, por punção no manúbrio do osso esterno, empregando-se seringa⁸ e agulha⁹. Do material puncionado, foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro¹⁰, que após secagem, foram submetidos ao método de coloração rápida Panótico¹¹, e examinados em microscópio de luz¹², com objetiva de 100x, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*. Os exames foram analisados no Laboratório de Patologia Clínica de Universidade Estadual do Ceará – UECE.

3.2.3.2 RASPADO DE PELE ÍNTEGRA

Foram realizados raspados de pele íntegra, na face interna do pavilhão auricular esquerdo, com o auxílio de lâminas de bisturi¹³. Do material obtido, foram realizados esfregaços em lâminas de vidro, que após secagem, foram submetidos ao método de coloração rápida Panótico e examinados em microscópio de luz com objetiva de 100 x, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*.

3.2.4 COLETA DE MATERIAL DESTINADO À SOROLOGIA

Foram coletados, de todos os animais, aproximadamente 10 mililitros (mL) de sangue por venopunção jugular, com seringa¹⁴ e agulha¹⁵, imediatamente transferidos

⁷ Acepran 0,2%®, Laboratório Univet

⁸ Seringas descartáveis - 20 (ml), Becton Dickson

⁹ Agulhas descartáveis- 40 x 12 mm, Becton Dickson

¹⁰ Lâminas de vidro para microscopia, Invicta

¹¹ Solução Corante para Hematologia Panótico Rápido - LB Laborclin

¹² Microscópio Olympus BX 41

¹³ Lâmina de bisturi nº 24

¹⁴ Seringas descartáveis 10 ml, Becton Dickson

¹⁵ Agulhas descartáveis 25x7mm, Becton Dickson

para tubos de ensaio estéreis, sem anticoagulante, para a obtenção do soro. Após a retração do coágulo, as amostras sanguíneas foram submetidas à centrifugação a 1000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos. O soro resultante foi acondicionado em frascos de polipropileno¹⁶ e mantido à temperatura de -20 °C, até a realização dos testes.

3.2.5 SOROLOGIA

Empregou-se o teste de ELISA, realizado junto ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz –Recife - Pe (CPqAm/FIOCRUZ). Empregou-se o Kit para o diagnóstico da EIE-Leishmaniose Canina Bio-Manguinhos®¹⁷. Os protocolos foram executados de consoante com as instruções do fabricante e a leitura foi feita em espectrofotômetro¹⁸ a 490 nanômetros.

3.2.6 COLETA DE MATERIAL PARA HEMOGRAMA E PESQUISA DE HEMATOZOÁRIOS

Posteriormente à contenção dos animais, realizou-se anti-sepsia local com álcool iodado a 2% e a coleta de três mililitros (mL) de sangue por venopunção jugular, com agulha¹⁹ e seringa²⁰. As amostras obtidas foram transferidas para tubos de ensaio esterilizados, contendo, como anticoagulante, Ácido Etileno Diamino Tetracetato de Sódio²¹ (EDTA). Foram confeccionados esfregaços em lâmina de vidro, corados pelo método de coloração rápida Panótico, e realizou-se a pesquisa de hematozoários.

¹⁶ Eppendorf Reaktionsgerätschaft, Marca Gerätebau

¹⁷ Bio-Manguinhos®/FIOCRUZ

¹⁸ BIO-RAD Model 3550 Microplate reader

¹⁹ Agulha descartável 25x8, marca BD.

²⁰ Seringa descartável, 5 ml, marca BD.

²¹ Ácido Etileno Diamino Tetracetato de Sódio, Reagen

3.3 TERAPÊUTICA UTILIZADA NOS ANIMAIS APÓS A AVALIAÇÃO CLÍNICA E HEMATOLÓGICA

Após a seleção e a consecução dos testes hematológicos, os animais foram submetidos à quarentena. Como parte do manejo sanitário, eles receberam medicação anti-helmíntica²² e terapêutica preventiva para *Babesia* spp.²³, na dose de 4 mg/kg, pela via intramuscular, repetida decorridos 15 dias da primeira dose. Simultaneamente, empregou-se fármaco para o controle profilático de *Ehrlichia* sp²⁴, na dose de 5mg/kg, em intervalos regulares de 12 horas, por 21 dias consecutivos, pela via oral. Aplicou-se, por via tópica, ectoparasiticida²⁵. Posteriormente, os animais foram vacinados²⁶.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Constituíram-se dois grupos experimentais: Grupo Inoculado (GI) e Grupo Controle (GC), formados por sete e três animais, respectivamente. Os cães foram mantidos em canis individuais, em área telada, com temperatura e fotoperíodo controlados, e receberam, diariamente, ração comercial seca para cães e água potável à vontade.

3.5 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

3.5.1 CEPA de *Leishmania* sp

Formas promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/00/MER02) foram expandidas *in vitro* em meio Schneider's até a fase de crescimento exponencial, sendo diluídos em uma concentração de 10^7 microorganismos/ml. A cepa foi proveniente do estado da Bahia.

²² Drontal Plus®, Bayer

²³ Ganaseg®, Coopers

²⁴ Doxidrat®, Agener União

²⁵ Max 3®, Bayer

²⁶ Duramune Max®, Fort Dodge

3.5.2 INOCULAÇÃO

Foram realizadas infecções experimentais em sete cães pertencentes ao Grupo Inoculado (GI), que receberam seis gotas (150 µL) de uma de solução de cultura de *Leishmania chagasi*, por via tópica ocular bilateral. No grupo Controle (GC), instilou-se solução fisiológica isotônica em mesmo volume.

Para a inoculação, os animais foram sedados com acepromazina, na dose de 0,1mg/kg, por via intramuscular, e seguiu-se um protocolo de instilação de uma gota a cada 5 minutos, com o objetivo de completa absorção conjuntival.

3.5.3. ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS DOS GRUPOS INOCULADO (GI) E CONTROLE (GC)

Os animais foram observados clinicamente às 2, 4, 6, 12 e 24h após a instilação. Em seguida, foram examinados diariamente por uma semana e, a partir daí, uma vez por semana, até que se completassem 60 dias de pós-infecção (PI). A semiotécnica foi realizada conforme descrito nos itens 3.2.1 3.2.2 e consistia na observação da presença de secreção ocular, opacidade corneal, hiperemia conjuntival, e uveíte. Soro sangüíneo de cada animal foi coletado e armazenado conforme descrito no item 3.2.4, semanalmente, até 60 dias PI.

Em todos os animais, de ambos os grupos, utilizaram-se colares impregnados com deltametrina²⁷ durante o período experimental, no intuito de prevenir a ação hematófaga de artrópodes vetores de *Leishmania* sp. Adjunto, os animais foram mantidos em local protegido com tela fina, com o mesmo objetivo.

²⁷ Coleira Scalibor®, Merial.

3.6 PESQUISA PARASITOLÓGICA DE FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) chagasi*

Decorridos 60 dias da infecção experimental, realizaram-se biópsia de medula óssea e os testes laboratoriais, seguindo-se os protocolos descritos no item 3.2.3.1.

3.7 TESTES SOROLÓGICOS

O teste de ELISA foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Ageu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz –Recife - Pe (CPqAm/FIOCRUZ). Empregou-se o Kit para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina ELISA/S7²⁸. Os protocolos foram executados de consoante com as instruções do fabricante e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 450 nanômetros.

3.7.1 COLETA DO HUMOR AQUOSO

Aos 60 dias PI, e imediatamente após a coleta de amostras para a sorologia e a parasitologia, realizou-se a eutanásia ativa dos animais de ambos os grupos, no Centro de Especialidades Veterinárias – CEV, em Fortaleza, Ceará. Para tal, empregou-se a acepromazina e o tiopental sódico²⁹.

Posteriormente ao óbito, realizou-se a paracentese da câmara anterior, na porção límbica lateral de cada um dos olhos, com o auxílio de seringa³⁰ e agulha³¹, para a coleta do humor aquoso, que foi armazenado em microtubo de polipropileno a uma temperatura de -20⁰C, até a realização dos testes. Ato contínuo, injetou-se 1 mL de solução de formalina³² tamponada a 10% Posteriormente, os olhos foram enucleados de sua órbita e mantidos na mesma solução fixadora até a realização dos exames.

²⁸ Biogene®

²⁹ Pentobarbital® – Cristália –Produtos químicos farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil

³⁰ Seringas descartáveis de 3 ml, Becton Dickson

³¹ Agulhas descartáveis 13x4,5 mm, BD

³² Formaldeído, Reagen

3.7.2 TESTE ELISA DO HUMOR AQUOSO

O teste de ELISA foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Ageu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz –Recife - Pe (CPqAm/FIOCRUZ). Empregou-se o Kit para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina ELISA/S7, na diluição 1:2, em conformidade com GARCIA-ALONSO et al. (1996a). Os protocolos foram executados de consoante com as instruções do fabricante e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 450 nanômetros.

