

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ESTUDO
IMAGINOLÓGICO EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS**

ALEXANDRE REDSON SOARES DA SILVA

Botucatu – SP
março de 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ESTUDO
IMAGINOLÓGICO EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS**

ALEXANDRE REDSON SOARES DA SILVA

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jaqueline
Mamprim

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Silva, Alexandre Redson Soares da.

Leishmaniose visceral canina : estudo imaginológico em cães naturalmente infectados / Alexandre Redson Soares da Silva. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Maria Jaqueline Mamprim

Capes: 50501038

1. Cão - Doenças. 2. Leishmaniose visceral. 3. Artrite. 4. Radiologia veterinária. 5. Tomografia. 6. Locomoção animal - Distúrbios.

Palavras-chave: Artrite; Leishmania spp.; Radiologia; Tomografia computadorizada; Zoonose.

Nome do Autor: Alexandre Redson Soares da Silva

Título: LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ESTUDO IMAGIONOLÓGICO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Jaqueline Mamprim
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Sheila Canevese Rahal
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Maria Lúcia Gomes Lourenço
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini
Membro
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal
FMVA – UNESP – Araçatuba

Profa. Dra. Priscilla Macedo de Souza
Membro
Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral
FAEF – Garça

Data da Defesa: 28 de março de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Alexandre Redson Soares da Silva – natural de João Pessoa – PB, nascido aos 28 de junho de 1976; graduado em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Campina Grande – *campus* Patos (05/2004), sob a orientação do Prof. Adjunto Pedro Isidro da Nóbrega Neto. Durante o período acadêmico desenvolveu atividades relacionadas à iniciação à docência (Monitoria). Realizou Residência Médico Veterinária em Radiologia Veterinária (02/2005 – 01/2007), junto à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* Araçatuba, sob a orientação da Profa. Ass. Dra. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini. Atuou como membro suplente, representante dos médicos veterinários, junto ao Conselho de Residência em Medicina Veterinária (02/2005 – 01/2006) e membro titular, representante dos médicos veterinários, junto ao Conselho Deliberativo do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” da FMVA – UNESP (04/2006 – 04/2007). Ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, com Área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, da FMVA – UNESP, em março de 2007, sob orientação do Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini e co-orientação da Profa. Ass. Dra. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini, sendo contemplado com bolsa de estudo do Programa Institucional de Bolsas, concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) a alunos de Pós-graduação. Atuou, durante o período de pós-graduação, como professor voluntário, da Disciplina de Radiologia Veterinária, do Curso de Graduação em Medicina Veterinária (03 a 12/2007) e membro titular representante dos discentes, junto ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FMVA – UNESP (06/2007 – 03/2008). No ano de 2009 obteve o título de mestre com a dissertação intitulada: *“Avaliação radiográfica das articulações dos membros locomotores de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no município de Araçatuba-SP”*. Em 2008, ingressou como docente no Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade Integrado de Campo Mourão, Paraná, sendo responsável pelas Disciplinas de Diagnóstico por Imagem, Semiologia Veterinária e Clínica Médica de Cães e Gatos, bem como Médico Veterinário Radiologista do Hospital Veterinário. No ano de 2010 migrou para a cidade de São José do Rio Preto - SP, onde ingressou como docente da Disciplina de Diagnóstico por Imagem e Médico Veterinário Radiologista no Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP. Iniciou o doutorado em Biotecnologia Animal, com área de concentração em Radiologia dos Animais, junto a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – *campus* Botucatu, em março de 2011, hora sendo contemplado com bolsa de estudo concedida pela Capes e posteriormente substituída pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Foi Professor Voluntário Associado, do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF – Petrolina, PE, junto à Disciplina de Diagnóstico por Imagem. Atualmente, é Professor Assistente de Diagnóstico por Imagem da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, lotado no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

... aos meus pais Edson Soares da Silva e Mauricélia Soares da Silva por tudo
que representam para mim, por terem me ensinado a amar, a respeitar e a
nunca desistir.

Suas palavras, bondade, devoção e humildade conduzem o meu caminho.

Vocês são um exemplo de amor.

Meu exemplo de vida.

À minha querida esposa Ana Amélia Domingues Gomes, pela cumplicidade,
amor, dedicação exaustiva e paciência.

Afirmo que o melhor momento da minha vida foi quando você entrou nela.

Com você tudo faz sentido.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Em especial à minha orientadora Profa. Adjunto Maria Jaqueline Mamprim,
pela oportunidade, confiança, ajuda, dedicação, ensinamentos, orientações,
paciência e sincera amizade durante todos esses anos.

Agradeço pelo exemplo profissional.

Agradeço pelos ensinamentos pessoais, de vida e de família.

Minha eterna admiração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao nosso Deus, pela vida, por estar sempre ao meu lado e por me proporcionar meios para alcançar meus sonhos.

Aos meus pais Edson Soares da Silva e Mauricélia Soares da Silva, pelo amor e carinho.

Aos meus sogros Antônio Wilson Domingues Gomes e Cecília Marostica Domingues Gomes, pelo incentivo e carinho.

Ao meu irmão Cláudio Segundo e à minha cunhada Marcela, pela felicidade e alegria oferecidos quando veio ao mundo o meu sobrinho e afilhado Vinícius. O “*Dindo*” te ama muito e só tem à agradecer ao papai do céu por ter colocado você em minha vida me fazendo ainda mais feliz.

À minha tia, Solange Soares da Silva Félix, pelo exemplo de docência, inspiração e carinho.

Ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – FMVZ – UNESP, pela oportunidade oferecida para à realização do Curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo de pós-graduação, durante o primeiro ano de curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho de pesquisa (Processo FAPESP nº 2012/02484-2), bem como pela concessão de bolsa de estudo durante os anos seguintes de curso (Processo FAPESP nº 2012/01526-3).

À diretora da Divisão de Vigilância Ambiental do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde de Bauru-SP, Ana Paula Nardo Silva, pela permissão da colheita de materiais, bem como ao médico veterinário José Rodrigues Gonçalves Neto, pelo pronto atendimento e receptividade.

Aos servidores municipais Josiane Silva Cano, Aline Fernanda Peral, Iria Cristina de Jesus, Graciele Mukoyama, Simone dos Santos Garcia, auxiliares em saúde e agentes de combate as endemias, Alberto Leandro Pereira (Mineiro), Acácio Menezes de Oliveira, Adenilson Medeiros Alves (Magrão), oficiais de controle animal (OCA), Valter Antônio Viol, motorista, Claudia Cilene Gomiere Barbosa, médica veterinária e Nathalia Maria Salvadeo Fernandes Parizoto, bióloga, pelo ambiente tranquilo, agradável convivência e ensinamentos durante esses meses.

À minha querida amiga e assessora pedagógica da FMVZ – UNESP – *campus* Botucatu Eliana Curvelo Rodrigues, pelos seus ensinamentos e simplicidade.

À chefe do Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP – *campus* Botucatu, Profa. Dra. Vânia Maria de Vasconcelos Machado, pela disponibilidade de conceder instalações e equipamentos para realização da parte experimental.

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati, pela receptividade, disponibilidade, inúmeras explicações e auxílio essencial na elaboração da análise histopatológica, realizada no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas EDAN, pela receptividade, disponibilidade e paciência em nos esperar após o horário de trabalho para receber as amostras biológicas para realização dos exames.

Ao médico veterinário e pós-graduandos Hugo Salvador Oliveira, pela colaboração de parte experimental e bom convívio social durante o período experimental, bem como pela amizade.

Ao tecnólogo Heraldo André Catalan Rosa, pela colaboração e ensinamentos de parte experimental, na realização dos exames tomográficos.

Aos médicos veterinários do Setor de Diagnóstico por Imagem da FMVZ – UNESP – *campus* Botucatu, Murilo G. S. Charlier, Letícia Rocha Inamassu, Shayra Bonatelli e Lidiane da Silva Alves, pelo ambiente tranquilo, agradável convivência durante esses anos e colaboração de parte experimental.

Aos pós-graduandos do Setor de Diagnóstico por Imagem da FMVZ – UNESP – *campus* Botucatu, Viviam Rocco Babicsak, Alexandra Frey Belotta, Diana Milena Rodríguez, Rosalia M. I, Zulim, Thiago Rinaldi Müller, Raquel Sartor, Cibely Sarto, Priscilla Macedo de Souza, Hugo Salvador Oliveira, Maísa Martins Quirilos Assis, Felipe Foletto Geller, Lídice Araújo Campos, Danuta Pulz Doiche, Luciana Carandina da Silva, Luis Emiliano Cisneros Alvarez, Roberta Valeriano dos Santos, Zara Bortoloni e Felipe Carvalho Evangelista, pelo ambiente tranquilo e agradável convivência durante esses anos.

Aos docentes do Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP – *campus* Botucatu, Prof. Dr. Luiz Carlos Vulcano, Profa. Dra. Maria Jaqueline Mamprim e Profa. Dra. Vânia Maria de Vasconcelos Machado, pela disponibilidade de conceder as instalações, os equipamentos para realização da parte experimental, ensinamentos, conselhos e agradável convivência durante esses anos.

Aos funcionários da FMVZ – UNESP - *campus* Botucatu, em especial a Dona Vilma, Dito, Marcos, Vânia, Ivete, José Roberto de Lalla Júnior e Carlos Pazini Junior, por toda ajuda sempre dispensada.

À Profa. Dra. Maria Jaqueline Mamprim, à Profa. Dra. Maria Lúcia Gomes Lourenço e à Profa. Dra. Sheila Canevese Rahal, pela contribuição no Exame Geral de Qualificação.

Aos amigos Durval Baraúna Júnior, Ana Catarina Luscher Albinati, Alexandre Coutinho Antonelli, Daniel Ribeiro Menezes, Raimundo Campos Palheta Júnior, Audrin Éderson Vila Nova Silva, Flaviane Maria Florêncio Monteiro Silva, Mabel Freitas Cordeiro, João Alves do Nascimento Júnior, Maria Helena Tavares de Matos, Adriana Gradela, Edílson Soares Lopes Júnior, Seldon Almeida de Souza, Marcelo Domingues de Faria, Márcia Medeiros de Araújo, Clarice Ricardo de Macêdo Pessoa, Regina Wolf Queiroz, Ivoneide Garcia, Marta Leite, Mário Alexandre, pelo incentivo dado a mim e a minha esposa durante o período de realização deste projeto que nos distanciava.

Aos meus queridos amigos Thaís Rabelo dos Santos, Simone Bopp, Sabrina Marin Rodigheri, Ludmila Rodrigues Moroz, Rafael Felipe da Costa Vieira, Thallitha Samih Wischral Jayme Vieira, Rodrigo Yanaka, Valéria Cristina Garcia, Danilo Tancler Stipp, Rodrigo Noberto Pereira, Rosileide dos Santos Carneiro, Ebivaldo Gonçalves Brito Filho e Guillermo Carlos Veiga Oliveira pela amizade sincera e carinho.

Aos meus ex-alunos, parentes, amigos, estagiários, residentes, pós-graduandos e docentes que me ajudaram, direta ou indiretamente, a concluir este projeto.

Aos gatos Filó (*in memoriam*), Miguel e Fumaça, além dos meus cães Pétala, Juli, Clarck, Willy e Maia, pela pureza de sentimentos e por me incentivarem quanto à escolha da profissão.

À Profa. Dra. Maria Jaqueline Mamprim, à Profa. Dra. Sheila Canevese Rahal, à Profa. Dra. Mary Marcondes, à Profa. Dra. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini e à Profa. Dra. Priscilla Macedo de Souza pela contribuição e sugestões na Defesa de Tese.

E por último e não menos importante, a todos os animais que participaram involuntariamente desta pesquisa.

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1. Comparação do número de lesões radiográficas entre os animais sintomáticos e assintomáticos, por meio do teste de Fisher, de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.....	58
QUADRO 2. Comparação do número de lesões tomográficas entre os animais sintomáticos e assintomáticos, por meio do teste de Fisher, de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.....	64

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Localização das lesões osteoarticulares observadas radiograficamente em cães com leishmaniose.....	37
TABELA 2. Distribuição das frequências absoluta (<i>fi</i>) e relativa (%) conforme as variáveis: sexo, raça e faixa etária de 46 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.....	51
TABELA 3. Frequência absoluta (<i>fi</i>) dos achados clínicos ortopédicos de acordo com o animal e o tipo de lesão de 15 cães com leishmaniose visceral.....	53
TABELA 4. Frequência absoluta (<i>fi</i>) e relativa (%) dos achados radiográficos em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com presença e ausência de sinais clínicos ortopédicos.....	53
TABELA 5. Frequência absoluta (<i>fi</i>), distribuição e caracterização das lesões radiográficas em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.....	54
TABELA 6. Frequência absoluta (<i>fi</i>) e relativa (%) dos achados tomográficos em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com presença e ausência de sinais clínicos ortopédicos.....	60
TABELA 7. Frequência absoluta (<i>fi</i>), distribuição e caracterização das lesões radiográficas em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.....	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Distribuição do número de casos de leishmaniose visceral em humanos no Brasil, de acordo com o ano de referência, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde (MS).....	24
FIGURA 2. Mapa de estratificação de leishmaniose visceral de acordo com o município de residência e média de casos, de 2008 a 2010, segundo os dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2012e).....	25
FIGURA 3. Localização de Bauru – SP. Município localizado na região noroeste do Estado de São Paulo (seta). Fonte: Adaptado do IBGE (2014a).....	26
FIGURA 4. Número absoluto de casos de seres humanos com leishmaniose visceral, de acordo com o ano de referência, no município de Bauru – SP, segundo dados Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) de São Paulo.....	27
FIGURA 5. Posicionamentos radiográficos adotados conforme a articulação em estudo: umeroradioulnar (1 e 2), radiocarpicametacárpica (3 e 4), femurotibiopatelar (5 e 6) e tibiotarsicametatarsica (7 e 8). Incidências médio-lateral (ML), crânio-caudal (CrCa), dorso-palmar (DPa), dorso-plantar (DPI).....	47
FIGURA 6. Posicionamento dos membros torácicos (A) e pélvicos (B) para realização do exame por tomografia computadorizada.....	48
FIGURA 7. Equipamento de tomografia computadorizada helicoidal.	49
FIGURA 8. Sensibilidade dos testes sorológicos de ELISA e TR-DPP®, e parasitológico direto em amostras biológicas de 46 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.....	50

FIGURA 9. A. avaliação imunocromatográfica reagente para leishmaniose visceral canina (seta preta), por meio do teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos. B. avaliação citopatológica de linfonodo de cão, acometido por leishmaniose visceral. Presença de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. no interior de macrófagos (setas brancas). Panótico rápido®, 400x.....	51
FIGURA 10. Apresentação clínica de cão infectado por <i>Leishmania infantum chagasi</i> , demonstrando edema de partes moles adjacente à articulação radiocarpicametacárpica (setas).....	52
FIGURA 11. Frequência absoluta (f) dos achados clínicos ortopédicos em cães leishmaniose visceral.....	52
FIGURA 12. Imagens radiográficas digitais das articulações tibiotarsicametatarsicas direita (A e B) e esquerda (C e D), em projeções dorso-plantar (A e C) e médio-lateral (B e D), de um cão naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A e D. Trabeculado ósseo evidente (setas); B. Proliferação óssea (seta); C. Edema de partes moles (setas).....	55
FIGURA 13. Imagens radiográficas digitais das articulações radiocarpicametacárpicas esquerda (A) e direita (D), umeroradioulnar esquerda (B) e femurotibiopatelar direita (C), em projeções dorso-palmar (A e D) e médio-lateral (B e C), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A. Osteólise (seta); B. Cisto ósseo (setas); C. Osteófito (seta); D. Colapso articular (setas).....	56
FIGURA 14. Ocorrência do envolvimento articular por meio do exame radiográfico em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.....	57

- FIGURA 15.** Imagens tomográficas digitais das articulações femurotibiopatelar (A), umeroradioulnar (B), radiocarpicametacárpica (C) e tibiotarsicametatarsica (D), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A. Osteólise (seta); B. Cistos ósseos (setas); C. Colapso articular (seta); D. proliferação óssea (seta)..... 62
- FIGURA 16.** Imagens tomográficas digitais das articulações femurotibiopatelares (A, C e D) e tibiotarsicametatarsica (B), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A. Esclerose óssea (seta); B. Cisto ósseo (setas); C. flap de cartilagem (seta); D. Osteófitos (setas)..... 62
- FIGURA 17.** Ocorrência do envolvimento articular por meio do exame tomográfico em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral..... 63

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Atestado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-UNESP-Botucatu, aprovando que a pesquisa apresenta-se em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.....	93
Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a realização do projeto de pesquisa intitulado “Leishmaniose visceral canina: estudo imaginológico abdominal e do esqueleto apendicular em cães naturalmente infectados”, junto ao Centro de Controle de Zoonose do município de Bauru, São Paulo, Brasil.....	94

LISTA DE APÊNDICES

	Página
Apêndice 1. Identificações individuais dos animais quanto a espécie, a raça, o sexo e a idade.....	96
Apêndice 2. Resultados individuais para a pesquisa de leishmaniose visceral através do ensaio imunocromatográfico, por meio do Teste Rápido <i>Dual Path Platform</i> (TR-DPP® - Bio-Manguinhos), sorologia por meio do ensaio Imunoenzimático (ELISA) e em preparados citológicos obtidos por meio de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo.....	98

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivos gerais.....	38
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Ética animal.....	39
4.2 Local e tempo de execução.....	39
4.3 Animais utilizados.....	40
4.4 Delineamento experimental.....	40
4.5 Exame semiológico do aparelho locomotor.....	41
4.6 Colheita de sangue.....	41
4.7 Diagnóstico de <i>Leishmania</i> spp.....	42
4.7.1 Exame imunocromatográfico.....	42
4.7.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	43
4.7.3 Exame citológico de linfonodo.....	46
4.8 Exame radiográfico digital.....	46
4.9 Exame tomográfico computadorizado.....	49
4.10 Análise estatística.....	49
5. RESULTADOS.....	50
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÕES.....	73
8. BIBLIOGRAFIA.....	74
ANEXOS.....	92
APÊNDICES.....	95
ARTIGO CIENTÍFICO.....	100

SILVA, A.R.S. **Leishmaniose visceral canina: estudo imaginológico em cães naturalmente infectados**. Botucatu, 2014. 99 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP “Júlio de Mesquita Filho”. Brasil.