3.8 HISTOPATOLOGIA

Foram coletados fragmentos da terceira pálpebra, da glândula da terceira pálpebra, da conjuntiva, do limbo esclerocorneal, da esclera, da córnea, da úvea anterior, da coróide, da retina e do nervo óptico. Eles foram processados para a inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo a 3-4 micrômetros (μm) e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.), segundo o descrito por BEHMER, TOLOSA e FREITAS NETO (1976).

A microscopia de luz foi realizada no Setor de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, em Recife, Pernambuco.

3.9 ANÁLISE À ESTATÍSTICA

Empregou-se análise discriminante, multivariada, para se avaliar o efeito da positividade aos testes nas variáveis que expressavam o número de células por tipo, para um nível de probabilidade de 95% e erro amostral de cinco por cento.

A normalidade da amostra foi testada pelo método t de student.

4. RESULTADOS

4.1 SINAIS CLÍNICOS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS INOCULADO (GI) E CONTROLE (GC)

4.1.1 SECREÇÃO OCULAR

À avaliação clínica dos animais do grupo inoculado (GI), observaram-se a presença de secreção ocular seromucóide em 71,42% dos cães, sendo, geralmente, bilateral e discreta, a partir do dia 0,16 (4h PI) até o dia cinco PI (Figura 1).



Figura 1 - Imagem fotográfica de olho de cão submetido à infecção experimental com *Leishmania chagasi* por via tópica ocular, 12h pós-infecção. Notar a presença de secreção ocular seromucóide (seta).

Quanto à avaliação temporal (0,08, 0,16, 0,33, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 16, 23, 30, 37, 44, 51 e 58 dias) das médias observadas, constatou-se que 28% dos animais apresentaram secreção ocular a partir do dia 0,16, o que corresponde a 4h PI, e 14% a apresentaram no dia 0,5, o que corresponde a 12h PI. Nos dias um e dois, 28% dos animais apresentaram o evento. A média sofreu decréscimo para 14% dos animais no dia cinco, a partir do qual, não foi mais observada secreção ocular (Figura 2).

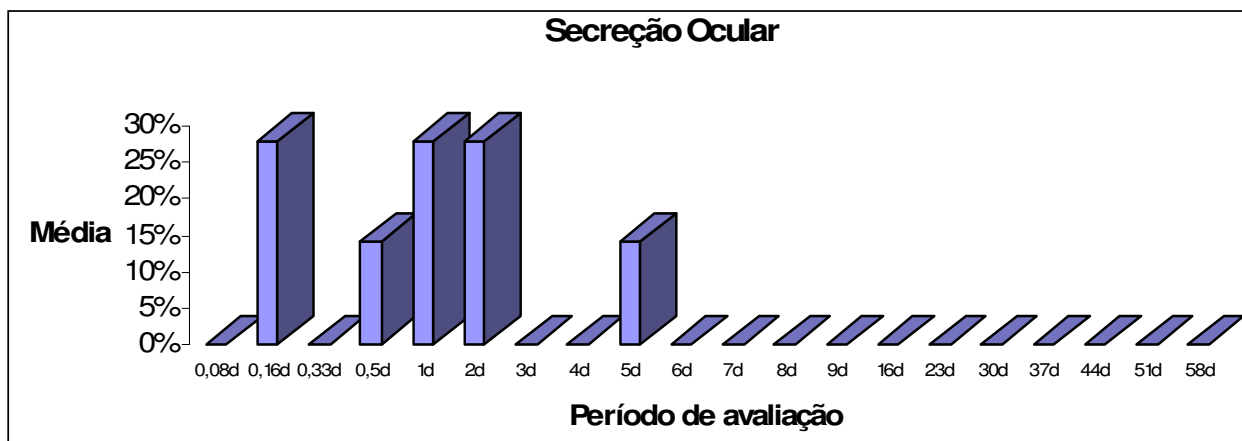


Figura 2 - Representação gráfica das médias observadas para a variável secreção ocular em cães após a infecção experimental com *Leishmania chagasi*, por via tópica ocular.

Não foi vista secreção ocular nos animais do grupo controle (GC).

4.1.2 OPACIDADE CORNEAL

Com relação à transparência corneal, 100% dos cães do grupo inoculado (GI) a perderam, entre o dia 0,16 e o dia 60 PI. As alterações foram observadas em diferentes pontos da córnea, sendo em 57,14% dos cães, de forma central. Opacidades puntiformes foram visibilizadas em 42,85% dos cães (Figura 3). Observou-se, ainda, que 66,98% apresentaram-nas bilateralmente.



Figura 3 Imagem fotográfica de olho de cão submetido à infecção experimental com *Leishmania chagasi* por via tópica ocular, 60 dias pós-infecção. Notar a presença de opacidade corneal puntiforme (seta).

Quanto à avaliação temporal (0,08, 0,16, 0,33, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 16, 23, 30, 37, 44, 51 e 58 dias) das médias observadas, constatou-se que ao dia 0,16 (4h PI), 28% dos animais apresentaram opacidade corneal. Observou-se o aumento da média a partir do dia 0,5 (12h PI), quando 57% dos cães a apresentaram. No dia um, a média atingiu o máximo de 85%, permanecendo em 71% entre os dias dois e cinco PI. Apesar da diminuição ocorrida aos sete dias, ela permaneceu, em alguns animais, por até 60 dias PI (Figura 4).

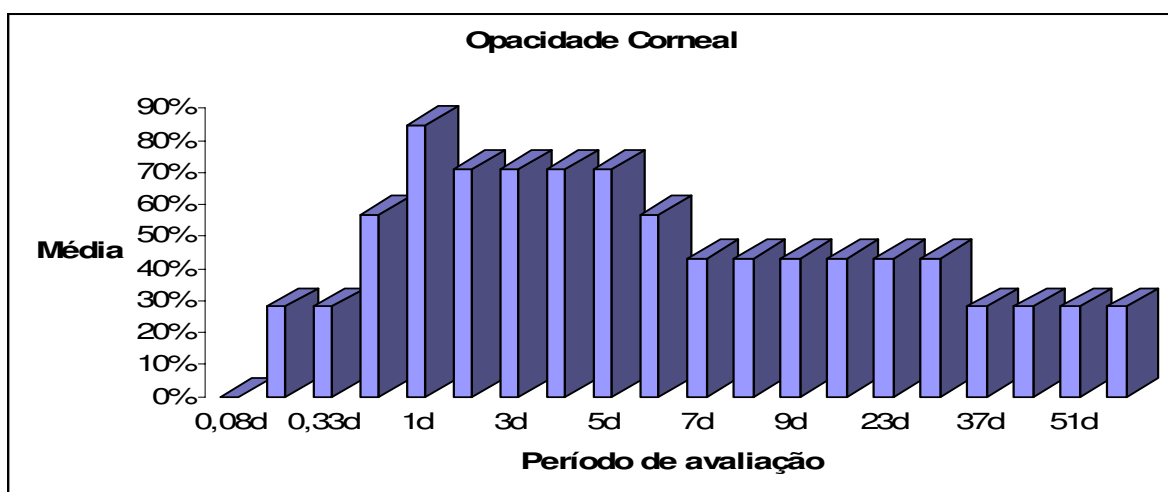


Figura 4 - Representação gráfica das médias observadas para a variável opacidade corneal em cães, após a infecção experimental com *Leishmania chagasi*, por via tópica ocular.

Com relação ao grupo controle (GC), não houve alteração da transparência corneal.

4.1.3 HIPEREMIA CONJUNTIVAL

Hiperemia conjuntival (Figura 5) foi observada no Grupo Inoculado (GI) em 85,71% dos animais, sendo visibilizada entre os dias 0,16 (4h) e 16 PI. Ela apresentou-se de forma discreta em 33,33% e moderada em 66,66% dos animais. Em 71,42 % a ocorrência foi bilateral.



Figura 5 - Imagem fotográfica de olho de cão submetido à infecção experimental com *Leishmania chagasi* por via tópica ocular, 4h pós-infecção. Notar a presença de hiperemia conjuntival (seta).

Quanto à avaliação temporal (0,08, 0,16, 0,33, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 16, 23, 30, 37, 44, 51 e 58 dias) das médias observadas, constatou-se média máxima de 85% no dia 4 PI, com tendência à diminuição entre os dias 5 e 16. Após esse período, o evento não foi mais observado (Figura 6).

Hiperemia conjuntival não foi observada nos animais do grupo controle (GC).

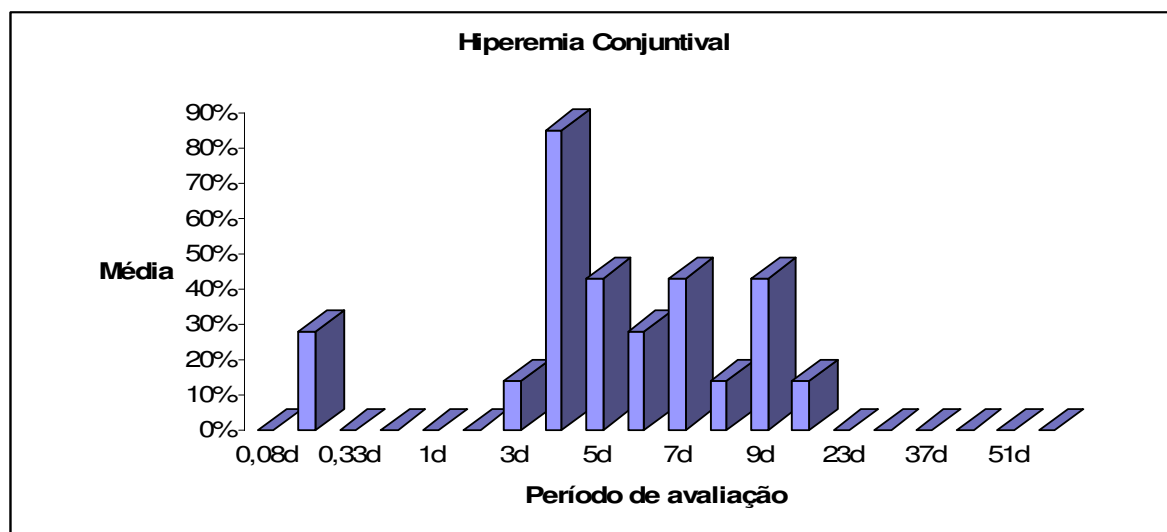


Figura 6 - Representação gráfica das médias observadas para a variável hiperemia conjuntival em cães, após a infecção experimental com *Leishmania chagasi*, por via tópica ocular.

4.1.4 UVEÍTE

Não foram observadas alterações na túnica vascular dos animais do GI e do GC.

4.2 SOROLOGIA

Ao término do período concebido, realizou-se a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, no soro e no humor aquoso, cujos resultados foram negativos, para ambos os grupos.

4.3 BIÓPSIA DE MEDULA ÓSSEA

Aos 60 dias, realizou-se a biópsia de medula óssea para a pesquisa de *Leishmania chagasi*, não tendo sido observadas formas amastigotas nas amostras examinadas, nos dois grupos.

4.4 HISTOPATOLOGIA DO GLOBO OCULAR

Verificou-se à histopatologia, inicialmente, no Grupo Inoculado (GI), exsudato inflamatório com predomínio de plasmócitos e de linfócitos.

Infiltrado linfoplasmocitário subepitelial foi observado na conjuntiva, em 85,71% dos animais. Sua ocorrência deu-se de forma discreta em 50%, moderada em 33,33%, e intensa em 16,66%, uni ou bilateralmente.

Plasmócitos e macrófagos foram evidenciados ao redor dos vasos conjuntivais, notadamente nos mais superficiais, caracterizando quadro de perivasculite. Observou-se, de forma infreqüente, congestão vascular, que, por vezes, associava-se à dilatação dos vasos. Em 28,57% dos cães, notou-se hemorragia no estroma conjuntival.

Na terceira pálpebra, decorreu infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, com o predomínio de plasmócitos, em graus variados, em todas as amostras avaliadas.

Os epitélios de revestimento da terceira pálpebra se apresentaram adelgaçados e, algumas vezes, ulcerados, na maioria dos animais (Figura 7).

Plasmócitos e macrófagos foram mais evidenciados nas áreas subepiteliais. Nas áreas adjacentes ao epitélio estratificado plano, a exsudação inflamatória preponderou. Menor quantidade de exsudato inflamatório foi identificada no epitélio colunar prismático e nas áreas mais próximas à cartilagem da terceira pálpebra. Nas regiões onde o exsudato inflamatório foi mais evidente, o epitélio encontrava-se adelgado em grande parte de sua extensão. Tanto o epitélio estratificado plano, quanto o colunar prismático achavam-se hiperplásicos e, na maioria das vezes, havia acentuada hiperplasia das células caliciformes, não raro, afetando toda a sua extensão (Figuras 8 e 9). Em algumas áreas, todavia, não se encontraram células caliciformes.

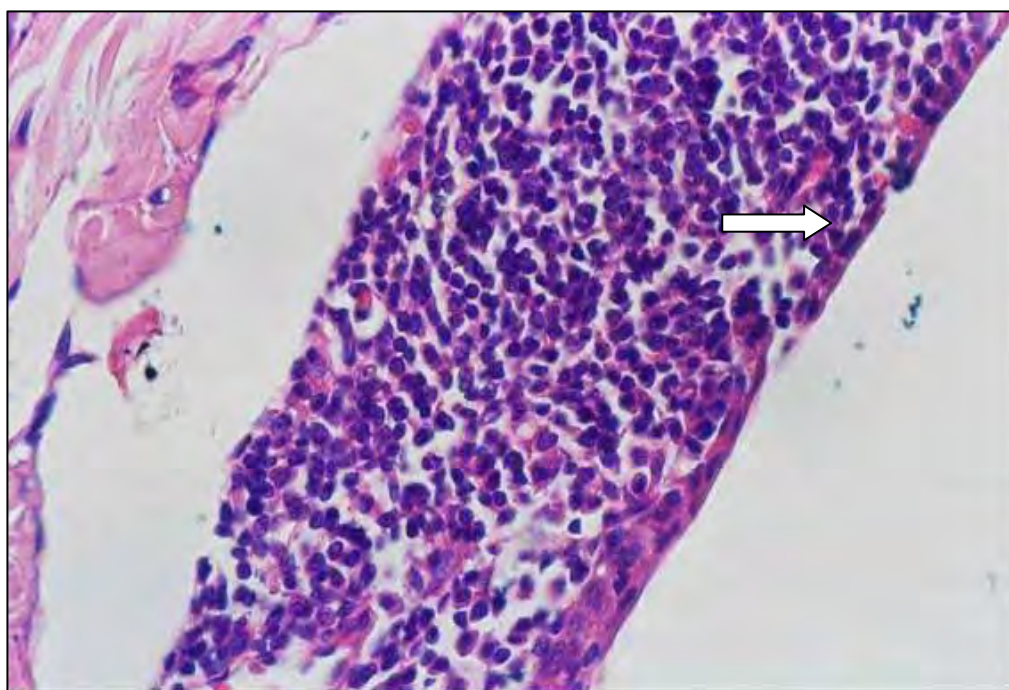


Figura 7 – Fotomicrografia da conjuntiva da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival com cultura de *Leishmania chagasi*. Notar intenso infiltrado constituído por linfócitos e plasmócitos adjacente ao epitélio, com adelgaçamento do mesmo. HE. Obj. 10 x

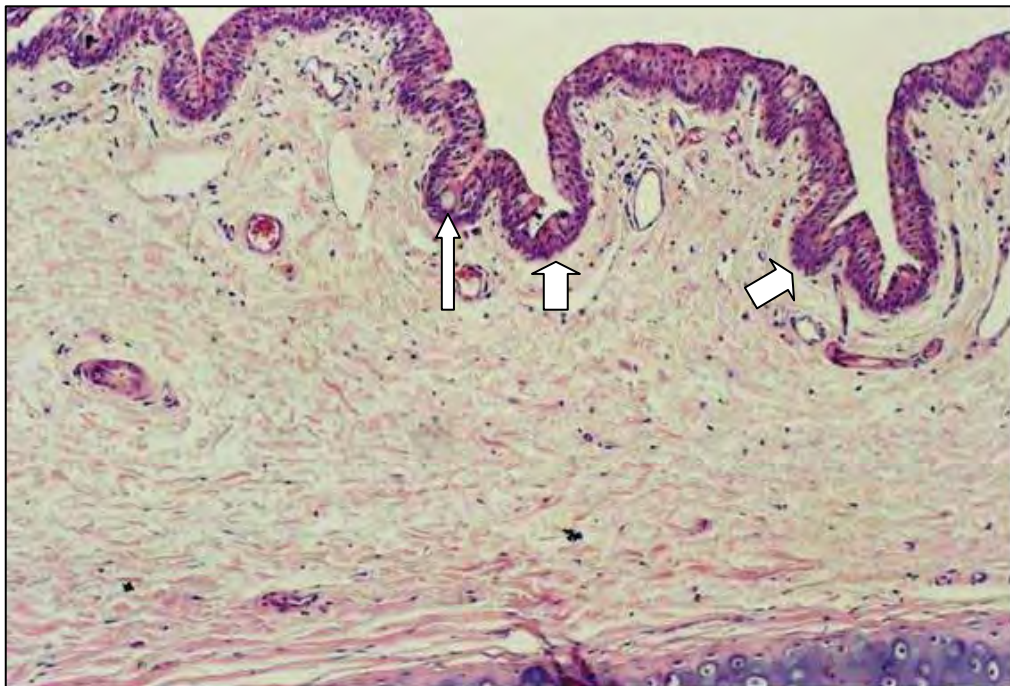


Figura 8 – Fotomicrografia da conjuntiva da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival, com cultura de *Leishmania chagasi*. Notar áreas do epitélio, ora com metaplasia (setas largas), ora com hiperplasia das células caliciformes (seta estreita). HE. Obj. 4 x