RESUMO

Alterações locomotoras são incomuns em cães com leishmaniose visceral. Embora a origem dos sinais clínicos permaneça obscura, a poliartrite deve ser considerada como um potencial diagnóstico nestes casos. Muitos agentes etiológicos podem causar poliartropatias, sendo estas classificadas em não inflamatórias e inflamatórias. Acredita-se que a poliartrite induzida por *Leishmania* spp. seja decorrente de uma reação inflamatória granulomatosa, causada pela presença de parasitos ou por uma resposta celular e humoral. O diagnóstico clínico ainda é um desafio para os profissionais de saúde, devido à grande variedade de sinais inespecíficos em decorrência da leishmaniose visceral. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos avaliar radiotomograficamente as articulações umeroradiolulares, radiocarpicometacárpicas, femurotibiopatelares e tibiotarsicometatarsicas, a fim de caracterizar as lesões osteoarticulares, fornecendo subsídios para os clínicos que atuam em áreas endêmicas. Para tanto, foram utilizados 46 cães, naturalmente infectados, com diagnóstico firmado por meio dos exames imunocromatográfico (95,65%), ELISA (97,82%) e/ou parasitológico direto (95,65%), provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Bauru. Não houve predileção quanto ao sexo (1:1). A maioria dos animais não apresentava precisa definição racial (78,26%). A idade variou entre um a 12 anos, com mediana igual a três anos. Sinais clínicos compatíveis com poliartrite foram observados em 32,60%. Alterações radiográficas e tomográficas importantes foram observadas em 77% e 91% dos caninos, respectivamente, sendo as articulações tibiotarsicometatarsicas a mais afetada em ambos os testes, acometendo cães sintomáticos e assintomáticos. Os sinais imaginológicos foram variados, não sendo possível determinar um padrão específico para a doença, porém a presença de trabeculado ósseo evidente, esclerose óssea e osteólise foram os mais frequentemente observados. Ademais, notou-se uma tendência para o envolvimento bilateral e simétrico. Notou-se ausência de significância quando comparadas as lesões radiotomográficas entre os animais sintomáticos e assintomáticos. Diante do estudo conduzido em cães naturalmente portadores de leishmaniose visceral podemos concluir que o exame tomográfico foi mais sensível que o radiográfico; as alterações radiotomográficas apresentaram-se simétricas, bilaterais e com ausência de sinais patognomônicos; as articulações tibiotarsicometatarsicas foram as mais afetadas; a poliartrite associada a leishmaniose visceral é uma condição frequente; a leishmaniose visceral deve ser incluída no diagnóstico diferencial de poliartrite, mesmo na ausência dos sinais clínicos clássicos da doença.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania* spp., zoonose, radiologia, tomografia computadorizada, artrite

SILVA, A.R.S. **Canine visceral leishmaniasis: imaging study in naturally infected dogs**. Botucatu, 2014. 99 p. Thesis (PhD) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Campus, Universidade Estadual Paulista – UNESP “Júlio de Mesquita Filho”. Brazil.

ABSTRACT

Locomotor alterations are uncommon in dogs with visceral leishmaniasis (VL). Although the origin of clinical signs remain unclear, polyarthritis should be considered as a potential diagnosis in these cases. Many etiological agents may cause polyarthropathies, which are classified into inflammatory and non-inflammatory. It is believed that the polyarthritis induced by *Leishmania* spp. may be due to a granulomatous inflammatory reaction caused by the presence of parasites or by cellular and humoral response. Clinical diagnosis is still a challenge for health professionals, due to the great variety of nonspecific clinical signs on VL. Thus, the aim of the present study were to evaluate radiographically and tomographically elbows, carpal, stifle and tarsal joints, in order to characterize the osteoarticular lesions, providing subsidies for veterinary practitioners in endemic areas. For this, 46 dogs were used, naturally infected, with diagnosis confirmed by immunochromatography (95.65%), ELISA (97.82%) and/or cytological (95.65%) methods, from the Zoonoses Control Center of Bauru. There was no preference to gender (1:1). The majority of animals were mixed breed (78.26%). Ages varied from 1 to 12 years, with a median of 3 years. Clinical signs consistent with polyarthritis were observed in 32.60%. Radiographic and tomographic alterations were observed in 77% and 91% of dogs, respectively, with tarsal joints the most affected on both methods, on asymptomatic and symptomatic dogs. Imaging signs varied, and it was not possible to establish a pattern for the disease, however the presence of apparent trabecular bone, bone sclerosis and osteolysis were the most frequently observed. Furthermore, we noticed a tendency for bilateral and symmetric involvement. It was observed a lack of significance when comparing the radiographic and tomographic lesions between symptomatic and asymptomatic animals. In conclusion, the tomographic exam was more sensitive than radiographic; radiographic and tomographic alterations presented symmetrical, bilateral with lack of pathognomonic signs; the tarsal joints were the most affected; polyarthritis associated with VL is a common condition; VL should be included on differential diagnosis of polyarthritis, even on the absence of clinical signs of the disease.

KEYWORDS: *Leishmania* spp., zoonoses, radiology, computed tomography, arthritis.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose que vem se expandindo pelo Brasil, principalmente nos grandes centros urbanos, onde nos últimos 10 anos 38.953 casos foram notificados em 26 dos 27 estados brasileiros, dos quais 2.384 cursaram com o óbito dos pacientes, segundo dados do Ministério da Saúde, atualizados até agosto do ano de 2013 (BRASIL, 2014c; BRASIL, 2014d; BRASIL, 2014e).

De 2003 a 2013, foram notificados 38.953 pessoas portadoras de LV em todo território brasileiro, dos quais 2.500 vieram a óbito (BRASIL, 2014c; BRASIL, 2014d; BRASIL, 2014e).

No estado de São Paulo, conforme valores do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vrajaç” (CVE), foram registrados na última década 2.384 casos de LV, com 171 óbitos (CVE, 2014). Já no município de Bauru, localizado na região noroeste do estado, foram notificados 438 casos de LV, das quais 38 pessoas vieram a óbito, entre 2003 a maio de 2013, de acordo com registros do CVE (2014).

No ambiente doméstico o cão é o principal reservatório epidemiológico da doença sendo considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores. Esse fato torna-o um dos alvos nas estratégias de controle da doença (SLAPPENDEL; FERRER, 1998; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

A leishmaniose visceral canina (LVC) pode manifestar-se como uma doença sistêmica crônica, comprometendo diversos sistemas orgânicos (BANETH et al., 2008; VIDES et al., 2009; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012). Embora pouco estudada, a incidência das afecções músculo esqueléticas em áreas endêmicas para LVC pode chegar entre 30 e 45% (TURREL; POOL, 1982; YAMAGUCHI et al., 1983; SLAPPENDEL, 1988; WOLSCHRIJN et al., 1996; BURACCO et al., 1997; AGUT et al., 2003; SILVA, 2009). Esses cães podem apresentar artralgia, cifose, claudicação, crepitação articular, edema de partes moles adjacente à articulação e relutância ao caminhar, proveniente de lesão neural, poliartrite, sinovite, polimiosite e osteomielites (WOLSCHRIJN et al., 1996; VAMVAKIDS et al., 2000; AGUT et al., 2003; SILVA et al., 2007; GOMES et al., 2007; PACIELLO et al., 2009; SILVA, 2009; SILVA et al., 2011; GOMES et al., 2012; SILVA et al., 2012a;

SILVA et al., 2012b).

Ensaio radiológicos demonstraram que as lesões osteoarticulares podem ser classificadas como erosivas (WOLSCHRIN et al., 1996; KOUTINAS et al., 1999; BLAVIER et al., 2001; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003), não erosivas (SPRENG, 1993; KOUTINAS et al., 1999; AGUT et al., 2003) ou mistas (SILVA et al., 2007; SILVA 2009; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012a; SILVA et al., 2012b), dependendo da evolução da doença e da resposta imune do animal. Contudo, na literatura pretérita pouco são os relatos avaliando o esqueleto apendicular de cães infectados por *Leishmania infantum chagasi*, por meio da tomografia computadorizada (TC) (SILVA et al., 2012a). Desta forma, acreditamos que o exame por meio da TC, poderá colaborar com a caracterização de possíveis lesões osteoarticulares em animais positivos, tendo em vista que é uma técnica mais sensível e elaborada, que consiste em uma imagem que representa secções sequenciais de um segmento do corpo, obtidas através do processamento computadorizado.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as articulações umeroradioulnares, radiocarpicametacárpicas, femurotibiopatelas e tibiotarsicametatarsicas por meio dos exames radiográficos digitais e tomografia computadorizada, a fim de caracterizar o tipo, a frequência e a distribuição das lesões osteoarticulares, obtendo informações de alterações para fornecer subsídios para os clínicos veterinários que atuam em áreas endêmicas. Ademais, testar a sensibilidade das técnicas imaginológicas supracitas como ferramentas de diagnóstico complementar nos casos de poliartrites associadas a leishmaniose visceral canina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As leishmanioses são representadas por um grupo de doenças zoonóticas, de distribuição mundial, que acometem os seres humanos e uma variedade de animais domésticos e selvagens, com diferente apresentação clínica de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida e a resposta imune do hospedeiro (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

Os agentes etiológicos da LV são classificados como protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). Fazem parte do complexo *Leishmania donovani*, sendo a *Leishmania*

donovani o agente etiológico encontrado na África e Ásia; a *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África e a *Leishmania chagasi* nas Américas. Apesar da discordância entre pesquisadores, semelhanças estruturais verificadas por meio de estudos moleculares sugerem que a *Leishmania chagasi* e a *Leishmania infantum* sejam a mesma espécie, permitindo a denominação *Leishmania infantum chagasi* para o agente etiológico desta enfermidade também nas Américas (SHAW, 2006).

Mundialmente, aproximadamente 200 milhões de pessoas residem em área de risco, e cerca de 200.000 a 400.000 novos casos e 58.000 óbitos são registrados anualmente (ALVAR et al., 2012; WHO, 2014). Infelizmente esses dados são subestimados, uma vez que a afecção é de notificação compulsória em apenas 40% dos países em que ocorre (DESJEUX, 2004; ALVAR et al., 2012).

Descrita em todos os continentes, com exceção da Oceania, a LV nos seres humanos já foi relatada em cerca de 66 países localizados em regiões tropicais e subtropicais (DESJEUX, 2004; ALVAR et al., 2006; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012). Contudo, cerca de 90% dos casos mundiais ocorrem no Afeganistão, Bangladesh, Índia, Sudão, Etiópia e Brasil (ALVAR et al., 2012; WHO, 2014). Mesmo com grande parte dos casos de LV subnotificados, o Brasil é responsável por aproximadamente 95% dos relatos nas Américas (ALVAR et al., 2012).

De 2003 a 2013, foram notificados 38.953 pessoas portadoras de LV em todo território brasileiro, com 1.415 relatos até agosto de 2013 (Figura 1) (BRASIL, 2014e). Quanto a taxa de letalidade da zoonose no país, a mesma se elevou nos últimos dez anos, apresentando uma média de 6,6%, com cerca de 2.500 óbitos notificados (BRASIL, 2014c; BRASIL, 2014d).

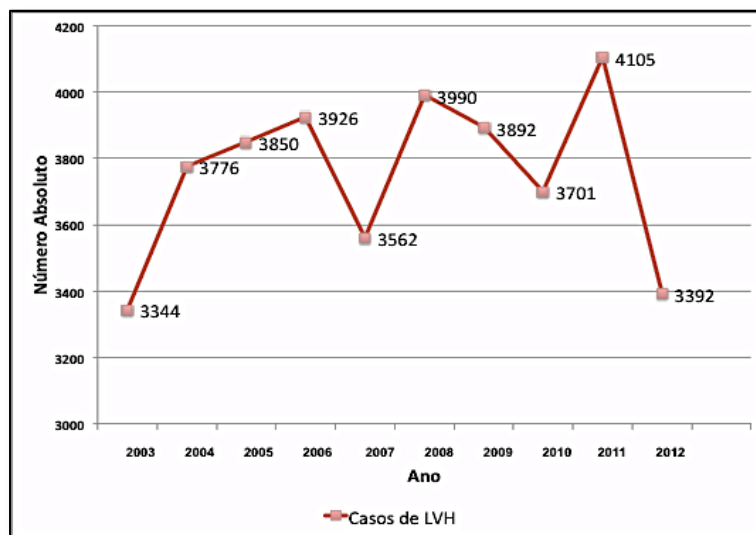


FIGURA 1. Distribuição do número de casos de leishmaniose visceral em humanos no Brasil, de acordo com o ano de referência, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde (MS).

Além dos elevados índices de letalidade e mortalidade, a LV vem apresentando grande expansão geográfica no Brasil. De acordo com o Ministério da Saúde, no ano de 2013, dos 27 estados brasileiros 26 já notificaram casos autóctones da enfermidade, principalmente nas regiões norte, nordeste e sudeste (BRASIL, 2014a; BRASIL, 2014e). Cerca de 230 municípios são classificados como áreas de transmissão intensa (com mais que 4,4 casos/100.000 habitantes nos últimos três anos) ou moderada (entre 2,4 e 4,4 casos/100.000 habitantes nos últimos três anos), demonstrando a importância e a expansão da enfermidade em território nacional (Figura 2) (BRASIL, 2014e).

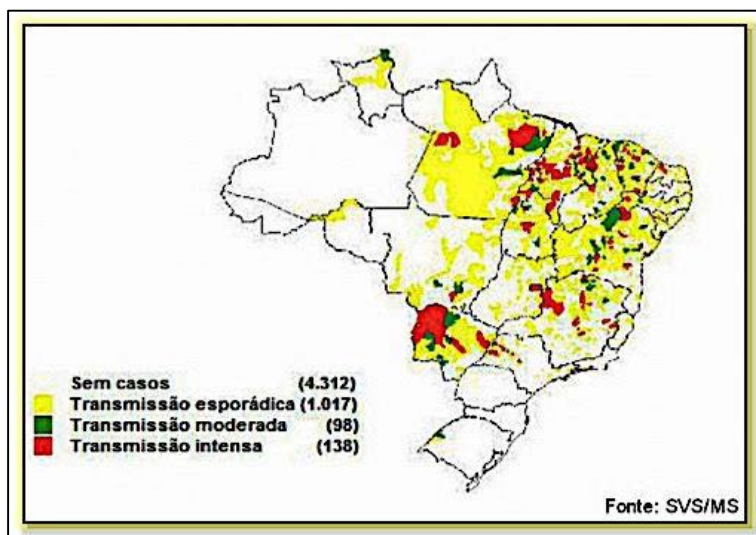


FIGURA 2. Mapa de estratificação de leishmaniose visceral de acordo com o município de residência e média de casos, de 2008 a 2010, segundo os dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde (MS).