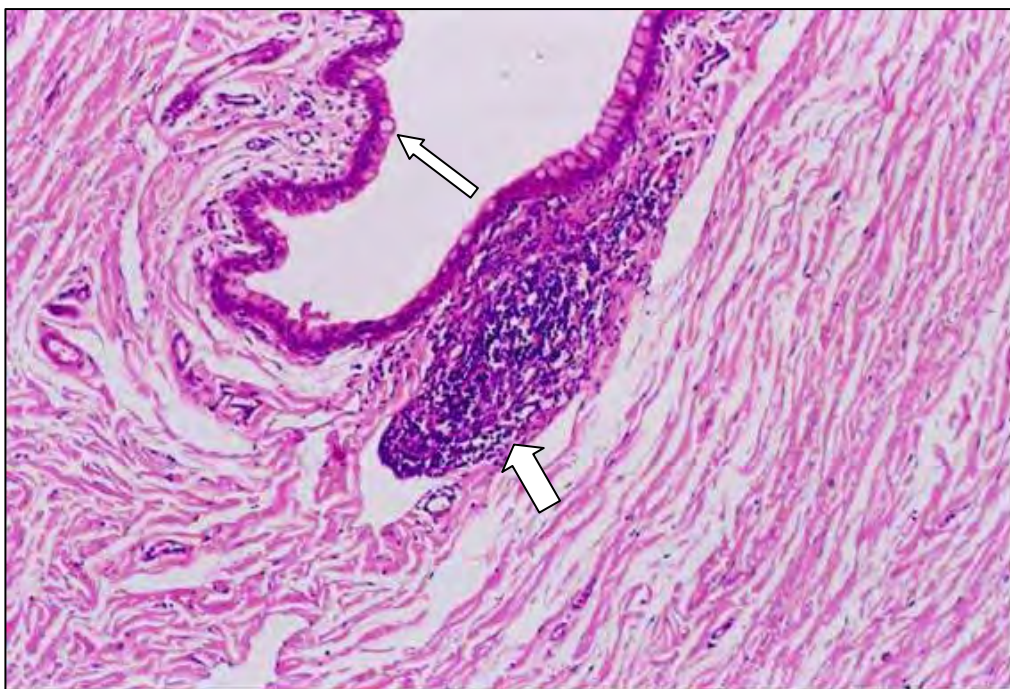


Figura 9 - Fotomicrografia da conjuntiva da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival com cultura de *Leishmania chagasi*. Notar intenso infiltrado focal (seta larga) e hiperplasia de células caliciformes (seta estreita). HE. Obj. 4 x

Alterações inerentes às glândulas da terceira pálpebra foram representadas, principalmente, por infiltrado inflamatório em 42,85% dos animais. Esse se compunha, basicamente, por linfócitos e por plasmócitos, com atrofia focal em grande parte dos ácinos serosos e mucosos. Adjunto à presença de exsudato inflamatório, a atrofia foi mais evidente. Células inflamatórias foram visibilizadas entre os ácinos, no lúmen e nos ductos. Concomitantemente, denotou-se desorganização do estroma da glândula em alguns dos fragmentos avaliados (Figura 10).

Relativamente à íris, ao corpo ciliar e aos processos ciliares, visibilizaram-se congestão vascular, edema e perivascularite, em 85,71% dos animais, caracterizada, notadamente, pela presença de plasmócitos e de macrófagos (Figura 11).

Na coróide, notou-se, apenas, infiltrado inflamatório mononuclear.

Relativamente às túnicas fibrosa e nervosa, não foram visibilizadas quaisquer alterações, sequer quanto à presença de infiltrado de células inflamatórias.

No Grupo Controle, apenas um animal apresentou células inflamatórias mononucleares (linfócitos e plasmócitos) no tecido conjuntival, de forma discreta. Nenhuma outra alteração pôde ser observada.

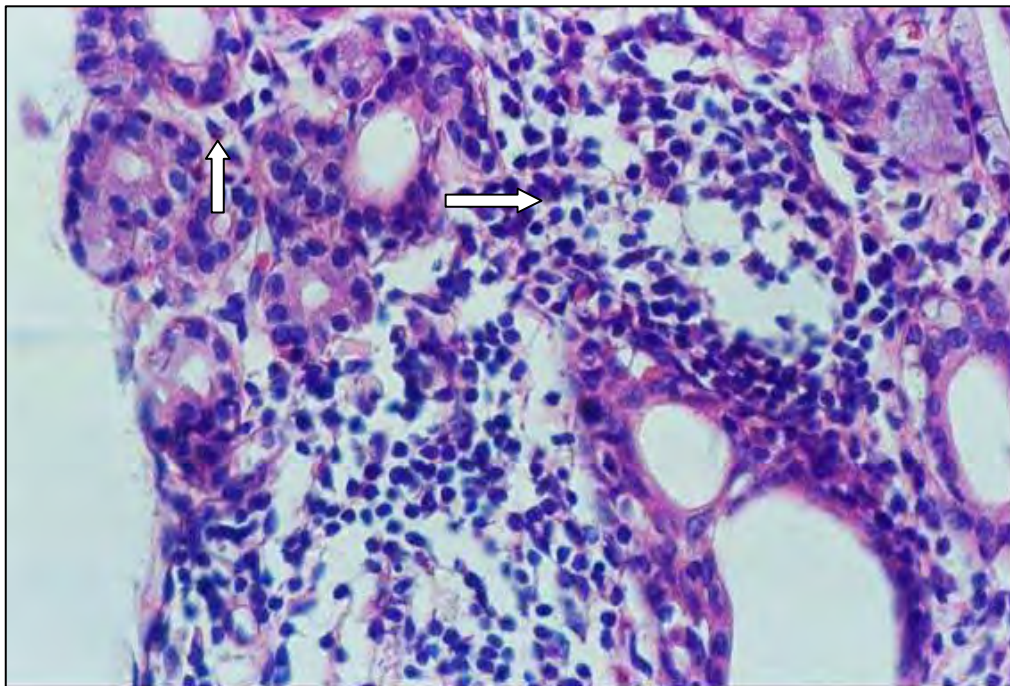


Figura 10- Fotomicrografia do tecido glandular da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival, com cultura de *Leishmania chagasi*. Notar infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (setas) distribuído difusamente entre os ácinos e ductos. HE. Obj. 40 x

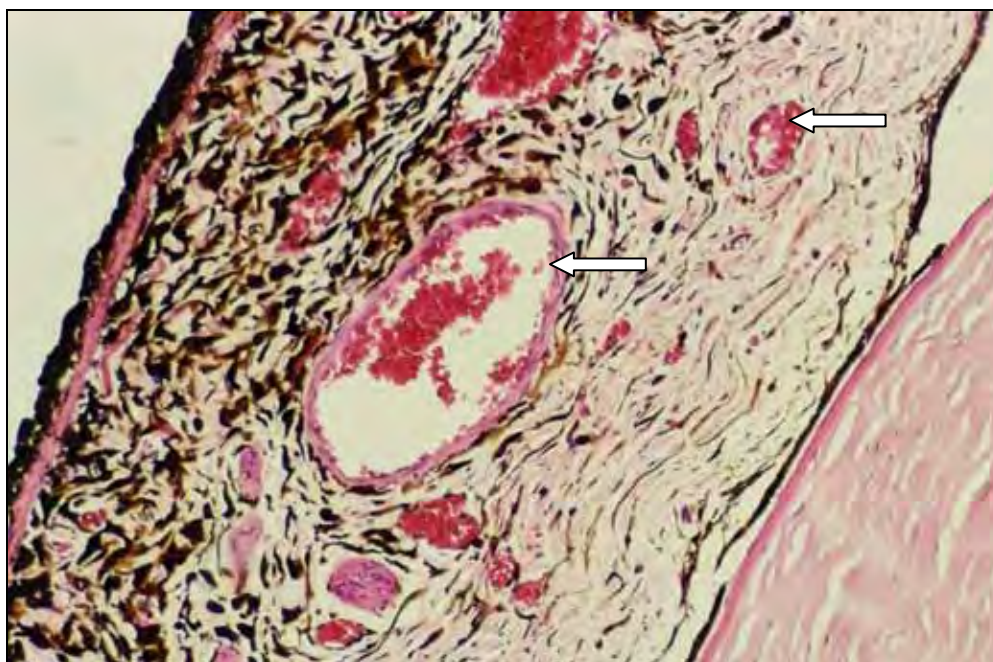


Figura 11- Fotomicrografia da íris de cão infectado por via tópica conjuntival com cultura de *Leishmania chagasi*. Notar congestão vascular (setas) no estroma. HE. Obj. 10 x