Atualmente, chama a atenção o crescente número de casos de LV humana em grandes centros urbanos, tais como as cidades de Araguaína (TO), Aracaju (SE), Araçatuba (SP), Belo Horizonte (MG), Campo Grande (MS), Cuiabá (MT), Fortaleza (CE), Palmas (TO), Petrolina (PE), Recife (PE), Teresina (PI) e Bauru (SP) (BRASIL, 2014e).

A evolução espacial da LV no Mato Grosso do Sul (MS) ocorreu no sentido oeste (Corumbá) a leste (Três Lagoas) do estado, devido a construção da rodovia federal e ao gasoduto Bolívia–Brasil o que, conseqüentemente, expandiu a doença para a região noroeste do Estado de São Paulo (ANTONIALLI et al., 2007; BRASIL, 2014e). No território paulista, 76 municípios já apresentaram registro da enfermidade (CVE, 2014). Segundo dados da Secretaria da Saúde de São Paulo, foram notificados 2.384 casos de Calazar humano e 171 óbitos de 2003 a maio de 2013 (CVE, 2014).

O município de Bauru situa-se no interior do estado de São Paulo, Brasil, sendo o mais populoso do centro oeste paulista, localizando-se a noroeste da capital do estado, distando cerca de 326 quilômetros (km) dessa (Figura 3). Tendo como coordenadas geográficas 22° 18' 53" de latitude e 49° 03' 38" de longitude, a 526 metros (m) de altitude, em relação ao nível do mar. Ocupa uma área de 675,200 quilômetros quadrados (km²), sendo que

68,977 km² estão em perímetro urbano e os 604,52 km² restantes constituem a zona rural, segundo o IBGE (2014a) e a Embrapa (2014).



FIGURA 3. Localização de Bauru – SP. Município localizado na região noroeste do Estado de São Paulo (seta). Fonte: Adaptado do IBGE (2014a).

O município possui clima tropical de altitude, tipo temperado úmido com inverno seco e verão quente (Aw), segundo classificação Köppen (CEPAGRI, 2014), com diminuição de chuvas no inverno e temperatura média anual de 22,6 graus Celsius (°C), com invernos secos e amenos, e verões chuvosos com temperaturas moderadamente altas, sendo a temperatura mínima de 12,0°C e máxima de 31,0°C, com precipitação pluviométrica de 1.331 milímetros por ano (mm/ano) (CEPAGRI, 2014).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, estima-se que o município de Bauru possui aproximadamente 348.146 habitantes, dos quais 342.298 (98,32%) residem em área urbana e 5.848 (1,68%) em área rural, sendo a densidade demográfica do município de 516,93 habitantes/km² (IBGE, 2014a).

As principais atividades econômicas da região até a década de 1940 eram totalmente dependentes da agricultura, porém pela sua localização privilegiada, em um grande entroncamento rodo-aéreo-hidro e ferroviário do estado de São Paulo, a oferta de energia e de rede telefônica fizeram com que a indústria e o comércio se fortalecessem no decorrer do século XX, especialmente na segunda metade deste (PACHECO, 2014). Atualmente, destacam-se o comércio e a indústria, sendo esta última a principal

responsável pela urbanização do município e hoje é, juntamente com o setor terciário, a sua principal fonte de renda, fazendo com que o município tenha o 68º maior PIB brasileiro, 18º do estado de São Paulo e o maior da Microrregião de Bauru (IBGE, 2014b).

Nos últimos dez anos cerca de 438 casos de LV foram notificados, das quais 38 pessoas vieram a óbito, e somente no ano de 2012, 44 habitantes foram infectados, onde dois vieram a falecer (Figura 4). Ainda, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vrajac”, já em meados de 2013 a cidade registrava nove casos da doença em humanos, com duas mortes, advindas da LV (CVE, 2014).

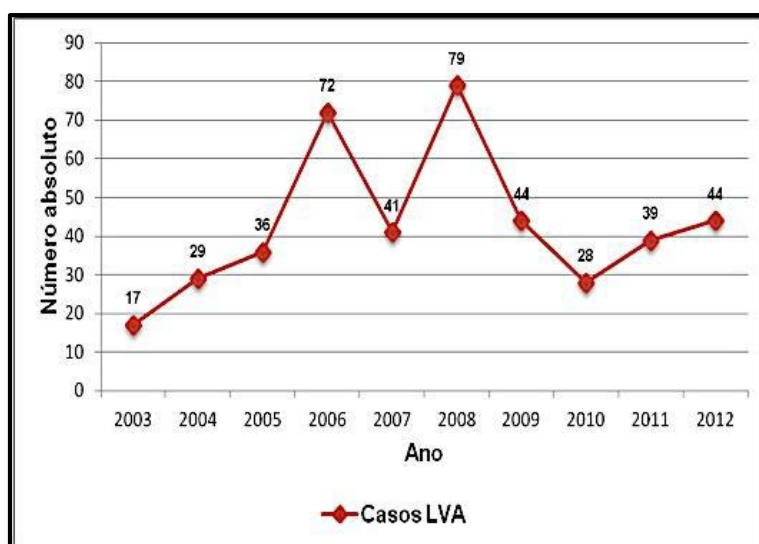


FIGURA 4. Número absoluto de casos de seres humanos com leishmaniose visceral, de acordo com o ano de referência, no município de Bauru – SP, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) de São Paulo.

No Brasil o principal vetor da LV é a *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ; NEIVA, 1912), pertencente à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (GENARO et al., 2000; BANETH; SOLANO-GALLEG0, 2012).

O principal mecanismo de transmissão ocorre quando as fêmeas de flebotomíneos, infectadas com formas promastigotas, alimentam-se em hospedeiros susceptíveis.

Durante o repasto sanguíneo estas formas são inoculadas na pele, gerando uma resposta inflamatória local, com subsequente fagocitose por

células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente os macrófagos. No interior dos macrófagos as promastigotas perdem o flagelo e diferenciam-se em amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias. As células densamente parasitadas rompem-se, liberando estas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos. Ocorre, então, a disseminação hematogênica e linfática para tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, tais como linfonodos, medula óssea, baço e fígado (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

Além dos tecidos supracitados, outros órgãos e estruturas, tais como as articulações (AGUT et al., 2003; SILVA et al., 2007; SILVA, 2009; HOFFMANN et al., 2012) e os músculos (GOMES et al., 2009; FERRARO et al., 2012; GOMES et al., 2012), podem apresentar o parasita, segundo os relatos de literatura.

O ciclo biológico continua quando as fêmeas de flebotomíneos, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* spp. Após cerca de 72 horas, as amastigotas transformam-se em promastigotas infectantes no trato digestório do inseto, sendo eliminadas pela saliva durante o próximo repasto sanguíneo (MICHALICK; GENARO, 2007; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

Durante a infecção, as células apresentadoras de antígenos, pertencentes ao sistema mononuclear fagocítico, estimulam a proliferação de linfócitos T (CD4+) auxiliares do Tipo 1 (Ta1) ou auxiliares do Tipo 2 (Ta2) (FEITOSA et al., 2000; MACHADO et al., 2007). As células Ta1, ativadas pela interleucina (IL) 12, produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), IL-2, IL-3 e IL12, e o interferon gama (IFN- γ), que aumentam a eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos. O IFN- γ é um potente indutor da formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos, favorecendo o controle do parasitismo com a eliminação da infecção (PINELLI et al., 1994; CIARAMELLA; CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006).

Por outro lado, se houver a ativação de linfócitos Ta2, ocorrerão à produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, com consequente proliferação de células B e produção exagerada de imunoglobulinas, desencadeando a formação e deposição de imunocomplexos circulantes, os quais causam danos teciduais.

Desta forma, os animais que apresentam sinais clínicos da doença desenvolvem uma resposta imunológica predominantemente humoral que, além de não ser protetora, é ainda deletéria ao organismo (BARBIÉRI, 2006).

No ambiente doméstico o cão é o principal reservatório epidemiológico da doença e é considerado o principal hospedeiro e fonte de infecção para os vetores, sendo um dos alvos nas estratégias de controle da doença (SLAPPENDEL; FERRER, 1998; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012). Isto se deve provavelmente ao contato direto desses animais com os seres humanos, bem como ao frequente parasitismo cutâneo observado em cães com ou sem sintomas da doença (LAURENTI et al., 2009).

A prevalência da infecção canina em áreas endêmicas pode ser superior a 50%, enquanto somente cerca de 03 a 10% dos cães acometidos desenvolvem quadro clínico, demonstrando que a maioria dos animais infectados não apresenta sintomas, dificultando o diagnóstico (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

Características individuais ou biológicas, tais como a idade e o sexo, podem ser um fator de risco para a infecção por *Leishmania* spp. em cães. Contudo, diversos estudos não puderam comprovar uma predisposição sexual para a doença canina (FRANÇA-SILVA et al., 2003; AZEVEDO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010; SILVA et al., 2010; COURA-VITAL et al., 2011; SHANG et al., 2011; CORTES et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012), contrapondo-se a outros ensaios que verificaram maior predisposição em machos (DANTAS-TORRES et al., 2006; JULIÃO et al., 2007; MIRANDA et al., 2008).

A LV pode acometer animais de qualquer idade, entretanto, a enfermidade em cães caracteriza-se por ocorrer de forma bimodal. O primeiro pico pode ocorrer em animais com faixa etária menor que três anos, e o segundo ocorre entre oito e dez anos de idade (PALTRINIERI et al., 2010). Provavelmente o desenvolvimento da doença na idade precoce está relacionado a predisposição genética levando a uma resposta imunológica deficiente, enquanto o segundo pico pode refletir uma infecção precoce em um momento em que o animal apresentava resposta imune predominantemente celular, que foi alterada com a idade, geralmente devido à ocorrência de comorbidades. Outra explicação seria a de que a infectividade em cães adultos ou mais velhos esteja associada ao maior tempo de exposição aos vetores

(ZIVICNJAK et al., 2005; SHANG et al., 2011).

No que concerne ao tamanho do animal, acredita-se que os cães de raças grandes e gigantes são mais susceptíveis a enfermidade por apresentarem maior superfície corporal, o que os torna mais vulneráveis à picada dos flebotomíneos (GÁLVEZ et al., 2010).

Quanto ao padrão racial, teoricamente cães de qualquer raça podem ser acometidos por LV, contudo, parece existir uma predisposição em cães das raças Boxer, Rottweiler, Cocker Spaniel e Pastor Alemão (FRANÇA-SILVA et al., 2003; MIRANDA et al., 2008; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012). Além disso, cães da raça Ibizian Hound apresentam uma resposta predominantemente celular contra o parasita, sendo mais resistentes ao desenvolvimento de sinais clínicos da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2000).

A infecção por *Leishmania infantum chagasi* nesses animais causa, na maioria das vezes, uma doença sistêmica crônica, que apresenta manifestações clínicas inespecíficas e similares as dos seres humanos (BANETH et al., 2008; VIDES et al., 2009; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012). Contudo, a alta prevalência de cães assintomáticos sugere que estes animais mantém o ciclo de transmissão da LV na mesma proporção, ou até em proporção superior aos cães sintomáticos (DANTAS-TORRES et al., 2006; LAURENTI et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2012). Segundo Laurenti et al. (2009), por meio da técnica de xenodiagnóstico, o parasita foi encontrado em 42% e 27% das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas em cães sem e com sintomas de LV, respectivamente.

O diagnóstico clínico da LVC torna-se, muitas vezes, um desafio para o médico veterinário, tanto pela grande variedade de sinais clínicos da doença como pela grande porcentagem de cães assintomáticos (FERRER et al., 1995). Desta forma, torna-se necessário a utilização de métodos complementares de diagnóstico, tais como o imunológico, o parasitológico e/ou molecular (FEITOSA et al., 2000; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; MARCONDES et al., 2011).

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp. no soro pode ser realizada por diferentes técnicas sorológicas tais como a imunofluorescência

indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), a imunocromatografia, entre outros (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

Até meados de novembro de 2011, os métodos de diagnóstico sorológico recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) para a rotina e inquéritos epidemiológicos em municípios com registro de LV eram o ELISA e a RIFI. Contudo, esses métodos estão sendo substituídos gradualmente pela utilização de um teste rápido de imunocromatografia (TR-DPP® - Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) como técnica de triagem e pelo ELISA como teste confirmatório da doença (BRASIL, 2014f).

De acordo com Santos-Gomes e Fonseca (2008) o ELISA apresenta sensibilidade e especificidade acima de 90%, porém, há inconveniência de detectar falsos positivos, por reações cruzadas com outros tripanossomatídeos.

O método parasitológico apresenta 100% de especificidade (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2006) e baixa sensibilidade (BRAGA et al., 1998; FERRER, 1999; ASHFORD, 2000), variando de 52% a 98%. Barrouin-Melo et al. (2006), utilizando esta técnica, identificaram amastigotas de *Leishmania* spp. em 83% de 180 cães soropositivos e 23% de 26 soronegativos. Entretanto, sua sensibilidade depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico colhido, do tempo de evolução da doença e da experiência do profissional que faz a leitura das lâminas (IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; LAURENTI, 2009).

Outra ferramenta muito útil no diagnóstico da LVC é o método molecular, por sua sensibilidade e especificidade, podendo ser aplicado diretamente sobre amostras clínicas e produzir resultado confiável em apenas algumas horas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que vem sendo utilizada com frequência no diagnóstico e monitoramento das leishmanioses. É capaz de detectar quantidades mínimas de DNA de *Leishmania* spp. em ampla variedade de amostras clínicas do homem, do cão, de reservatórios silvestres e de vetores. Esse método é considerado sensível e específico, segundo Gomes et al. (2008). A PCR tem apresentado maior sensibilidade quando comparada a métodos parasitológicos ou até mesmo sorológicos clássicos, sem necessidade de isolamento do parasito em cultura. A maioria dos estudos mostra que o método apresenta elevada sensibilidade (acima de 90%) e especificidade diagnóstica de até 100% (DISH et al., 2003).

Segundo Domingos (2012), o protocolo para o diagnóstico da LVC proposto pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (TR-DPP® e ELISA), aplicado em série apresenta boa concordância com o protocolo anterior (ELISA e RIFI), sem diferença significativa entre o uso de um ou de outro no número de animais infectados diagnosticados, bem como destaca o uso do TR-DPP® pela rapidez do resultado e dispensa de laboratório especializado. Contudo, Marcondes et al. (2013), comparando testes sorológicos, oficialmente adotados pelo Ministério da Saúde do Brasil, para o diagnóstico da LV em cães vacinados, concluíram que as técnicas podem reagir de forma cruzada por até seis meses após a primoprophilaxia e o animal pode se apresentar soropositivo erroneamente.

A sensibilidade desses testes é bastante discutível, não havendo concordância entre eles. Atribui-se essa discordância à incapacidade dos testes sorológicos detectarem anticorpos nas várias fases da doença. Tal fato apresenta sérias consequências, pois implica na morte de animais (CABRERA et al., 2003). Contudo, segundo a literatura pretérita a melhor forma de aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico é a realização combinada de dois testes (ALVES; BEVILACQUA, 2004). Caso ocorra discordância entre os resultados dessas metodologias, o mais indicado é considerar o quadro clínico do animal e repetir o exame após um mês, podendo ser realizado o exame parasitológico e/ou a PCR. Entretanto, resultados negativos nestas metodologias não devem ser usados como confirmatórios (ALVAR et al., 2004; BANETH; AROCH, 2008).

A leishmaniose canina é o protótipo de uma disfunção imunológica específica resultante do parasitismo do sistema mononuclear fagocitário pela *Leishmania* spp., produzindo um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas que pode ser categorizado em três formas distintas: na forma clínica assintomática não se observa presença de sinais clínicos sugestivos da doença, e os animais são aparentemente saudáveis e ativos, enquanto na forma clínica oligossintomática os animais podem apresentar sinais clínicos brandos, como por exemplo, perda moderada de peso, ulcerações cutâneas discretas que ocorrem frequentemente na ponta da orelha e em áreas periorbitais, alopecia localizada e algumas vezes, opacificação da pelagem (REIS et al., 2009). A forma clínica sintomática é caracterizada pela presença

de mais de três sinais clínicos graves da leishmaniose que se manifestam no decorrer da doença, como ulcerações cutâneas geralmente crostosas, onicogribose, dermatite furfurácea, ceratoconjuntivite, opacificação das córneas, intensa perda de peso que às vezes evolui para anorexia e caquexia, podendo evoluir até um progressivo estado geral de prostração e óbito, bem como o envolvimento osteoarticular (MANCIANTI et al., 1988).

O desenvolvimento de sinais clínicos inespecíficos e, muitas vezes, tardios contribui para o sub-diagnóstico da doença e transmissão do parasita no ambiente doméstico (OLIVEIRA et al., 2001; LOPES et al., 2010).

As manifestações clínicas da doença no cão e no homem são similares, e apresenta sinais inespecíficos, como febre regular por longos períodos, mucosa pálida e emaciação (FRASER, 1991; FEITOSA, 2006). A proliferação de linfócitos B, plasmócitos, histiócitos e macrófagos podem resultar em linfadenomegalia generalizada e hepatoesplenomegalia (NEVES, 2000).

As leishmanias também se multiplicam em macrófagos do fígado, produzindo uma hepatite ativa crônica e, ocasionalmente, hepatomegalia, vômitos, poliúria, polidipsia, anorexia e perda de peso. Alguns animais apresentam diarreia crônica e melena devido à presença de ulcerações de mucosa gástrica e intestinal. A enterite pode ser resultado de um dano parasitário direto ou consequência de uma insuficiência renal (LUVIZOTTO, 2006; TILLEY; SMITH, 2008).

Em muitos animais portadores de LV, verifica-se diminuição da atividade física, associada à osteoartropatias (SLAPPENDEL; FERRER, 1998). Os cães acometidos por LV podem apresentar manifestações clínicas como artralgia, cifose, claudicação, crepitação articular, edema de tecidos moles adjacente à articulação e relutância ao caminhar, devido à presença de neuralgia, osteomielites, poliartrite, polimiosite e sinovite (WOLSCHRIJN et al., 1996; VAMVAKIDIS et al., 2000; AGUT et al., 2003; SILVA et al., 2007; GOMES et al., 2009; PACIELLO et al., 2009; SILVA, 2009; SILVA et al., 2011; GOMES et al., 2012; SILVA et al., 2012a; SILVA et al., 2012b).

Diferentemente, muitos caninos acometidos pela LV são assintomáticos, no entanto, apresentam alterações nos exames complementares compatíveis de poliartrites (AGUT et al., 2003; SILVA, 2009) ou polimiopatias (VAMVAKIDIS et al., 2000; GOMES et al., 2009; GOMES et al., 2012). Em um estudo

realizado por Gomes et al. (2009), por meio da eletromiografia e histopatologia em músculos de 23 cães com LVC, sem evidências clínicas de distúrbios locomotores, 15 (65,22%) animais apresentaram polimiopatia e, outros seis (26,1%), lesões em músculos isolados. Neste ensaio, a imunoistoquímica confirmou a presença do parasita e de processo inflamatório em 19 (82,6%) dos 23 animais.

A incidência de afecções locomotoras, em áreas endêmicas para LV, pode chegar a 30% dos cães afetados (TURREL; POOL, 1982; YAMAGUCHI et al., 1983; SLAPPENDEL, 1988; WOLSCHRIJN et al., 1996; BURACCO et al., 1997). Agut et al. (2003) descreveram o acometimento em 44,8% (26/58) da população em estudo na Espanha. No Brasil comprovou-se o envolvimento em 38% dos cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi* (SILVA, 2009).

A poliartrite (PA) é uma artropatia inflamatória que envolve mais de uma articulação e é considerada uma condição incomum nos cães (FOURNEL et al., 1992). Os sinais clínicos relatados são variáveis e incluem relutância em caminhar, vocalização espontânea, rigidez articular, claudicação, crepitação, artrodinia, aumento de volume articular e incapacidade de ficar de pé ou andar. Às vezes, sinais sistêmicos como febre, inapetência, perda de peso e anorexia podem ser os únicos sinais (ROUSH et al., 1989; DUNN; DUNN, 1998).

Dependendo da sua origem, a PA pode ser classificada como uma doença infecciosa, induzida por depósito de cristal ou imunomediada (HOPPER, 1993; BENNETT; MAY, 1995).

As artrites infecciosas podem ser viral, bacteriana, micoplasma, protozoário ou fungo (BENNETT; MAY, 1995). Artrites induzidas por cristal são causadas pela deposição de cristais de urato de sódio (gota) ou cristais de pirofosfato de cálcio dihidratado (pseudo-gota) nas articulações (BENNETT; MAY, 1995). As poliartrites imunomediadas são resultantes da deposição e fagocitose de imunocomplexos, bem como a liberação de enzimas lisossomais circulantes no interior da membrana sinovial (hipersensibilidade tipo III) (HOPPER, 1993; BENNETT; MAY, 1995) ou ainda pela ação direta do parasita (McCONKEY et al., 2002). Perelló-Roso et al. (1996), descreveram, em humanos co-infectados por LV e pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), sinais clínicos osteoarticulares semelhantes aos observados nos cães.

Muitos agentes etiológicos podem causar poliartropatias, sendo estas classificadas em não inflamatórias e inflamatórias (FISHER, 2003; GREENE; BUDSBERG, 2006; EUGÊNIO et al., 2008; FERNANDES, 2009). Acredita-se que a poliartrite induzida por *Leishmania* spp. seja decorrente de uma reação inflamatória granulomatosa, causada pela presença de parasitos ou por uma resposta celular e humoral, à semelhança do que se observa em órgãos linfóides (McCONKEY et al., 2002; REIS et al., 2009; GIUNCHETTI et al., 2008a; GIUNCHETTI et al., 2008b) rins (COSTA et al., 2003), coração (FERRER, et al.; 1988), músculo estriado esquelético (FERRARO et al., 2009; GOMES, et al., 2009; PACIELLO et al., 2009; GOMES, et al., 2012) e tecido nervoso (MELO et al., 2009).

Estudos pretéritos sugerem que a patogenia da lesão articular em cães com LV é devido à liberação de citocinas por macrófagos infectados, levando à absorção e destruição da cartilagem óssea (FERRER, 1992), ou ao depósito de imunocomplexos circulantes na sinóvia (CUCINOTTA et al., 1991; FERRER, 1992). Estes podem produzir uma reação de hipersensibilidade tipo III, induzindo à uma ativação local de complemento e síntese de fatores quimiotáticos para neutrófilos (BENNETT; MAY, 1995). Os neutrófilos produzem enzimas hidrolíticas, que causam destruição articular, vasculite e aumento da permeabilidade vascular (GORMAN, 1995).

Quadros de PA como os da LV podem ser observados em outras doenças infecciosas, imuno-mediadas e autoimunes, tais como a erliquiose e a borreliose (JACQUES et al., 2002). Dependendo do agente, a PA pode apresentar-se como manifestação isolada ou vir acompanhada de sinais sistêmicos. Desta forma é de extrema importância que se faça um diagnóstico diferencial, principalmente em se tratando de suspeita de doenças infecciosas (BENNETT, 2005).

Apesar da grande variedade de sinais clínicos da leishmaniose, a doença canina pode permanecer clinicamente inaparente por longos períodos. Dependendo da fase da infecção, muitos cães infectados apresentam-se assintomáticos, mas mesmo assim são fontes de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, tem papel ativo na transmissão da *Leishmania* spp. (PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001). Apenas uma parcela dos cães infectados desenvolve a doença clínica, na dependência da

competência imunológica desses animais (MORENO; ALVAR, 2002). De acordo com Cardoso et al. (2007), os animais assintomáticos são a maioria na população canina infectada, representando relevante importância na epidemiologia da doença. Dessa forma, a avaliação dos animais assintomáticos é de fundamental importância em regiões endêmicas de LV, uma vez que estes não são identificados no exame clínico e algumas vezes, são indetectáveis pelos métodos sorológicos convencionais devido aos baixos títulos de anticorpos.

No que tange aos achados radiográficos, diferentes relatos têm descrito que as lesões osteoarticulares podem ser classificadas como erosivas (WOLSCHRIN et al., 1996; KOUTINAS et al., 1999; BLAVIER et al., 2001; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003) e não erosivas (SPRENG, 1993; KOUTINAS et al., 1999; AGUT et al., 2003), dependendo da evolução da doença e da resposta imune do animal. Alguns outros relatos afirmam que as lesões podem ocorrer de forma mista, ou seja, osteolítica e osteogênica concomitantemente (SILVA et al., 2007; SILVA, 2009; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012a; SILVA et al., 2012b).

As lesões podem se desenvolver em qualquer região óssea, incluindo a diáfise dos ossos longos, corpo de ossos irregulares (carpos e tarsos), patela, sesamóides, ossos chatos (pelve e escápula) e crânio, e geralmente desenvolvem-se bilateralmente, contudo geralmente são observadas nas regiões distais do esqueleto apendicular (Tabela 1) (SPRENG, 1993; BURACCO et al., 1997; AGUT et al., 2003; SILVA et al., 2007; SILVA, 2009; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012a; SILVA et al., 2012b).

TABELA 1. Localização das lesões osteoarticulares observadas radiograficamente em cães com leishmaniose.

Autores	Ossos afetados	Articulações afetadas
Tryphonas et al. (1977)	Não descrito	Coxofemoral e joelho
Turrel; Poll (1982)	Úmero, rádio, ulna, fíbula e tíbia	Carpal, joelho e tarsal
Slappendel (1988)	Úmero, ulna, tíbia e tarso	Tarsal
Cuccinotta et al. (1991)	Rádio e ulna	Carpal e tarsal
Spreng (1993)	Não descrito	Cotovelo, joelho e tarsal
Wolschrijn et al. (1996)	Úmero, rádio e ulna	Cotovelo
Buraco et al. (1997)	Rádio, ulna, metacarpo e tíbia	Carpal e tarsal
Koutinas et al. (1999)	Não descrito	Não descrito
Blavier et al. (2001)	Não descrito	Carpal e Tarsal
McConkey et al. (2002)	Carpo e tarso	Cotovelo, carpal, joelho e tarsal
Agut et al. (2003)	Úmero, rádio, ulna, metacarpo, falanges, fêmur, tíbia, fíbula e metatarso	Ombro, cotovelo, carpal, coxofemoral, joelho e tarsal
Souza et al. (2005)	Fêmur	Não descrito
Santos et al. (2006)	Não descrito	Tarsal
Silva et al. (2007)	Não descrito	Carpal e tarsal
Paraboni et al. (2008)	Não descrito	Carpal e tarsal
Cuomo et al. (2009)	Não descrito	Carpal, joelho e tarsal
Collignon et al. (2009)	Não descrito	Tarsal
Silva (2009)	Não descrito	Cotovelo, carpal, joelho e tarsal
Silva et al. (2011)	Não descrito	Cotovelo, carpal, joelho e tarsal
Hoffmann et al. (2012)	Não descrito	Carpal, joelho e tarsal
Silva et al. (2012a)	Não descrito	Carpal e tarsal
Silva et al. (2012b)	Não descrito	Cotovelo, carpal, coxofemoral, joelho e tarsal

Segundo a literatura compilada, os achados radiográficos incluem esclerose difusa ou localizada na medula óssea de ossos longos, podendo evoluir para uma reação periosteal, com ou sem a presença de áreas osteolíticas. O edema de tecidos moles geralmente acompanha as lesões intrarticulares e ósseas (FARROW, 2003; HOFFMANN et al., 2012). As lesões do tipo erosivas sugerem cronicidade do processo e a maioria das alterações radiográficas articulares não estão associadas à presença do parasito na sinóvia, sugerindo que a etiopatogenia das lesões articulares não é devida exclusivamente a presença do parasito, mas possivelmente à deposição de imunocomplexos na sinóvia (SILVA, 2009).

Ademais, outros sinais radiográficos osteoarticulares podem ser notados na LVC, tais como destruição da região cortical (TURREL; POOL, 1982; WOLSCHRIJN et al., 1996; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003), aumento de opacidade medular (TURREL; POOL, 1982; BURACO et al., 1997; AGUT et al., 2003), diminuição de opacidade medular (AGUT et al., 2003), reação periosteal proliferativa (TURREL; POOL, 1982; BURACO et al., 1997; AGUT et al., 2003; SOUZA et al., 2005; SANTOS et al., 2006; SILVA et al.,

2007; HOFFMANN et al., 2012), osteólise (WOLSCHRIJN et al., 1996; BURACO et al., 1997; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; SOUZA et al., 2005; SILVA et al., 2007), colapso dos espaços articulares (McCONKEY et al., 2002; SILVA et al., 2007; HOFFMANN et al., 2012) e edema de partes moles (TURREL; POOL, 1982; WOLSCHRIJN et al., 1996; SPRENG, 1993; SANTOS et al., 2006; SILVA et al., 2007; HOFFMANN et al., 2012).

Também chamou atenção alguns relatos de literatura onde os pacientes acometidos pela doença não apresentaram alterações radiográficas ósseas dignas de nota, levando à acreditar que o tempo de evolução da enfermidade ainda não fora suficiente para se desenvolver, ou mesmo, não foi sensível à percepção radiográfica (SPRENG, 1993; JACQUES et al., 2002; EUGÊNIO et al., 2008; PARABONI et al., 2008).

Na Medicina Veterinária, poucos são os estudos avaliando o sistema osteoarticular em cães infectados por *Leishmania infantum chagasi*, por meio da tomografia computadorizada. Em um relato de caso apresentado por Silva et al. (2012a), em área endêmica para a doença, revelaram áreas de osteólise, com esclerose adjacente, formação de novo osso periosteal e densidade óssea heterogênea, por meio da TC.

Este método de diagnóstico seria de grande auxílio, uma vez que poderia caracterizar as lesões em animais positivos com ou sem sinais locomotores da doença, além de contribuir na identificação das lesões em humanos com poliartrites inflamatórias ou autoimunes causadas pela LV (AKERBLOM; SJÖSTRÖM, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Diante do exposto e das escassas e contraditórias informações sobre as lesões osteoarticulares associadas à LVC o presente projeto visa:

- Contribuir na detecção das alterações ocorridas em cães infectados por *Leishmania infantum chagasi*, por meio dos exames radiográficos digitais e tomográficos computadorizados.
- Auxiliar na caracterização das lesões em animais positivos, com ou sem sinais clínicos da doença, contribuindo na identificação das lesões causadas

pela *Leishmania infantum chagasi* e fornecer subsídios ao profissional da imagem para incluir a LV em seus diagnósticos diferenciais.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as articulações umeroradioulnares, radiocarpicametacárpicas, femurotibiopatellares e tibiotarsicametatarsicas por meio da radiografia digital e tomografia computadorizada, a fim de caracterizar o tipo, a frequência e a distribuição das lesões osteoarticulares, desde as mais sutis as grosseiras.
- Obter informações de alterações osteoarticulares, por meio de exames de imagens, que possam sugerir ao médico veterinário a suspeita de LV.
- Testar a sensibilidade da radiografia digital e tomografia computadorizada como ferramenta de diagnóstico complementar em casos de poliartrites associada à leishmaniose visceral canina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética animal

O presente estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *campus* Botucatu (FMVZ – UNESP – Botucatu), aprovado na reunião de 21 de maio de 2012, estando registrado sob o protocolo nº 159/2011-CEUA (Anexo 1).

4.2 Local e tempo de execução

O estudo foi realizado no município de Bauru, situado no interior do estado de São Paulo, Brasil, localizando a noroeste da capital do estado, tendo como coordenadas geográficas 22° 18' 50" de latitude e 40° 30' 1" de longitude, a 526 m de altitude, em relação ao nível do mar, nas dependências do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde de Bauru-SP, bem como no Setor de Diagnóstico por Imagem da FMVZ – UNESP – Botucatu, durante o período entre junho a agosto de 2013.

4.3 Animais utilizados

Foram utilizados 46 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi*, com idade superior a um ano, independente do sexo, raça e sinais clínicos, encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses de Bauru, durante o período compreendido de junho a agosto de 2013 (Apêndice 1). O diagnóstico de LV foi confirmado pelo exame citopatológico, realizado em preparados citológicos obtidos por meio de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodos, bem como pela presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp., quando do emprego das técnicas de imunocromatografia e ELISA.

4.4 Delineamento experimental

Inicialmente fora realizado o exame semiológico do aparelho locomotor, conforme descrito por Eugênio (2008), objetivando identificar possíveis alterações desse sistema. Sequencialmente, foram colhidas amostras biológicas de sangue e linfonodo dos animais, para fim de diagnóstico da LV, por meio das técnicas de flebocentese da veia jugular e CAAF de linfonodos. Para tanto, foi solicitada à autorização e assinatura do termo de consentimento livre esclarecido do chefe da Seção de Controle de Zoonoses (Anexo 2).