5. DISCUSSÃO

A LVC é uma enfermidade sistêmica, que enseja oftalmopatias, dermatopatias, linfadenomegalia, perda de peso, lesões renais, entre outros sinais clínicos (CIARAMELLA et al., 1997; NARANJO et al., 2005). Manifestações oculares sucedem, em casos de infecção natural, entre 16 e 80,49% dos animais (MOLLEDA et al., 1993; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; PEÑA et al., 2000; BRITO, 2004) num período que varia de um mês a sete anos (SLAPPENDEL & GRENE, 1990). A dissimilitude no número de animais que desenvolvem a doença e no período de incubação é atribuída a diversos fatores, tanto ligados à espécie de *Leishmania* sp e ao seu tropismo, quanto relacionados ao tipo e à duração da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro (BRITO, 2004).

Neste estudo, somente alterações oculares foram observadas nos animais do grupo inoculado, não tendo sido caracterizado qualquer sinal clínico sistêmico, o que contraria CUNHA (1938), que relatou intenso parasitismo em pele e presença de sinais clínicos após quatro meses, se utilizando da via intraperitoneal para a infecção, e MARTINEZ-MORENO et al. (1995) e RODRIGUES-CORTES et al. (2007), que reproduziram doença crônica similar à natural, em animais experimentalmente infectados por via intravenosa. A ausência de sinais sistêmicos provavelmente decorreu da via de inoculação e do provável desenvolvimento de resposta imune ocular, aliado ao caráter crônico da doença e do pouco tempo de exposição dos animais ao parasita (STRAUSS-AYALI et al., 2004), ou ao desenvolvimento da resposta imune celular.

Um inóculo natural contém cerca de 1 a 1000 formas promastigotas (ALMEIDA et al., 2003; ROBERTS, 2006). Uma quantidade pequena de parasitas pode ser destruída de imediato pela imunidade inata, no entanto, na infecção natural, fatores ligados à saliva do vetor e associados a mecanismos de escape do parasita, permitem o desencadeamento da infecção.

O inóculo empregado neste estudo consistiu de uma solução de cultura de formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, na concentração de 10^7 microorganismos/mL. Trata-se de uma solução mais concentrada que a natural, que,

potencialmente poderia promover reação conjuntival mais precoce e intensa, tornando factível a infecção.

Segundo ALMEIDA et al. (2003), quanto mais elevada a infectividade do inóculo, maior a possibilidade de o agente estabelecer a infecção. Devido às condições iniciais que caracterizam a infecção, o parasita está apto a estabelecê-la, ainda que numa baixa concentração (0,03-0,1 parasita por fagócito).

Resistência individual relacionada à ausência de sinais clínicos, em até 50% da população canina infectada naturalmente, foi relatada por ABRANCHES et al. (1991), tendo sido relacionada ao desenvolvimento da resposta Th1, em que há a participação da interleucina 12 (IL-12), do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e do interferon γ (IFN- γ). Estes contribuem para a ativação de macrófagos e subsequente morte do parasita (PINELLI et al., 1994).

Características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas próprias ao olho contribuem para a ocorrência de uma resposta imune específica. Estruturas oculares são desprovidas de drenagem linfática, e há consistente barreira hemato-aquosa nos capilares retinianos, no epitélio pigmentar da retina e no epitélio ciliar.

Face à inexistência de linfonodos de drenagem, linfócitos sensibilizados por antígenos migram para o olho, tornando a úvea um centro linfóide. Admite-se que a infiltração de linfócitos na úvea pode significar a rota da resposta patológica. A hipersensibilidade do tipo III tem sido implicada nas uveítes, relativamente à gênese de imunecomplexos (GOGI, 1979).

A despeito dos inúmeros mecanismos de defesa celular, o suprimento vascular da superfície do olho é o maior condutor da resposta imune, estando a inflamação ocular ligada à dilatação vascular e à exsudação de substâncias imunogenicamente ativas e de células, incluindo macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e linfócitos (KLOTZ et al., 2000). Estudos suportam a idéia da participação conjunta da resposta imune sistêmica e da local na patogenia das lesões oculares (GARCIA-ALONSO et al., 1998).

Neste estudo, observou-se mais de um sinal acometendo o mesmo olho, na maioria dos animais, à similitude do que fora reportado por PEÑA et al. (2000), ao

relatarem o desenvolvimento de mais de uma lesão no mesmo olho, em 74,28% dos cães estudados, após infecção natural. BRITO (2004) verificou que lesões únicas eram mais freqüentes.

Observou-se, neste estudo, uma maior apresentação bilateral dos sintomas dado o envolvimento sistêmico da doença. MOLLEDA et al. (1993) referiram acometimento unilateral na fase inicial, no entanto, admitiram como factível o envolvimento bilateral nos estágios mais avançados. BRITO (2004) verificou que a manifestação bilateral era a mais prevalente na infecção natural, representando 89,47%.

Sob o ponto de vista clínico, apenas o segmento anterior do olho mostrou alterações. Postula-se haver predisposição da doença por esse segmento (PUCHOL & GONZÁLES, 1989), uma vez que ele tem sido reportado como o mais acometido (MOLLEDA et al., 1993; PEÑA et al., 2000; ROZE, 2002; BRITO, 2004). GARCIA-ALONSO et al. (1998), no entanto, informaram sobre o acometimento de ambos os segmentos do olho no curso da LVC.

As desordens oculares que se manifestam na LVC normalmente envolvem a conjuntiva, podendo ou não se apresentar de forma isolada (MOLLEDA et al., 1993; SLAPPENDEL et al., 1988).

Neste estudo, a hiperemia conjuntival foi encontrada em 85,71% dos cães do grupo inoculado. GARCIA-ALONSO et al. (1998) reconheceram a conjuntivite como o sinal ocular mais freqüente, com evolução aguda ou crônica, e em diferentes formas clínicas de apresentação.

BRITO (2004) verificou 40% de prevalência de quadros de conjuntivite, caracterizada por hiperemia conjuntival, quemose e exsudato purulento, à similitude do que fora observado por PEÑA et al. (2000). ROZE (2002) reportou que a conjuntivite pode preceder os quadros clínicos de uveíte em cães com LVC.

A conjuntiva, que é ricamente vascularizada, adjunto à glândula lacrimal e ao sistema de drenagem, compõem o *tecido linfóide associado ao olho* (EALT), essencial ao reconhecimento de antígenos e à resposta imune. A conjuntiva desempenha um papel indispensável na resposta imune local, pela produção das imunoglobulinas da classe IgA (KNOP & KNOP, 2005).

Macrófagos do tecido subepitelial conjuntival são os primeiros a reconhecer o agente agressor, participando decisoriamente das defesas imunes na infecção aguda. Células dendríticas e de Langerhans são igualmente importantes na apresentação de antígenos na Leishmaniose (FERRER et al., 1988). Há fortes indícios de que elas influenciam o desenvolvimento das respostas das células T e B através de mecanismos pouco elucidados (GUARGUA et al., 2000; BAUER et al., 2002).

Opacidade corneal foi vista em 100% dos animais do grupo inoculado, se apresentando em diversas formas, notadamente como opacidades focais, o que corrobora com BRITO (2004), que observou alterações corneais em 12% dos cães estudados. GARCIA-ALONSO et al. (1996b) as relacionaram à presença de uveíte. ROZE (2002) referiu-se ao envolvimento corneal isolado como raro, estando normalmente relacionado à conjuntivite ou à uveíte. Outrossim, que eles são caracterizados por opacidades focais, com edema e infiltrado de células inflamatórias. GARCIA-ALONSO et al. (1998), no entanto, informaram sobre a ocorrência de opacidade corneal generalizada, associada à ceratoconjuntivite.