O diagnóstico da doença foi baseado nos resultados do teste de triagem imunocromatográfico para detecção de anticorpos específicos para *Leishmania infantum chagasi* em amostras de soro, bem como pelo ensaio sorológico imunoenzimático, para detecção de anticorpos anti-*Leishmania major like*, e/ou pela pesquisa de formas amastigotas do parasita por meio do exame citopatológico de linfonodos, sendo a positividade o fator de inclusão animal para a pesquisa.

Após a confirmação do diagnóstico da doença os cães receberam medicação pré-anestésica (MPA) com Acepromazina a 0,2%¹ (0,055 miligrama por quilo (mg/kg), via intravenosa (IV), seguida, de anestesia geral com Tiopental Sódico 1g² (15 mg/kg/IV) para realização da eutanásia. Posterior a esse procedimento, os caninos receberam aplicação de uma ampola de 10

¹ Acepran® 0,2% – Vetnil – Louveira, São Paulo, Brasil

² Thiopentax® 1g – Cristália – Itapira, São Paulo, Brasil

mililitros (mL) de Cloreto de Potássio a 19,1%³ (IV), em cumprimento ao Decreto nº. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devam ser submetidos a eutanásia. O método empregado seguiu as recomendações da Resolução nº. 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

Sequencialmente, foram colhidas amostras do esqueleto apendicular (membros torácicos e pélvicos), a fim de identificar, caracterizar e determinar as alterações osteoarticulares, por meio dos exames radiotomográficos.

Ao término das avaliações supracitadas, os resultados obtidos foram tabulados em planilhas eletrônicas e analisados estatisticamente.

4.5 Exame semiológico do aparelho locomotor

A investigação clínica foi realizada por meio de dados de resenha, inspeção visual criteriosa, palpação detalhada e a aplicação de testes locomotores específicos, conforme descrito por Eugênio (2008).

4.6 Colheita de sangue total

A colheita de sangue total foi realizada após assepsia local com polivinil pirrolidona iodo a 10%⁴ (PVP-I), em solução aquosa, contendo 1% de iodo ativo, por flebotomia da veia jugular, utilizando agulha hipodérmica⁵ de 0,70 x 25 milímetros (mm), acoplada a uma seringa hipodérmica⁶ de 10 mL. Obteve-se um volume mínimo de 10 mL, sendo a amostra imediatamente acondicionada em tubos coletores de sangue a vácuo 13 x 100 mm de sete mL⁷, contendo ativador de coágulo e gel, permitindo acelerar a coagulação do sangue e separar o soro da amostra, sendo a mesma delicadamente homogeneizada por inversão de 180°, entre cinco a oito vezes para evitar hemólise, e mantida em repouso na posição vertical por 30 minutos para reter o coágulo. Após a retração visível do coágulo, a amostra sofreu centrifugação a

³ Cloreto de potássio a 19,1% – Isofarma – Eusébio, Ceará, Brasil

⁴ Riodeine Dermo Suave Tópico – Rioquímica – São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

⁵ BD Precision Glide™ – Becton Dickinson – Curitiba, Paraná, Brasil

⁶ BD Plastipak™ – Becton Dickinson – Curitiba, Paraná, Brasil

⁷ Vacuplast – CRAL – Cotia, São Paulo, Brasil

1.465 g em macrocentrífuga⁸, durante 10 minutos, para melhor separação do soro. Esse, por sua vez, foi transferido para *ependorfes*⁹ e separado em duas alíquotas, por meio de pipetas automáticas¹⁰, e congeladas a - 20° C, até o momento do seu processamento.

4.7 Diagnóstico de *Leishmania* spp.

4.7.1 Exame imunocromatográfico

O teste rápido para a detecção da LVC foi realizado nas dependências do CCZ de Bauru-SP, sob a coordenação e supervisão da bióloga Nathalia Maria Salvadeo Fernandes Parizoto.

No cenário brasileiro atual, o Ministério Saúde adotou o teste imunocromatográfico¹¹ rápido de triagem para o diagnóstico da LVC, que emprega de uma lado, a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal, e de outro, antígenos recombinantes (rK26/rK39) específicos de *Leishmania* ligados a uma membrana de nitrocelulose, recentemente desenvolvido (GRIMALDI et al., 2012).

A princípio os testes rápidos qualitativos para a detecção de anticorpos para LVC foram avaliados quanto ao prazo de validade, integridade das embalagens e composição do *kit*.

As amostras de soro foram descongeladas, até ficarem a temperatura ambiente, antes de serem testadas. Na sequência as plataformas de testes foram desembaladas e identificadas, conforme o número amostral, bem como verificada a integridade de todos os componentes e a existência de duas linhas na janela de teste do suporte, sendo uma de cor azul e uma de cor verde, conformando a integridade do teste.

A alça coletora era encostada na amostra, até o seu preenchimento, em torno de cinco microlitros (µL) e, em seguida, colocada na posição vertical e em contato com a área de aplicação da amostra, na região do poço identificada na plataforma pelo número um (amostra + tampão). Certificado de que a amostra de soro migrou da alça para o local do teste, adicionaram-se duas gotas da

⁸ Macro Centrífuga Coleman 80-2 – Coleman – Santo André, São Paulo, Brasil

⁹ Tubo Eppendorf® 3810X standard – Eppendorf do Brasil – São Paulo, São Paulo, Brasil

¹⁰ Micropipeta Monocanal VF-1000 – Digipet – Curitiba, Paraná, Brasil

¹¹ TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

solução tampão no poço um e aguardávamos por cinco minutos. Após esse tempo, a linha azul (teste) e a verde (controle) da janela desapareciam, indicando a integridade do teste. Na sequência, colocaram-se quatro gotas do tampão no poço de número dois e temporizaram-se 10 minutos e, imediatamente, realizaram-se a leitura visual, colocando o suporte sobre uma superfície plana e em local bem iluminado, mantendo uma distância de aproximadamente 30-50 centímetros (cm) entre o suporte de teste e os olhos, observando a presença de linhas e anotando o resultado na plataforma.

Quando do resultado não reagente observava-se uma linha roxa/rosa na área de controle (C) e nenhuma linha na área teste (T). Este resultado sugeria a ausência de anticorpo para *Leishmania* na amostra, porém não excluía a possibilidade de infecção pelo parasita. Entretanto, quando o resultado demonstrava-se reagente detectava-se a presença de duas linhas roxa/rosa, sendo uma na área de C e outra na área de T. A intensidade da linha T variava de claro a muito escuro, conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a linha na área de teste pode ter aparência diferente da linha na área controle. O procedimento de leitura do teste foi realizado em no máximo 25 minutos, segundo recomendações do fabricante (BIO-MANGUINHOS, 2011).

4.7.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico da LVC foram realizados nas dependências do CCZ da Secretaria Municipal de Saúde de Bauru-SP, sob a coordenação e supervisão da bióloga Nathalia Maria Salvadeo Fernandes Parizoto.

O kit utilizado para a detecção de anticorpos contra *Leishmania major* *like*, para a realização dos exames de ELISA foi o EIE Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos¹², no qual inicialmente fora avaliado quanto ao prazo de validade e seus componentes. Em continuidade, os materiais do conjunto, armazenados em temperatura entre dois e oito graus °C, os soros controles e as *strips* sensibilizadas, estocados em temperatura de -20°C, bem como as amostras de soro congeladas a serem testadas, foram retiradas de sua temperatura de conservação, até ficar a temperatura ambiente, e retornada ao

¹² EIE® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

freezer logo após o uso. O conjugado apenas foi retirado de sua temperatura de conservação no momento da sua utilização e retornando para o congelador imediatamente após o seu uso.

Para preparação do diluente de amostras/conjugado levou-se em consideração o número amostral a ser testado, que na presente situação foram utilizadas cinco *strips* dupla sensibilizada, para realização de 81 reações imunoenzimáticas. Para tanto, foram utilizados 12 mL de diluente de amostras, 1,2 gramas (g) de lectina de leite e 48 mL de água destilada. Posteriormente, diluíram-se em tubos *ependorfs* cinco μ L dos controles e das amostras de soro a serem analisadas, onde previamente foram homogeneizadas em 500 μ L do diluente de amostra/conjugada (1:100).

Para realização da distribuição das amostras nas placas, previamente sensibilizadas, utilizaram-se 100 μ L dos controles e amostras já diluídos, seguindo a seguinte ordem: na coluna um, fileiras A e B, o controle positivo (CP); nas C, D e E, o controle negativo (CN); em F e G, sem soro (SS), o controle do conjugado. Nos demais orifícios, distribuíram-se 100 μ L das amostras testes, já diluídas nos poços correspondentes. Após esse momento, as *strips* foram seladas com folha adesiva e incubadas em estufa¹³ a 37°C por 30 minutos, observando se houve variação significativa da temperatura.

Foram preparados 500 mL de solução tampão de lavagem, utilizando 25 mL de tampão de lavagem e 475 mL de água destilada, sendo a mesma colocada no frasco de enxágue da lavadora automática de microplacas¹⁴. Após os 30 minutos de incubação, as amostras foram retiradas da estufa e a folha adesiva foi descolada cuidadosamente para acondicionar a placa na lavadora automática. O processamento de lavagem consistiu em aspirar e lavar os poços seis vezes com o tampão (200 μ L/orifício), aguardando entre 30 a 60 segundos entre cada processamento. Na sequência foi diluído o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente, sendo utilizados 15 mL de diluente de amostras/conjugado diluído e 15 μ L de conjugado, homogeneizado bem e distribuídos 100 μ L da diluição em cada orifício dos *strips*, sendo os mesmos novamente selados com a folha adesiva e incubado

¹³ Estufa microprocessada digital de secagem Q310M3 – Quimis – Diadema, São Paulo, Brasil

¹⁴ Lavadora automática de microplacas TP-Washer – ThermoPlate – Mainland, China

por 30 minutos a 37°C. Passado o tempo necessário as amostras foram novamente lavadas, conforme descrito anteriormente.

Nesse momento foi preparado o substrato em frasco escuro, protegido da luz, sendo utilizados 10 mL de diluente do substrato, 100 µL de cromógeno tetrametilbenzidina dihidroclorada (TMB) e 20 µL de substrato H₂O₂, onde posteriormente eram adicionados 100 µL do mesmo em cada poço da placa, deixando por 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Para bloquear a reação, após o tempo supracitado, foram adicionados 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios e, em seguida, realizada a leitura da placa através da espectrofotometria. Para tanto, a moldura com os *strips* foi colocada na leitora de microplacas¹⁵, equipada com filtro de 450 nm para leitura, onde a mesma foi ligada alguns minutos antes para estabilização do feixe de luz, depois o equipamento foi zerado sem a presença da placa e, em seguida, o estojo foi acondicionado no local de leitura e iniciava-se a espectrofotometria, sendo os resultados expressos pela média da densidade ótica (DO) obtida dos soros em duplicata.

Como controle positivo de cada reação utilizou-se soro de dois cães parasitologicamente positivos com elevados títulos de anticorpos anti-*Leishmania major like*, provenientes do município de Bauru, São Paulo e, como controle negativo, utilizou-se o soro de três cães provenientes de área não endêmica para a doença.

O *cut-off* ou ponto de corte (0,134) da reação foi estabelecido utilizando-se a média das densidades óticas dos controles negativos (XCN), dentro da faixa de validação do teste (controle positivo $\geq 0,500$ de DO e controle negativo $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO), vezes dois, através da fórmula:

CO = XCN x 2

A amostra foi considerada reagente quando apresentava DO $\geq$ ao CO. Quando a amostra apresentava DO inferior ao CO foi considerada não reagente. Ademais, a amostra pode ser considerada indeterminada quando

¹⁵ Leitora automática de microplacas de 96 poços TP-Reader – ThermoPlate – Mainland, China

apresentar valores da DO entre o CO e a faixa cinza (FC), que é determinada pela multiplicação do CO por 1,2, por meio da fórmula:

$FC = CO \times 1,2$
--

4.7.3 Exame citopatológico de linfonodo

Os exames citopatológicos foram realizados após a aspiração por agulha fina dos linfonodos poplíteos e pré-escapulares, na dependência de aumento de volume dos mesmos e da facilidade de punção de acordo com o animal, com o auxílio de uma seringa descartável de polietileno de 10 mL¹⁶, acoplada à uma agulha hipodérmica descartável, com espessura e comprimento de 0,70 x 25 mm¹⁷, exercendo vácuo para a aspiração do material a ser colhido. Após esse procedimento, realizou-se o esfregaço do material aspirado em lâminas de vidro para microscopia¹⁸. Este foi seco ao ar e corados com corante hematológico Panótico Rápido¹⁹, sendo acondicionados em laminário e posteriormente foram avaliados à microscopia de luz²⁰ no aumento de 100x, com imersão²¹, para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

4.8 Exame radiográfico digital

Para a realização dos exames radiográficos foi utilizada uma unidade radiológica fixa DR-F de raios-X²², com gerador de alta frequência com capacidade de 500 miliamperes (mA) e 150 quilovoltagem (kVp) e tempo de exposição de 0,05 a 5 segundos (s).

Para as avaliações das articulações umeroradiolunares, radiocarpometacarpais, femorotibioapatelares e tibiotarsometatarsais foram utilizadas duas incidências radiográficas, realizadas em ângulo reto uma em relação a outra, em posições padronizadas (Figura 5), obedecendo-se as normas de proteção radiológica (KEALY; McALLISTER, 2005). Para tanto, as

¹⁶ BD Plastipak™ – Becton Dickinson – Curitiba, Paraná, Brasil

¹⁷ BD Precision Glide™ – Becton Dickinson – Curitiba, Paraná, Brasil

¹⁸ Lâmina lapidada para microscopia – Perfecta – São Paulo, São Paulo, Brasil

¹⁹ Panótico Rápido LB – Laborclin – Pinhais, Paraná, Brasil

²⁰ Microscópio Binocular Nikon E200 – Nikon – Melville, New York, EUA

²¹ Óleo de imersão para microscopia – Merck KGaA – Darmstadt, Alemanha

²² Digital-ready Room (DR-R) – GE Healthcare – Beijing, China

peças do esqueleto apendicular foram previamente descongeladas a temperatura ambiente para melhor manipulação e posicionamento.

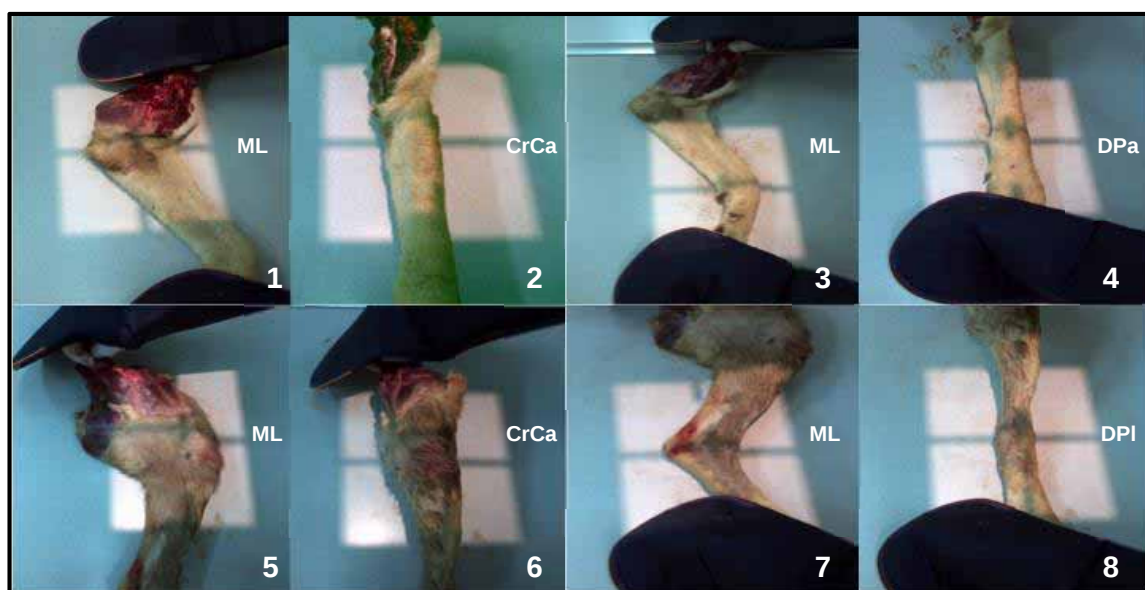


FIGURA 5. Posicionamentos radiográficos adotados conforme a articulação em estudo: umeroradiulnar (1 e 2), radiocarpicametacárpica (3 e 4), femurotibiopatelar (5 e 6) e tibiotarsicametatarsica (7 e 8). Incidências médio-lateral (ML), crânio-caudal (CrCa), dorso-palmar (DPa), dorso-plantar (DPI).