O epitélio estratificado não queratinizado, a membrana basal e as junções celulares, contribuem para a manutenção da integridade corneal, atuando como uma barreira efetiva contra patógenos. Por ser avascular, a resposta imune que se desenvolve é limitada, tendo como componentes de defesa células dendríticas ou de Langerhans, que modulam a atividade dos linfócitos B e T e a ocorrência de imunoglobulinas no estroma. Após uma injúria, o epitélio corneal desencadeia resposta imune local, na qual participam polimorfonucleares, linfócitos e fibroblastos (KLOTZ et al., 2000). Produzem-se citocinas e proteases inflamatórias, induzindo e agravando a destruição corneal (KNOP & KNOP, 2005).

Secreção ocular seromucóide foi observada em 71,42% dos animais do G1, ocorrendo de forma branda. GARCIA-ALONSO et al. (1998) descreveram secreção ocular associada à LVC, variando de mucóide a catarral. LAUGIER & VERRO-BOULANGER (1992) relataram descarga ocular associado à conjuntivite. Exsudato purulento associado à uveíte foi reportado por PEÑA et al. (2000), ROZE (2002) e BRITO (2004).

Não se encontraram quadros clínicos de uveíte em qualquer dos animais que compuseram o presente estudo, ainda que ela seja considerada de ocorrência comum (FEITOSA et al., 2000; BRITO, 2004). PEÑA et al. (2000) reportaram-se à incidência de uveíte em 42,8% dos cães acometidos por Leishmaniose Visceral, em áreas endêmicas. ROZE (2002) reportou a sua ocorrência em 70% dos casos, tendo como provável causa a deposição de imunocomplexos nas paredes dos vasos sanguíneos (PUMAROLA et al, 1991).

No presente estudo decorreram apenas hiperemia conjuntival, opacidade corneal e secreção ocular, no entanto, ROZE (1988) e ROZE (2000) descreveram nódulos conjuntivais, exoftalmia e estrabismo. BRITO (2004) relatou blefarite, ceratoconjuntivite seca, ceratite ulcerativa, hifema, coriorretinite e glaucoma como intercorrências presentes em cães infectados naturalmente por *L. chagasi*.

Ao exame sorológico, todos os animais resultaram negativos. Reiter et al. (1995) detectaram IgG aos 15 dias da infecção experimental em cães (SLAPPENDEL & GRENE, 1990). MARTINEZ-MORENO et al. (1995) detectaram soroconversão, ao ELISA e à imunofluorescência indireta, aos 50 dias da infecção experimental por via intravenosa. STRAUSS-AYALI et al. (2004) obtiveram soroconversão a partir de 60 dias da infecção experimental, também pela via intravenosa em cães. Os autores confirmaram a infecção empregando a PCR da conjuntiva, decorridos 45 dias da infecção. Face aos resultados, admitiram tratar-se de técnica mais sensível para o diagnóstico precoce da infecção experimental.

No presente estudo, a não positividade pode ter decorrido do pouco tempo de acompanhamento dos animais, provavelmente insuficiente para se identificar a soroconversão, da baixa sensibilidade do teste (SLAPPENDEL & GRENE, 1990), ou ainda, da via de inoculação.

Não foram encontradas formas amastigotas nas amostras de medula óssea examinadas. ROZE (1995) e TAFURI et al. (2003) referiram que a despeito do uso freqüente de amostras de esfregaços sanguíneos ou teciduais corados, para o diagnóstico da LVC, elas são, em muitos casos, inconclusivas, notadamente se a carga parasitária tecidual for baixa. PIARROUX et al. (1994) e FERRER (1999) sugeriram que

testes parasitológicos diretos, a partir de aspirados de medula óssea, são pouco sensíveis, comparativamente à PCR. O acompanhamento clínico temporal, não muito extenso, poderia, igualmente, justificar a ausência de positividade aos testes parasitológicos.

Não se encontraram, no presente estudo, formas amastigotas à histopatologia ocular. DIAS (1998) relatou-as nas três túnicas oculares e BRITO (2004) as evidenciou nos diversos componentes do olho, à exceção da retina, em cães naturalmente infectados. KLOTZ et al. (2000) referiram que formas amastigotas não são habitualmente identificadas na doença ocular decorrente do calazar. STRAUSS-AYALI et al. (2004), em casos de infecção experimental, não encontraram positividade aos 60 dias de infecção, em dois animais. Os autores, que empregaram a imunistoquímica como teste, sugeriram que esse resultado teria decorrido do pouco tempo de exposição do hospedeiro ao parasita. BRITO (2004) admitiu que a ocorrência de formas amastigotas intra-oculares, dever-se-ia, provavelmente, à quebra da barreira hemato-ocular e à sua passagem para a câmara anterior ou através de macrófagos parasitados.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp. têm sido documentadas em tecidos oculares corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) (DIAS, 1998; BRITO, 2004), no entanto, a sua baixa sensibilidade tem sido reportada (TAFURI et al., 2004).

DIAS (1998) afirmou que a presença de *L. chagasi* em olhos de cães induz a alterações estruturais. A despeito de não terem sido detectadas formas amastigotas, à histopatologia, diferentes alterações morfológicas foram identificadas, à similitude do que fora reportado por BRITO (2006), que descreveu a ocorrência de exsudato inflamatório abundante na retina, mesmo na ausência do parasita, admitindo como factível que as lesões teriam sido induzidas pela deposição de imunocomplexos.

Paralelamente à participação direta do parasita e de mediadores da inflamação, outros fatores podem corroborar para o desenvolvimento de lesões. Macrófagos, não somente atuando na eliminação do agente agressor, mas também promovendo reação inflamatória local pela liberação de radicais livres oxigenados, enzimas e citocinas, têm sido incriminados.

Exsudato inflamatório, predominantemente celular, caracterizado por mononucleares, foi observado na conjuntiva e na túnica vascular dos animais infectados. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário tem sido relatado em diferentes segmentos do olho (MOLLEDA et al., 1993; GARCIA-ALONSO et al., 1998; NARANJO et al., 2005; BRITO, 2006) e em outros órgãos, como pele, baço, fígado, intestinos, pulmões e rins (TAFURI et al., 2001; XAVIER, 2002).

Infiltrado subepitelial conjuntival no Grupo Inoculado apresentou-se em diferentes graus, que variaram de discreto a intenso, unilateral ou bilateralmente. Em alguns animais, todavia, o evento não foi identificado.

Diferenças quanto à intensidade da inflamação nas estruturas oculares foram descritas por BRITO (2006), que admitiram decorrer do tipo de resposta imune do hospedeiro, predominantemente celular ou humoral.

Na conjuntiva e na úvea identificou-se forte exsudação inflamatória. LAUGIER & VERRO-BOULANGER (1992) e BRITO (2006) discorreram sobre o mesmo em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*.

Admite-se, como factível, o importante papel como órgãos linfóides, que essas estruturas representam para o olho. EICHENBAUM et al. (1987) destacaram o *conjunctival associated lymphoid tissue* (CALT), como áreas especializadas aptas a receber e a apresentar antígenos. O predomínio de células inflamatórias nessas regiões poderia, então, estar relacionado à resposta específica, tanto no trato uveal, quanto na superfície conjuntival (BRITO, 2006).

Identificou-se perivasculite em vasos conjuntivais, notadamente nos mais superficiais. MOLLEDA et al. (1993) e GARCIA-ALONSO et al. (1998) a evidenciaram apenas na túnica fibrosa. Lesões vasculares associadas à deposição de complexos imunes, localizadas ou generalizadas, foram descritas por PUMAROLA et al. (1991) e CIARAMELLA et al. (1997). Não se descarta a possibilidade da deposição de imunocomplexos nos vasos conjuntivais, suscitando resposta inflamatória e lesões intercorrentes.

Neste estudo, os epitélios de revestimento da membrana nictitante apresentaram-se adelgaçados e, algumas vezes, ulcerados, com infiltrado inflamatório

predominantemente em região subepitelial. Observaram-se algumas áreas de hiperplasia de células caliciformes e outras com metaplasia epitelial e ausência de células caliciformes, a exemplo do que fora descrito por BRITO (2006), ao estudar cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Alterações relacionadas a células caliciformes não haviam sido reportadas, até que BRITO (2006) as tivesse referido, e como secundárias à reação inflamatória ensejada.

Relativamente à glândula da terceira pálpebra, o infiltrado inflamatório caracterizou-se por linfócitos e plasmócitos entre os ácinos, no lúmen e nos ductos. GARCIA-ALONSO et al. (1996b), GARCIA-ALONSO et al. (1998) e BRITO (2006) reportaram-se ao mesmo. NARANJO et al. (2005) relataram infiltrado inflamatório ao redor dos ductos, promovendo acúmulo retrógrado e retenção do produto de secreção glandular. Observou-se, ainda, atrofia focal em ácinos serosos e mucosos, à similitude do que fora descrito por BRITO (2006).