Foram estudadas oito articulações de cada animal, sendo as umeroradiulnares, radiocarpicametacárpicas, femurotibiopatelares e tibiotarsicametatarsicas, onde a técnica radiográfica utilizada foi a que relaciona mAs e kVp, de acordo com a espessura da região a ser radiografada, preconizada por De Martin; Iwasaki (1976). As imagens radiográficas foram identificadas quanto ao número de registro do animal, à espécie, à raça, à idade, ao posicionamento e à lateralidade (direito - R e esquerdo - L). O processamento radiográfico foi feito de forma digital.

Para a avaliação das articulações dos cotovelos e dos joelhos foram realizadas as incidências craniocaudal (CrCa) e mediolateral (ML). Para as articulações radiocarpicametacárpicas fizeram-se as projeções dorsopalmar (DPa) e ML e para as articulações tibiotarsicametatarsicas utilizaram-se as incidências dorsoplantar (DPI) e ML. Posteriormente os exames radiográficos foram analisados com o auxílio de um software de diagnóstico por imagem digital para tratamento de imagens médicas²³.

²³ eFilm Workstation™ Brazil Version 3.3.5 – Microdata Tecnologia – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

As análises radiográficas do esqueleto apendicular foram baseadas em um processo básico seguindo as seguintes etapas: detecção, descrição, diferenciação e diagnóstico das lesões, determinando a extensão e o acometimento de tecidos moles adjacentes, conforme descrito por Ferrel; Clifford; Thrall (2010).

4.9 Exame tomográfico computadorizado

Para a avaliação por meio da tomografia computadorizada (TC) foram utilizadas as mesmas peças anatômicas e regiões estudadas no exame radiográfico supracitado. Para tanto, os membros foram posicionados em paralelo com a mesa, sobre um apoio acolchoado, e colocados de forma estendidas e paralelos um em relação ao outro (Figura 6).

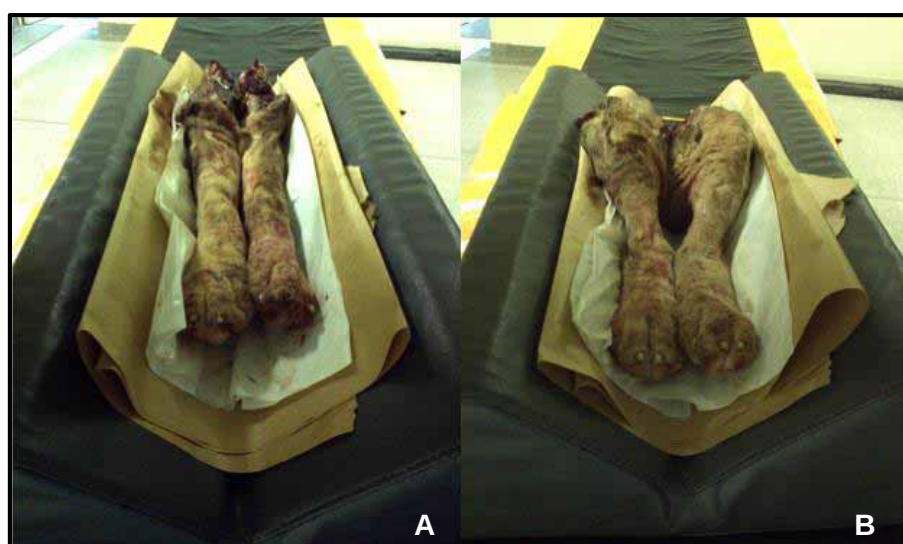


FIGURA 6. Posicionamento dos membros torácicos (A) e pélvicos (B) para realização do exame por tomografia computadorizada.

Utilizou-se equipamento de TC helicoidal²⁴ (FIGURA 7) com fator de exposição de radiação pré-determinado em 120 mA e 120 kVp, com filtro leve e *pitch* de 2,0 mm. Inicialmente foi feito o *scout* para visualização do correto posicionamento e determinação do tamanho da área das articulações a serem avaliadas, ou seja, o campo de visão (*Field of view* - FOV), para então dar início ao escanograma com cortes transversais de 2 mm de espessura por 2 mm de intervalo (2x2). Nas articulações que apresentavam achados radiográficos dignos de nota, foram utilizados cortes com incremento de 1x1

²⁴ Shimadzu SCT-7800TC CT Scanner – Shimadzu Corporation – Nakagyo-ku, Kyoto, Japan

mm, com o intuito de diminuir os artefatos de técnica e permitir melhor reconstrução 3D. As imagens foram reconstruídas em MPR com cortes sagitais e dorsais em janela óssea (WW3500, WL800).



FIGURA 7. Equipamento de tomografia computadorizada helicoidal.

Para documentação do trabalho, as imagens foram primariamente salvas no HD interno do aparelho de TC e, posteriormente, repassadas para um disco rígido portátil²⁵. As imagens tomográficas foram avaliadas com o auxílio de software de diagnóstico por imagem digital para tratamento de imagens médicas²⁶.

4.10 Análise estatística

Para realização da análise estatística descritiva os resultados foram tabulados em planilha eletrônica²⁷ para a obtenção das frequências absoluta (f_i) e relativa (%), bem como a comparação e distribuição, quanto ao diagnóstico de *Leishmania* spp., variáveis clínicas, radiográficas e tomográficas, de acordo com os resultados, características e comportamento das variáveis.

A priori foram verificadas as frequências, a fim de se obter os valores totais (f_i) e percentuais (%) dos animais positivos para a doença por meio dos

²⁵ HX-M101TCB/G – Samsung/Seagate – Cupertino, California, Estados Unidos da América

²⁶ OsiriX MD – OsiriX Imaging Software – Genebra, Suíça

²⁷ Microsoft® Office Excel®: Mac 2011 Versão 14.3.1 – Microsoft Corporation – Redmond, WA, USA

exames imunocromatográfico, ELISA e citopatológico. De forma similar, testaram-se as variáveis sexo, raça, faixa etária e sinais clínicos ortopédicos.

No que concerne aos exames radiográficos (RX) e tomográficos (TC), primeiramente foram feitas as análises descritivas quanto as frequências, a distribuição, caracterização e ocorrência das lesões.

Comparou-se a presença das lesões entre os animais sintomáticos e assintomáticos para cada tipo de lesão, articulação e procedimento através do teste Exato de Fisher ($p = 0,05$).

5. RESULTADOS

Para a realização do presente estudo foram avaliados 46 cães infectados por *Leishmania infantum chagasi*, onde o diagnóstico da doença foi firmado por meio da positividade em pelo menos um dos três testes realizados (Figura 8), sendo 95,65% dos soros dos animais reagentes ao teste de imunocromatografia (Figura 9A), 97,82% dos soros dos caninos com resultados acima do ponto de corte ($cut-off \geq 0,132$) pelo ensaio imunoenzimático indireto e 95,65% das amostras de tecido linfóide evidenciaram-se celularidade abundante, reação linfohistioplasmocitária, presença moderada de corpúsculos linfoglandulares e formas típicas de *Leishmania* spp., no interior de macrófagos (Figura 9B). Os valores individuais das sorologias e citopatologias de cada animal/teste encontram-se apresentados no Apêndice 2.

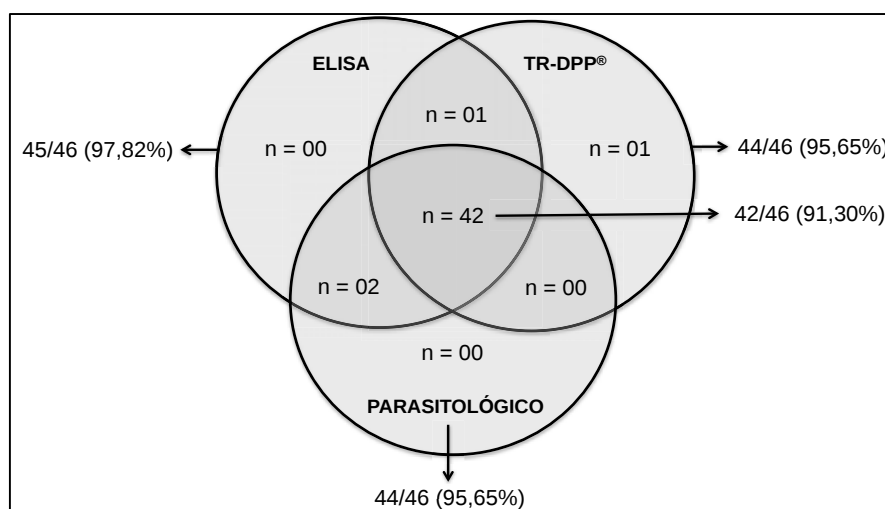


Figura 8. Sensibilidade dos testes sorológicos de ELISA e TR-DPP®, e parasitológico direto em amostras biológicas de 46 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

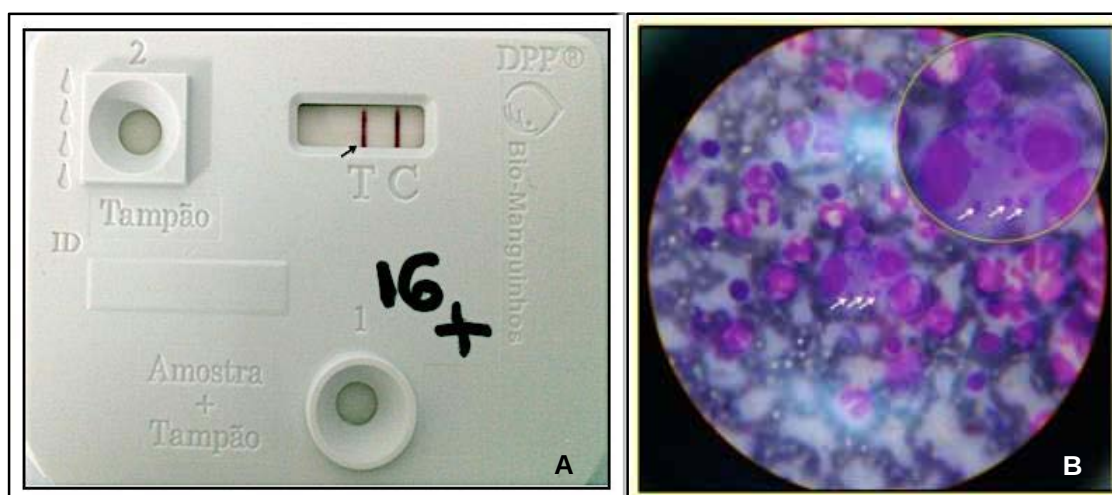


FIGURA 9. A. Avaliação imunocromatográfica reagente para leishmaniose visceral canina (seta preta), por meio do teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos. **B.** Avaliação citológica de linfonodo de cão, acometido por leishmaniose visceral. Presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior de macrófagos (setas brancas). Panótico rápido®, 400X.

Na população canina avaliada, a relação entre fêmeas e machos foi de 1:1. Não se observou predisposição racial, sendo 78,26% composta por cães sem raça definida. No que tange a idade, essa variou de um ano a 12 anos, com média de 3,8 anos e mediana de três anos. As principais características da população avaliada encontram-se apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2. Distribuição das frequências absoluta (*fi*) e relativa (%) conforme as variáveis: sexo, raça e faixa etária de 46 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Variável	Categoria	Número	Percentagem
Sexo	Fêmea	23	50,00%
	Macho	23	50,00%
Raça	*SRD	36	78,26%
	American Pit Bull Terrier	3	6,52%
	Poodle	2	4,34%
	Pastor Alemão	2	4,34%
	Cocker Spaniel	1	2,18%
	Maltês	1	2,18%
	Chow Chow	1	2,18%
Faixa etária	1 a 3 anos	27	58,70%
	4 a 7 anos	15	32,61%
	8 a 10 anos	3	6,52%
	≥ 11 anos	1	2,17%

*Sem raça definida

No presente estudo, 32,60% (15/46) dos animais, manifestaram alterações clínicas do sistema locomotor (Figura 10), sendo mais frequente a observação de rigidez articular, claudicação, edema de tecidos moles adjacentes à articulação, dor articular a palpação, impotência funcional e crepitação (Figura 11). Por vezes, a frequência da ocorrência de mais de um sinal pôde ser notada em um mesmo animal concomitantemente (Tabela 3).



FIGURA 10. Apresentação clínica de cão infectado por *Leishmania infantum chagasi*, demonstrando edema de partes moles adjacente à articulação radiocarpicametacárpica (setas).

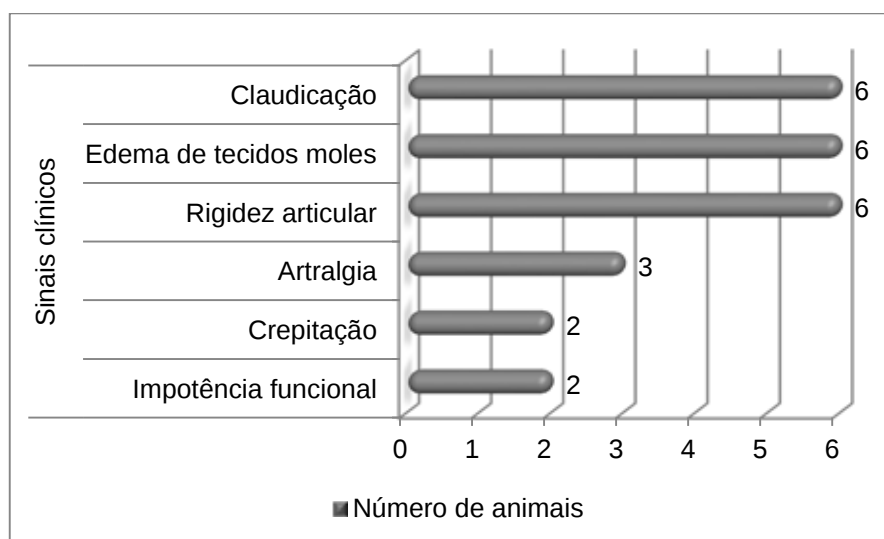


FIGURA 11. Frequência absoluta (*fi*) dos achados clínicos ortopédicos em cães com leishmaniose visceral.

TABELA 3. Frequência absoluta (fi) dos achados clínicos ortopédicos de acordo com o animal e o tipo de lesão de 15 cães com leishmaniose visceral.

Variável	Sinais clínicos						Total/Animal
	Claudicação	Artralgia	Aumento de tecidos moles	Impotência funcional	Rigidez articular	Crepitação articular	
Animal 4	0	0	1	0	0	0	1
Animal 5	0	1	1	0	1	0	3
Animal 7	1	1	1	0	0	0	3
Animal 9	1	0	0	0	0	0	1
Animal 15	1	0	0	0	0	1	2
Animal 16	1	1	1	0	0	0	3
Animal 24	0	0	0	0	0	1	1
Animal 28	0	0	1	0	1	0	2
Animal 32	0	0	0	0	1	0	1
Animal 33	0	0	0	0	1	0	1
Animal 38	0	0	0	0	1	0	1
Animal 44	1	0	0	1	0	0	2
Animal 46	0	0	1	0	0	0	1
Animal 48	0	0	0	0	1	0	1
Animal 49	1	0	0	1	0	0	2
Total/Lesão	6	3	6	2	6	2	

*0 = ausência; 1 = presença

As lesões ósseas e articulares sugestivas de osteoartrite foram detectadas por meio do exame radiográfico digital em 67,4% (31/46) dos cães. Ademais, as alterações radiográficas puderam ser visualizadas tanto em cães sintomáticos, como naqueles assintomáticos (Tabela 4).

TABELA 4. Frequências absoluta (fi) e relativa (%) dos achados radiográficos em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com presença e ausência de sinais clínicos ortopédicos.

Variável	Categoria	Número	Porcentagem	Lesão osteoarticular	
				Presente	Ausente
Sinal clínico	Presente	15	32,60%	11 (73,33%)	4 (26,77%)
	Ausente	31	67,40%	20 (64,52%)	11 (35,48%)
Total		46	100,00%	31	15

As alterações radiográficas foram caracterizadas por trabeculado ósseo em evidência, esclerose óssea, osteólise, lesões ósseas mistas (osteolíticas e proliferativas), aumento de volume de tecido moles adjacente às articulações (edema) e outras (colapso articular, proliferação óssea, osteófito e cisto ósseo) (Tabela 5), de acordo com as articulações em estudo (Figuras 12 e 13).

As articulações tibiotarsicometatarsicas foram afetadas em 29 delas, as radiocarpicametacarpicas em 21, as umeroradioulnares em sete e as femurotibiofibulares em duas, havendo uma tendência para o envolvimento bilateral (Figura 14).

TABELA 5. Frequência absoluta (fi), distribuição e caracterização das lesões radiográficas em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Variável	Categoria	Caracterização da lesão radiográfica					
		Trabeculado ósseo evidente		Esclerose subcondral	Osteólise	Osteólise e proliferação óssea	Edema de tecidos moles
Cotovelo	Ausência	39	44	43	46	46	45
	Direita	0	0	0	0	0	0
	Esquerda	0	0	1	0	0	1
	Ambas	7	2	2	0	0	0
Total		7	2	3	0	0	1
Carpal	Ausência	25	29	38	43	45	44
	Direita	0	0	0	0	0	2
	Esquerda	1	0	0	0	0	0
	Ambas	20	17	8	3	1	0
Total		21	17	8	3	1	2
Joelho	Ausência	45	45	45	46	46	46
	Direita	0	0	0	0	0	0
	Esquerda	0	0	0	0	0	0
	Ambas	1	1	1	0	0	0
Total		1	1	1	0	0	0
Tarsal	Ausência	18	22	35	41	41	44
	Direita	0	1	0	2	0	0
	Esquerda	0	0	0	0	0	0
	Ambas	28	23	11	3	5	2
Total		28	24	11	5	5	2

*Outros corresponde: colapso articular (n=3), proliferação óssea (n=2), osteófito (n=1) e cisto ósseo (n=1).



FIGURA 12. Imagens radiográficas digitais das articulações tibiotarsicametatarsais direita (A e B) e esquerda (C e D), em projeções dorso-plantar (A e C) e médio-lateral (B e D), de um cão naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A e D. Trabeculado ósseo evidente (setas); B. Proliferação óssea (seta); C. Edema de partes moles (setas).



FIGURA 13. Imagens radiográficas digitais das articulações radiocarpicametacárpicas esquerda (A) e direita (D), umeroradioulnar esquerda (B) e femurotibiopatelar direita (C), em projeções dorso-palmar (A e D) e médio-lateral (B e C), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A. Osteólise (seta); B. Cisto ósseo (setas); C. Osteófito (seta); D. Colapso articular (setas).

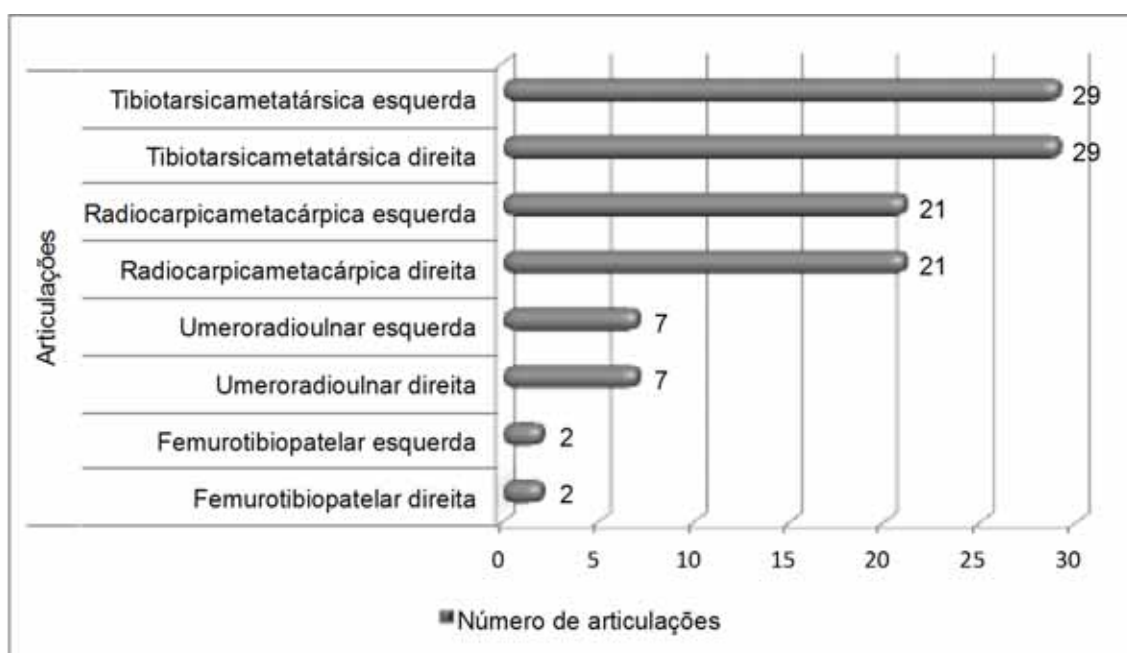


FIGURA 14. Ocorrência do envolvimento articular por meio do exame radiográfico em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Quando comparou a presença de lesões radiográficas entre os animais que manifestaram sinais clínicos ortopédicos entre aqueles com ausência dos mesmo, ou seja, sintomáticos e assintomáticos, por meio do teste Exato de Fisher, notou-se ausência de significância em todas as variáveis estudadas ($p > 0,05$). Ademais, lesão óssea mista (osteólise e proliferação) e edema de tecidos moles, na junção do cotovelo, bem como osteólise com proliferação óssea concomitante, edema de tecidos moles e outros, na articulação do joelho, não puderam ser testadas pela análise supracitada, tendo em vista que as mesmas não foram identificadas nas análises radiográficas, conforme demonstrado no Quadro 1.

QUADRO 1. Comparação do número de lesões radiográficas entre os animais sintomáticos e assintomáticos, por meio do teste Exato de Fisher, de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Variável	Sinais Clínicos	Sinais Radiográficos		p-valor
Cotovelo	Trabeculado ósseo evidente			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	27 (87,1%)	4 (12,9%)	0,67
	Presente (n=15)	12 (80,0%)	3 (20,0%)	
	Total (n=46)	39 (84,8%)	7 (15,2%)	
	Esclerose subcondral			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	31 (100,0%)	0 (0,0%)	0,10
	Presente (n=15)	13 (86,7%)	2 (13,3%)	
	Total (n=46)	44 (95,7%)	2 (4,3%)	
	Osteólise			
		Ausente	Presente	
Ausente (n=31)	31 (100,0%)	0 (0,0%)	0,33	
Presente (n=15)	12 (80,0%)	3 (20,0%)		
Total (n=46)	43 (93,5%)	3 (6,5%)		
Outros				
	Ausente	Presente		
Ausente (n=31)	31 (100,0%)	0 (0,0%)	0,33	
Presente (n=15)	14 (93,3)	1 (6,7%)		
Total (n=46)	45 (97,8%)	1 (2,2%)		
Carpal	Trabeculado ósseo evidente			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	19 (61,3%)	12 (38,7%)	0,22
	Presente (n=15)	6 (40,0%)	9 (60,0%)	
	Total (n=46)	25 (54,3%)	21 (45,7%)	
	Esclerose subcondral			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	20 (64,5%)	11 (35,5%)	1,00
	Presente (n=15)	9 (60,0%)	6 (40,0%)	
	Total (n=46)	29 (63,0%)	17 (37,0%)	
	Osteólise			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	26 (83,9%)	5 (16,1%)	1,00
	Presente (n=15)	12 (80,0%)	3 (20,0%)	
	Total (n=46)	38 (82,6%)	8 (17,4%)	
	Osteólise e proliferação óssea			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	29 (93,5%)	2 (6,5%)	1,00
Presente (n=15)	14 (93,3)	1 (6,7%)		
Total (n=46)	43 (93,5%)	3 (6,5%)		
Edema de tecidos moles				
	Ausente	Presente		
Ausente (n=31)	31 (100,0%)	0 (0,0%)	0,33	
Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)		
Total (n=46)	45 (97,8%)	1 (2,2%)		
Outros				
	Ausente	Presente		
Ausente (n=31)	31 (100,0%)	0 (0,0%)	0,10	
Presente (n=15)	13 (86,7%)	2 (13,3%)		
Total (n=46)	44 (95,7%)	2 (4,3%)		

Joelho	Trabeculado ósseo evidente			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	15 (100,0%)	0 (0,0%)	1,00
	Total (n=46)	45 (97,8%)	1 (2,2%)	
	Esclerose subcondral			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	1,00
	Total (n=46)	44 (95,7%)	2 (4,3%)	
Tarsal	Osteólise			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	1,00
	Total (n=46)	44 (95,7%)	2 (4,3%)	
	Trabeculado ósseo evidente			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	14 (45,2%)	17 (54,8%)	
	Presente (n=15)	4 (26,7%)	11 (73,3%)	0,34
	Total (n=46)	18 (39,1%)	28 (60,9%)	
	Esclerose subcondral			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	17 (54,8%)	14 (45,2%)	
	Presente (n=15)	5 (33,3%)	10 (66,7%)	0,22
	Total (n=46)	22 (47,8%)	24 (52,2%)	
	Osteólise			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	24 (77,4%)	7 (22,6%)	
	Presente (n=15)	10 (66,7%)	5 (33,3%)	0,49
	Total (n=46)	34 (73,9%)	12 (26,1%)	
	Osteólise e proliferação óssea			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	29 (93,5%)	2 (6,5%)	
	Presente (n=15)	12 (80,0%)	3 (20,0%)	0,31
	Total (n=46)	41 (89,1%)	5 (10,9%)	
	Edema de tecidos moles			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	29 (93,5%)	2 (6,5%)	
	Presente (n=15)	12 (80,0%)	3 (20,0%)	0,31
	Total (n=46)	41 (89,1%)	5 (10,9%)	
	Outros			
		Ausente	Presente	
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	1,00
	Total (n=46)	44 (95,7%)	2 (4,3%)	

No que concerne à avaliação tomográfica do esqueleto apendicular, tendo em vista as articulações distais de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, notou-se que 91,30% (42/46) dos animais apresentaram lesões osteoarticulares dignas de nota.

De forma similar à Roentgenologia, os achados por tomografia computadorizada também puderam ser visualizados nos cães com presença de sinais clínicos ortopédicos, bem como naqueles com ausência dos mesmos, conforme demonstrado na Tabela 6.

TABELA 6. Frequência absoluta (fi) e relativa (%) dos achados tomográficos em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com presença e ausência de sinais clínicos ortopédicos.

Variável	Categoria	Número	Porcentagem	Lesão osteoarticular	
				Presente	Ausente
Sinal clínico	Presente	15	32,60%	15 (100,00%)	0 (0,00%)
	Ausente	31	67,40%	27 (87,10%)	4 (12,90%)
Total		46	100,00%	42	4

Levando em consideração às análises tomográficas computadorizadas, foi possível identificar lesões osteoarticulares como trabeculado ósseo evidente, esclerose óssea, osteólise, lesões ósseas proliferativas, lesões ósseas osteolíticas e proliferativas em associação, edema de tecidos moles, osteófito, cistos ósseos, colapso articular e *flap* de cartilagem (Tabela 7), de acordo com as articulações em estudo (Figuras 15 e 16).

Por meio desta técnica imaginológica, pode-se observar que as articulações mais acometidas foram as tibiotarsicametatarsicas, seguidas das junções dos joelhos, radiocarpicametacarpicas e as dos cotovelos. Conforme demonstrado na Figura 17, pode-se perceber uma tendência para o acometimento osteoarticular bilateral.

TABELA 7. Frequência absoluta (f), distribuição e caracterização das lesões tomográficas em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Variável	Categoria	Caracterização da lesão tomográfica										
		Trabeculado ósseo evidente	Esclerose subcondral	Osteólise	Osteólise e proliferação óssea	Proliferação óssea	Edema de tecidos moles	Osteófito	Cisto	*Outros		
Cotovelo	Ausência	29	30	39	45	46	44	45	43	45	45	
	Direita	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
	Esquerda	2	0	2	0	0	1	0	2	0	1	
	Ambas	15	15	4	1	0	1	1	1	1	0	
Total		17	16	7	1	0	2	1	3	1	1	
Carpal	Ausência	35	22	44	44	42	45	46	46	46	46	
	Direita	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
	Esquerda	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Ambas	11	24	1	2	3	1	0	0	0	0	
Total		11	24	2	2	4	1	0	0	0	0	
Joelho	Ausência	20	34	41	43	43	46	40	40	45	45	
	Direita	0	0	3	0	2	0	4	0	0	0	
	Esquerda	1	1	0	1	0	0	1	5	1	1	
	Ambas	25	11	2	2	1	0	1	1	1	0	
Total		26	12	5	3	3	0	6	6	1	1	
Tarsal	Ausência	33	15	42	43	42	41	45	45	46	46	
	Direita	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
	Esquerda	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
	Ambas	13	31	2	3	4	4	1	0	0	0	
Total		13	31	4	3	4	5	1	1	1	0	

*Outros corresponde: colapso articular (n=1) e flap de cartilagem (n=1).

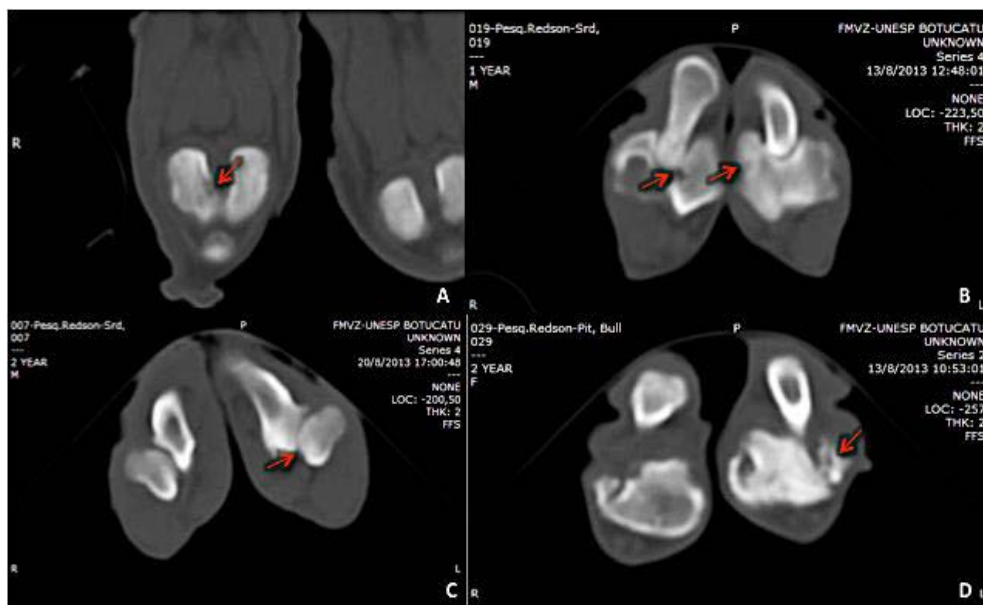


FIGURA 15. Imagens tomográficas digitais das articulações femurotibiopatelar (A), umeroradioulnar (B), radiocarpicametacárpica (C) e tibiotalaricametatarsica (D), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A. Osteólise (seta); B. Cistos ósseos (setas); C. Colapso articular (seta); D. proliferação óssea (seta).

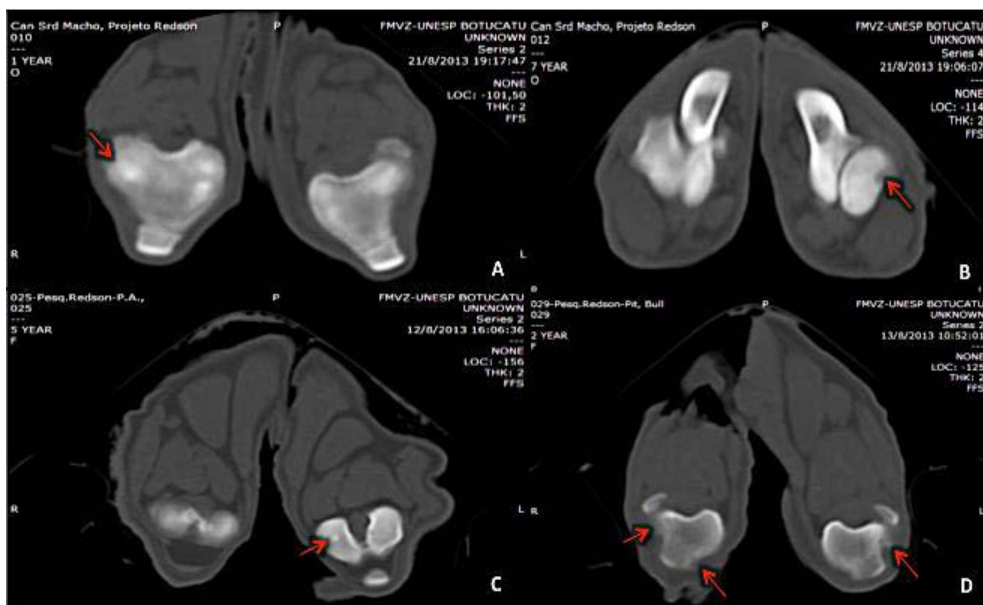


FIGURA 16. Imagens tomográficas digitais das articulações femurotibiopatelares (A, C e D) e tibiotalaricametatarsica (B), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A. Esclerose óssea (seta); B. Cisto ósseo (setas); C. flap de cartilagem (seta); D. Osteófitos (setas).