Em paralelo à presença de exsudato, identificou-se atrofia acinar e desorganização do estroma glandular em alguns fragmentos avaliados. Tratam-se de achados que corroboram as descrições de NARANJO et al. (2005), quanto à deficiência na produção lacrimal em casos de Leishmaniose Ocular, decorrentes da inflamação, da atrofia acinar, ou de ambas.

A congestão vascular, o edema e a perivasculite em íris, corpo ciliar e processos ciliares, caracterizados pela presença de plasmócitos e de macrófagos, ocorreram conforme reportado por BRITO (2006), que descreveu perivasculite, mesmo na ausência do parasita. Achados semelhantes já haviam sido descritos por MOLLEDA et al. (1993), GARCIA-ALONSO et al. (1996b), DIAS (1998) e GARCIA-ALONSO et al. (1998).

Relativamente à coróide, verificou-se infiltrado inflamatório mononuclear. MOLLEDA et al. (1993), GARCIA-ALONSO et al. (1996b), DIAS (1998), GARCIA-ALONSO et al. (1998) e BRITO (2006), no entanto, se reportaram à congestão vascular, edema e perivasculite. NIETO et al. (1996) referiram coroidite, caracterizada por congestão capilar e intensa exsudação inflamatória.

Neste estudo, não foram visibilizadas alterações histopatológicas na túnica fibrosa, tampouco a presença de formas amastigotas. BRITO (2006) houvera descrito desorganização do estroma corneal com proliferação vascular, hiperplasia do epitélio anterior e da membrana basal, e a presença de infiltrado inflamatório por mononucleares, em quantitativo maior comparativamente ao que fora relatado por MOLLEDA et al. (1993), GARCIA-ALONSO et al. (1998) e DIAS (1998).

BRITO (2006) sugeriu que a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp na córnea decorreria da inflamação crônica, por migração de macrófagos parasitados.

Neste estudo, não foram encontradas alterações estruturais na túnica nervosa. DIAS (1998) reportou-se à ausência de alterações na retina, a despeito da presença do parasita. GARCIA-ALONSO et al. (1998) consideraram a retina como importante sítio de agressão parasitária. BRITO (2006) descreveu congestão vascular, coriorretinite, presença de células inflamatórias em fibras do nervo óptico. Outrossim, espessamento de suas camadas e degeneração e necrose de células ganglionares, em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Comentou, ademais, que formas amastigotas de *Leishmania* sp não têm sido rotineiramente notificadas no tecido nervoso.

Ocorreu infiltrado inflamatório mononuclear discreto em apenas um animal do Grupo Controle. Segundo GARCIA-ALONSO et al. (1996b), a infiltração mononuclear não é patognomônica para LVC.

Visando a melhor compreender a patogenia das lesões que envolvem a Leishmaniose Ocular Canina, estudos envolvendo a pesquisa de anticorpos em humor aquoso têm sido desenvolvidos. Resultados quanto ao aumento dos níveis de IgG podem resultar de produção local ou de quebra da barreira sangue-olho.

Anticorpos da classe IgG no humor aquoso, foram reportados por LOPES et al. (1993), à imunodifusão radial simples. Os autores afirmaram não ter conseguido estabelecer qualquer relação entre eles e anticorpos séricos. GARCIA-ALONSO et al. (1995) e GARCIA-ALONSO et al. (1996b) demonstraram quantidades elevadas de IgG anti- *Leishmania chagasi* no humor aquoso de cães com uveíte. DIAS (1998) detectou anticorpos anti-*Leishmania* (IgM e IgG) nos humores aquoso e vítreo, valendo-se da técnica de ELISA. LIEKFELD et al. (2002) referiram o micro-ELISA modificado como útil

para a determinação de anticorpos intra-oculares, em casos de doenças sistêmicas com manifestação ocular.

Recentemente, BRITO (2006) demonstrou que o ELISA, utilizando peptídeo recombinante S7, foi capaz de detectar anticorpos *anti-Leishmania chagasi*, expressados em densidade óptica, no humor aquoso de cães infectados naturalmente. Tais resultados apontam para evidências quanto à presença do parasita ou do antígeno internamente ao olho, e a viabilidade do teste para diagnóstico. No presente estudo, o humor aquoso foi pela mesma técnica avaliado, e resultou negativo para anticorpos *anti-Leishmania chagasi*.

Estudos adicionais, quanto a diferentes tipos de imunoglobulina, poderão auxiliar no entendimento da patogenia da inflamação ocular e, conseqüentemente, das oftalmopatias intercorrentes em casos de LVC.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos com a pesquisa, na forma como fora concebida e executada, permite-se concluir que:

- A via conjuntival pode ser utilizada como modelo para o estudo da patogenia da Leishmaniose Ocular Canina.

- A pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania chagasi* em exame sorológico deve ser realizada preferencialmente após dois meses da infecção experimental pela via tópica.

- A resposta à infecção experimental por *Leishmania chagasi* por via tópica ocular em cães caracteriza-se por resposta inespecífica, de caráter focal ou difuso, representada por células mononucleares.

7. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. R. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico em cães (*Canis familiares*) (LINNAEUS, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937). 2006.** 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ALMEIDA, M.C. et al. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, p. 861-870, outubro, 2003.

ALMEIDA, M.A.O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmaniasis chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.127, p. 227-232, 2005.

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

ANDRADE, S.F.; GOUVÊIA, A. Descolamento de retina causada por *Erlíquia canis*. In: Congresso Paulista de Clínicos de Pequenos Animais. 2., 2002, São Paulo, **Anais...**, p. 131, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação – referências e elaboração: NBR 6023.** 24p. Rio de Janeiro, 2002.

Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO - **National Institutes of Health Publications**, No 85-23: Revised 1985.

BARBALHO-LIMA, T. et al. Lesões oculares em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, supl. 1, p. 43, 2005.

BAUER, D. et al. Conjunctival macrophage-mediated influence of the local and systemic immune response after corneal herpes simplex vírus-1 infection. **Immunology**. v.107, p. 118-128, 2002.

BEVILACQUA, L. et al. Ocorrência de osteoartrite em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. In: Congresso Paulista de Clínicos de Pequenos Animais. 2., 2002, São Paulo, **Anais...**, p.111, 2002.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo, EDART-EDUSP, 1976.

BIELORY, L. Immuno-ophthalmology. **Allergy Proceedings**..v.12, n.6, p.365-369, 1991.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde. Brasília, 120 p. 2004.

BRITO, F.L.C. **Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (*Canis familiaris* LINNAEUS, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)**. 2004. 42f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.

BRITO, F.L.C. **Patologia, resposta imune humoral e diagnóstico em cães com oftalmopatias decorrente da infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2006. 52f. Dissertação de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BRITO, F.L.C. et al. Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from the Olinda city, Pernambuco, Brazil. **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 34, n. 3, p.925-929, 2004.

BRITO, F.L.C. et al. Amastigota forms compatible with *Leishmania* sp on corneal ulceration in a dog. In: ESVO/ECVO International Veterinary Ophthalmology Meeting, 2005, Porto. ESVO/ECVO International Veterinary Ophthalmology Meeting, 2005, Porto.

CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência Cultural**, v. 55, n.1, São Paulo, jan./mar., 2003.

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

COCHRANE, C. G.; KOFLER, D. Immune complex disease in experimental animals and man. **Advances in Immunology**. v.16, p. 185-264, 1973.

CONSENSUS RECOMMENDATIONS ON EFFECTIVE INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEES – NIH AND USDA. 1987.
http://www.hospitalheliopolis.org.br/cep_2.htm acessado em 27 de julho de 2004.

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

CUNHA, A.M. Infecção da pelle na leishmaniose visceral experimental do cão. **Brasil-Médico**. v .48, p.1071-1072, Rio de Janeiro, 1938.

DA COSTA, D.S. et al. A relação entre o comprimento dos processos ciliares medidos pela biomicroscopia ultra-sônica e a duração, localização e gravidade das uveítes. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. V. 69, n.3, p. 383-388, 2006.

DAVID et al. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomya longipalpis* and *Lutzomya migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, p. 839-847, 2001.

DE COPEGUI, R.R. Congenital and Acquired Vascular Wall Diseases. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Veterinary Hematology**, Lippincott, 5 ed., Baltimore, Maryland, USA, 2000. cap. 75, p. 528-531.

DIAS, D.V. (1998). **Leishmaniose visceral canina: estudo parasitológico, imunológico e histopatológico em olhos de cães**. Tese de doutorado – UFMG, Belo Horizonte- MG, 117p.

EICHENBAUM, J.D. et al. Immunology of the ocular surface. **Immunology**. v. 9, n.11, p. 99-106, 1987.

EL HASSAN, A. M. et al. Post kala-azar ocular leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, n.92, Suppl 2, p. 177-179, 1998.

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

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: International Canine Leishmaniasis Forum, 1.,1999, Barcelona, Spain, **Proceedings...** p.6-10,1999.

FERRER, L. Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27 2002, Granada. **Anais eletrônicos...** Granada, 2002. Disponível em: <<http://www.avepa.org/granada2002>>. Acesso em: 07 jan. 2004.

FERRER, L. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.49, p. 381-388, 1988.

GARCIA-ALONSO, M. **Análisis de la antigenicidad de proteínas de *Leishmania infantum* em infecciones caninas naturales: estudo de um foco endêmico**. 1994. 286f. Tese doutorado – Universidade de Madri, Cáceres.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Diagnostico y tratamiento de la uveitis anterior inmunomediada en leishmaniosis canina. In: Congresso Ibérico de Parasitologia, 4, 1995, Santiago de Compostela, **Anais...** Santiago de Compostela, 1995, p. 198.

GARCIA-ALONSO M. et al. Immunopathology of the uveites in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v.18, p. 617-623, 1996a.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunology**. v. 18, p. 539-546, 1996b.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Patología ocular associada a leishmaniosis canina. **Consulta de Difusão Veterinária**, Portugal, v. 6, n. 54, p. 49-53, 1998.

GOGI, R. Immune disorders of the eye. **Indian Journal Ophthalmology**. v.27, p. 9-11, 1979.

GOTO, H; LINDOSO, J.A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, Ribeirão Preto,; v.37, n.4, p.615-23, Apr. 2004.

GUARGA, J.L. et al. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Research in Veterinary Science**. v.69, p. 249-253, 2000.

KLOTZ, A.S. et al. Fungal and Parasitic Infections of the Eye. **Clinical Microbiology Reviews**. v.13, n.4, p. 662-685, outubro, 2000.

KNOP, E.; KNOP, N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. **Journal of Anatomy**. v. 206, p.271-285, 2005.

KOUTINAS, A.F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 35, p. 376-383, 1999.

LAUGIER, C.; VERRO-BOULANGER, C. Ocular leishmaniasis. **Pratique medicale e chirurgicale del animal de campagne**. v. 27, n.6, 1992.

LEIVA, M.; LLORET, A.; PEÑA, T. ROURA, X. Ocular and visceral leishmaniosis in a domestic cat. **Veterinary Ophthalmology**, Philadelphia, v. 5, p. 285, 2002.

LEMAIRE, G.; et al. Recherches sur la leishmaniose du chien d'Alger. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v.6, p. 570-581, 1913.

LIEKFELD et al. Ocular toxoplasmosis antibodies in aqueous humor and serum. **Ophthalmologe**. v. 99, p.109-12, 2002.

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

LIRA, R.A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação dos kits" EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos**. Dissertação de Mestrado, 2005.

LOPES, R. et al. Concentrations d'immunoglobulines dans le plasma et l'humeur aqueuse de chiens atteints de leishmaniose. **Revue de Médecine Veterinaire**, Toulouse, v. 144, n. 7, p.621-623, 1993.

MARTINEZ-MORENO, F. et al. Humoral and cell mediated immunity responses in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 48, p. 209-220, 1995.

MARTINS, C.L.; STILES, J. Manifestações oculares de doenças sistêmicas. In: GELATT, K.N. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2003, 594p.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Leishmaniose Visceral Canina no Rio de Janeiro - Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MAYWALD, P.G.; MACHADO, M.I.; COSTA-CRUZ, M.J.; GONÇALVES-PIRES, M.R. Leishmaniose tegumentar, visceral e doença de Chagas canina em município do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro. v. 12, n. 3, 1996.

McCONNEL, E.E. et al. Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, n.156, p. 197-203, 1970.

MOLLEDA, J. M. et al. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Rishon Le-zion, n. 48, p. 173-178, 1993.

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

NARANJO, C. et al. Detection of *Leishmania* spp. and associated infiltrate in extraocular and adnexal smooth and striated muscles in dogs with leishmaniasis. In: ECVO/ESVO (European College of Veterinary Ophthalmologists and European Society of Veterinary Ophthalmology) **Annual Meeting**: Oporto, Portugal, June, 2005

NARANJO, C. et al. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 133, p. 37-47, 2005.

NEVES, J. Leishmaniose visceral (calazar). In: **Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 776-787.

NIETO, C.G. et al. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroids plexus. **The Veterinary Record**, p. 346-347, outubro, 1996.

NIETO, C.G. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.67, p. 117-130, 1999.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham International Focus**, London, v.9, n.2, p.16-24, 1999.

PEÑA, M. T. et al. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dog: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, Philadelphia, n. 3, p. 35-41, 2000.

PEIFFER JUNIOR, R.L. Ocular Immunology and Mechanisms of Ocular Inflammation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.10, n.2, p.281-302, May, 1980.

PIARROUX et al. Comparison of PCR with Direct Examination of Bone Marrow Aspiration, Myeloculture, and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompromised Patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v.32, p. 746-749, 1994.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PUMAROLA, M. et al. Canine Leishmaniasis associated with systemic vasculites in two dogs. **Journal of Comparative Pathology**. Eburgh, v.105, p. 279-286, 1991.

PUCHOL, J.L.; GONZALEZ, J.L. Leishmaniasis ocular: afeciones del segmento anterior. In: NACIONAL CONGRESS OF A.V.E.P.A., Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1989, p. 115-122.

RAHI, A.H.S. et al. The status of *Toxoplasma gondii* in the etiology of senile human cataract. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**. v. 66, p. 169-170, 1973.

REINECKE, P. et al. Ocular scleromalacia caused by leishmaniasis: a rare cause of scleral perforation. **Brazilian Journal Ophthalmology**.v.85, p. 238, fevereiro, 2001.

ROBERTS, M.T.M. Currents understandings on the immunology of leishmaniasis and recente developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**. v. 75 e 76, p. 115-130, julho, 2006.

ROCHA, G. et al. The immunology of the eye and its systemic interactions. **Critical Reviews in Immunology**.v.12, p. 81-100, 1992.

ROCHA, G. et al. Immunologic responses of the anterior chamber of the eye. **Allergologia et Immunopathologia**. v. 22, p. 23-7, Jan-Feb; 1994.

RODRIGUEZ-CORTEZ, A. et al. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**. v.37, p. 683-693, 2007.

ROZE, M. Manifestations oculaires de la leishmaniose canine. **Recueil de Médecine Veterinaire**. Maisons Alford, n. 162, p. 19-26, 1986.

ROZE, M. La leishmaniose et l'oeil. **Pratique Medicale et Chirurgicale l'animal Compagnie**. Paris, v.23, p. 49-55, 1988.

ROZE, M. Polymerase chain reaction: a revolution in diagnosis of ocular leishmaniosis ? **The Veterinary Quarterly**. v. 17, n. 1, p. 47-48, 1995.

ROZE, M. Ocular manifestation of canine leishmaniasis. Diagnosis and treatment. **The Globe Newsletter of the Internacional Society of Veterinary Ophthalmology**. v.13, 2002.

SANTOS-GOMES G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, p. 21-30, 2002.

SLAPPENDEL, R.J; GRENE, C.E. Leishmaniasis. In: GRENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. USA: W. B. Saunders Company, 1990. p. 769-777.

SLAPPENDEL, R.J. et al. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, The Hague, n. 10, p. 1-16, 1988.

SOLANO-GALEGO, L. et al. Detection of anti-Leishmania antibody in urine of dogs with leishmaniasis. In: **Word Small Animal Veterinary Associal**, 2002.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis. In: **Recente Advances in Canine Infectious Diseases**, Carmichael L., Ithaca, NY, 2001. Disponível em: <<http://www.ivis.com.br>>. Acesso em: 07 set. 2005.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Polimerase chain reaction using noninvasively obtained samples for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dog. **Journal Infection Diseases**. v. 189, p. 1279-1733, 2004.

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 96, p. 203-212, 2001.

TAFURI, W. L. et al. Diagnóstico imunohistoquímico para leishmaniose visceral canina. In: Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA, 23., 2003, Belo Horizonte. **Anais...Belo Horizonte: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, 2003.

TAFURI, W, L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**. v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

THOMÉ, S.M.G. Cuidado com as leishmanioses. **Cães e Gatos**, n. 85, p.46 a 50, set/out/1999.

THIRKILL, C.E. et al. Circulating and localized immune complexes in experimental *Mycoplasma*-induced arthritis-associated ocular inflammation. **Infection and Immunity**. v. 60, n.2, p.401-405,1992.

XAVIER, S.C. **Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2002. 46f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.