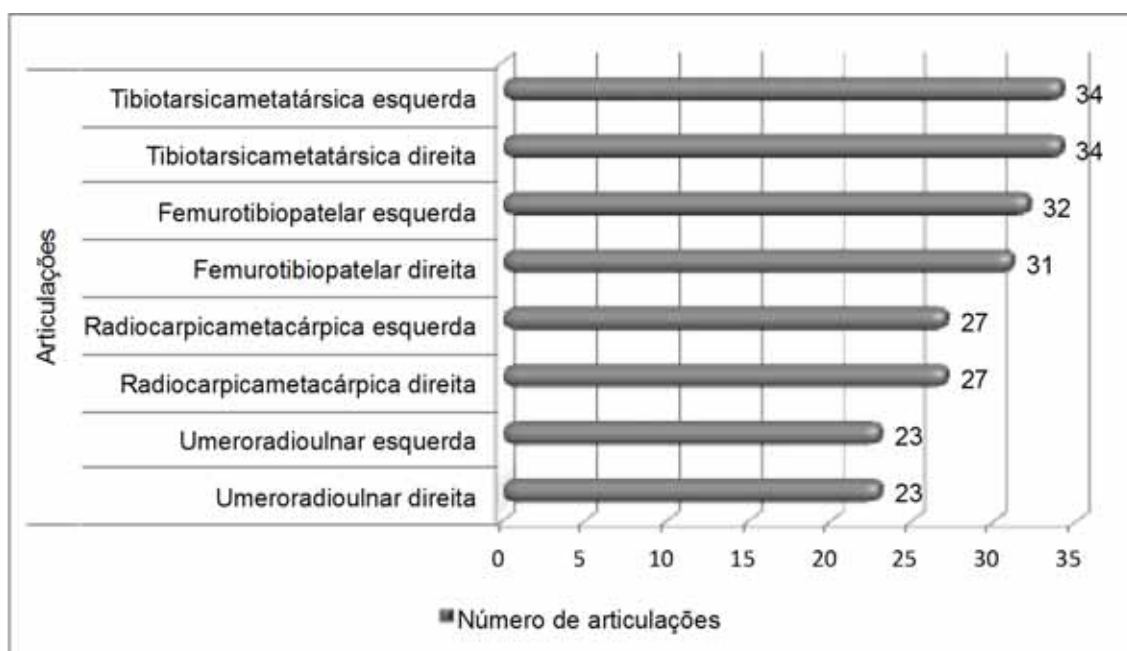


FIGURA 17. Ocorrência do envolvimento articular por meio do exame tomográfico em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Ao comparar estatisticamente a presença de lesões tomográficas computadorizadas entre os animais sintomáticos e assintomáticos, por meio do teste Exato de Fisher, para cada tipo de lesão por articulação, confirmou-se que não houve significância entre as variáveis estudadas ($p > 0,05$) (Quadro 2). Contudo, não foi observado a presença de proliferação óssea na articulação do cotovelo, osteófito, cisto e outros na juntura do carpo, edema de tecidos moles no joelho e outros na articulação tarsal.

QUADRO 2. Comparação do número de lesões tomográficas entre os animais sintomáticos e assintomáticos, por meio do teste Exato de Fisher, de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Variável	Sinais Clínicos	Sinais Tomográficos	p-valor
Cotovelo	Trabeculado ósseo evidente		
	Ausente (n=31)	Ausente 20 (64,5%) Presente 11 (35,5%)	
	Presente (n=15)	Ausente 9 (60,0%) Presente 6 (40,0%)	1,00
	Total (n=46)	Ausente 29 (63,0%) Presente 17 (37,0%)	
	Esclerose subcondral		
	Ausente (n=31)	Ausente 20 (64,5%) Presente 11 (35,5%)	
	Presente (n=15)	Ausente 10 (66,7%) Presente 5 (33,3%)	1,00
	Total (n=46)	Ausente 30 (65,2%) Presente 16 (34,8%)	
	Osteólise		
	Ausente (n=31)	Ausente 25 (80,6%) Presente 6 (19,4%)	
	Presente (n=15)	Ausente 14 (93,3%) Presente 1 (6,7%)	0,40
	Total (n=46)	Ausente 39 (84,8%) Presente 7 (15,2%)	
	Osteólise e proliferação óssea		
	Ausente (n=31)	Ausente 31 (100,0%) Presente 0 (0,0%)	
	Presente (n=15)	Ausente 14 (93,3%) Presente 1 (6,7%)	0,33
	Total (n=46)	Ausente 45 (97,8%) Presente 1 (2,2%)	
Carpal	Edema de tecidos moles		
	Ausente (n=31)	Ausente 30 (96,8%) Presente 1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	Ausente 14 (93,3%) Presente 1 (6,7%)	1,00
	Total (n=46)	Ausente 44 (95,7%) Presente 2 (4,3%)	
	Osteófito		
	Ausente (n=31)	Ausente 30 (96,8%) Presente 1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	Ausente 15 (100,0%) Presente 0 (0,0%)	1,00
	Total (n=46)	Ausente 45 (97,8%) Presente 1 (2,2%)	
	Cisto		
	Ausente (n=31)	Ausente 28 (90,3%) Presente 3 (9,7%)	
	Presente (n=15)	Ausente 15 (100,0%) Presente 0 (0,0%)	0,54
	Total (n=46)	Ausente 43 (93,5%) Presente 3 (6,5%)	
	Outros		
	Ausente (n=31)	Ausente 31 (100,0%) Presente 0 (0,0%)	
	Presente (n=15)	Ausente 14 (93,3%) Presente 1 (6,7%)	0,33
	Total (n=46)	Ausente 45 (97,8%) Presente 1 (2,2%)	
Carpal	Trabeculado ósseo evidente		
	Ausente (n=31)	Ausente 23 (74,2%) Presente 8 (25,8%)	
	Presente (n=15)	Ausente 12 (80,0%) Presente 3 (20,0%)	1,00
	Total (n=46)	Ausente 35 (76,1%) Presente 11 (23,9%)	
	Esclerose subcondral		
	Ausente (n=31)	Ausente 14 (45,2%) Presente 17 (54,8%)	
	Presente (n=15)	Ausente 8 (53,3%) Presente 7 (46,7%)	0,75
	Total (n=46)	Ausente 22 (47,8%) Presente 24 (52,2%)	
	Osteólise		
	Ausente (n=31)	Ausente 30 (96,8%) Presente 1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	Ausente 14 (93,3%) Presente 1 (6,7%)	1,00
	Total (n=46)	Ausente 44 (95,7%) Presente 2 (4,3%)	
	Osteólise e proliferação óssea		
	Ausente (n=31)	Ausente 29 (93,5%) Presente 2 (6,5%)	
	Presente (n=15)	Ausente 15 (100,0%) Presente 0 (0,0%)	1,00
	Total (n=46)	Ausente 44 (95,7%) Presente 2 (4,3%)	
	Proliferação óssea		
	Ausente (n=31)	Ausente 28 (90,3%) Presente 3 (9,7%)	
	Presente (n=15)	Ausente 14 (93,3%) Presente 1 (6,7%)	1,00
	Total (n=46)	Ausente 42 (91,3%) Presente 4 (8,7%)	
Carpal	Edema de tecidos moles		
	Ausente (n=31)	Ausente 31 (100,0%) Presente 0 (0,0%)	
	Presente (n=15)	Ausente 14 (93,3%) Presente 1 (6,7%)	0,33
	Total (n=46)	Ausente 45 (97,8%) Presente 1 (2,2%)	

Joelho	Trabeculado ósseo evidente			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	15 (100,0%)	0 (0,0%)	1,00
	Total (n=46)	45 (97,8%)	1 (2,2%)	
	Esclerose subcondral			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	0,72
	Total (n=46)	44 (95,7%)	2 (4,3%)	
	Osteólise			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	1,00
	Total (n=46)	44 (95,7%)	2 (4,3%)	
	Osteólise e proliferação óssea			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	31 (100,0%)	0 (0,0%)	
	Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	0,54
	Total (n=46)	45 (97,8%)	1 (2,2%)	
	Proliferação óssea			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	0,54
	Total (n=46)	44 (95,7%)	2 (4,3%)	
	Osteófito			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	15 (100,0%)	0 (0,0%)	0,65
	Total (n=46)	45 (97,8%)	1 (2,2%)	
	Cisto			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	28 (90,3%)	3 (9,7%)	
	Presente (n=15)	15 (100,0%)	0 (0,0%)	0,65
	Total (n=46)	43 (93,5%)	3 (6,5%)	
	Outros			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	28 (90,3%)	3 (9,7%)	
	Presente (n=15)	15 (100,0%)	0 (0,0%)	1,00
	Total (n=46)	43 (93,5%)	3 (6,5%)	
Tarsal	Trabeculado ósseo evidente			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	21 (67,7%)	10 (32,3%)	
	Presente (n=15)	12 (80,0%)	3 (20,0%)	0,50
	Total (n=46)	33 (71,3%)	13 (28,3%)	
	Esclerose subcondral			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	10 (32,3%)	21 (67,7%)	
	Presente (n=15)	5 (33,3%)	10 (66,7%)	1,00
	Total (n=46)	15 (32,6%)	31 (67,4%)	
	Osteólise			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	28 (90,3%)	3 (9,7%)	
	Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	1,00
	Total (n=46)	42 (91,3%)	4 (8,7%)	
	Osteólise e proliferação óssea			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	29 (93,5%)	2 (6,5%)	
	Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	1,00
	Total (n=46)	43 (93,5%)	3 (6,5%)	
	Proliferação óssea			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	28 (90,3%)	3 (9,7%)	
	Presente (n=15)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	1,00
	Total (n=46)	42 (91,3%)	4 (8,7%)	
	Edema de tecidos moles			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	29 (93,5%)	2 (6,5%)	
	Presente (n=15)	12 (80,0%)	3 (20,0%)	0,31
	Total (n=46)	41 (89,1%)	5 (10,9%)	
	Osteófito			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	15 (100,0%)	0 (0,0%)	1,00
	Total (n=46)	45 (97,8%)	1 (2,2%)	
	Cisto			
	Ausente	Presente		
	Ausente (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	
	Presente (n=15)	15 (100,0%)	0 (0,0%)	1,00
	Total (n=46)	45 (97,8%)	1 (2,2%)	

6. DISCUSSÃO

A análise isolada dos testes sorológicos aplicados nas amostras dos cães no presente estudo apresentaram valores similares, bem como a sensibilidade por meio do teste parasitológico direto (Figura 8), demonstrando que os testes tiveram desempenhos equivalentes. Este fato pode estar associado a uma amostragem intencional, selecionando-se apenas cães do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e, portanto, com maior probabilidade de serem portadores de LV, tendo em vista que o fator de inclusão animal para o presente ensaio era a positividade para a doença em pelo menos um dos testes aplicados, ou seja, os animais soronegativos e/ou parasitologicamente negativos foram excluídos do grupo de estudo.

Apesar da resposta imune humoral heterogênea, que se desenvolve em cães infectados por *Leishmania* spp., que quase sempre envolve múltiplos antígenos que são reconhecidos de maneiras diferentes em indivíduos distintos e em vários estágios da doença no mesmo hospedeiro, sempre que possível, é preferível realizar testes em paralelo ou testes com múltiplos antígenos, para identificar um maior número de animais infectados, conforme relatado por Falqueto et al. (2009). Neste trabalho, ao associar os testes diagnósticos para LV, foi possível observar uma sensibilidade dos mesmos em 97,82%, 95,65% e 95,65%, nos exames de ELISA, TR-DPP e parasitológico direto, respectivamente. Ademais, dos 44 animais positivos no exame parasitológico, 91,3% (42/46) foram diagnosticados com LV, quando usados os três testes em paralelo (Figura 8).

Ainda que possa ocorrer diferenças no desempenho dos testes, provavelmente atribuíveis às concentrações de anticorpos e carga parasitária, que podem por sua vez estarem ligadas a diferentes padrões de idade, imunidade, estado nutricional do paciente ou diversidade do parasito, no presente estudo não se notou tal distinção. Acreditamos, que os valores obtidos no presente ensaio, sejam decorrentes dos diferentes padrões supracitados, tendo em vista que geralmente animais oriundos do CCZ apresentam-se em um estágio mais avançado da doença, imunossuprimidos e com escore corporal abaixo dos padrões de normalidade (magros a caquéticos). Finalmente, a representação dos valores percentuais no corrente estudo foi similar ao encontrado nos relatos para os testes sorológicos

(SANTOS-GOMES; FONSECA, 2008; DOMINGOS, 2012) e parasitológico (BRAGA et al., 1998; FERRER, 1999; ASHFORD, 2000; GONTIJO; MELO, 2004; BARROUIN-MELO et al., 2006; BRASIL, 2006).

Diversos estudos não verificaram predisposição sexual para a ocorrência de LV em cães (KOUTINAS et al., 1999; AGUT et al., 2003; FRANÇA-SILVA et al., 2003; SILVEIRA et al., 2012; GOMES, 2013), conforme observado no presente trabalho. No entanto, Slappendel (1988) relatou maior predisposição em machos, conforme firmado por Miranda et al. (2008).

Quanto a predisposição racial, 78,26% (36/46) dos cães avaliados não apresentavam raça definida, similar aos achados de Silva (2009). Entretanto, Koutinas et al. (1999), Sonoda (2007) e Agut et al. (2003) verificaram a ocorrência da doença em 69% e 66,7% e 55,7% dos cães de raças puras, respectivamente.

Teoricamente cães de qualquer raça podem ser acometidos por LV, porém, relata-se maior predisposição em caninos das raças Boxer, Rottweiler, Cocker spaniel e Pastor Alemão (AGUT et al., 2003; SONODA, 2007; MIRANDA et al., 2008; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012). Esses dados tornam-se conflitantes, uma vez que esses estudos foram realizados em hospitais escolas, o que pode ter influenciado no padrão racial dos animais, devido o poder aquisitivo dos proprietários. Já no presente estudo e no proposto por Silva (2009), os animais eram oriundos do CCZ, ou seja, uma população geralmente composta por cães errantes e de proprietários com baixo poder aquisitivo, consequentemente donos de caninos sem raça definida.

Na presente análise, houve uma predisposição etária para a ocorrência da doença nos caninos jovens, quando os mesmos foram subdivididos em dois grupos, entre um a três anos (58,70%) e entre oito e 10 anos de idade (6,52%). Apesar de a literatura afirmar que cães com menos de três anos e entre oito e dez anos apresentarem uma maior predisposição para adquirir a infecção (PALTRINIERI et al., 2010), não foi possível notar tal afirmação na corrente pesquisa. O presente resultado pode está associado ao fato de que os proprietários não conseguiam fornecer com precisão a idade dos animais, e a avaliação da arcada dentária nem sempre era possível ou fidedigna.

A população canina foi predominantemente composta por jovens (58,70%) e adultos (32,61%), ou seja, a maior parte dos animais apresentava

idade entre um a três anos e quatro a sete anos, confirmando os achados descritos por Slappedel (1988); Spreng (1993); McConkey et al. (2002); Agut et al. (2003); Collignon et al. (2009) e Silva (2009), que referem maior casuística em cães jovens-adultos.

Segundo Koutinas et al. (1999), parece haver ausência de predileção quanto à idade, o que reflete o longo período de incubação da *Leishmania infantum chagasi*, embora alguns relatos esporádicos apresentem cães acometidos pela doença com período de vida inferior a um ano (BURACCO, et al., 1997; SOUZA et al., 2005; SANTOS et al., 2006; PARABOBI et al., 2008). Dependendo da resistência do hospedeiro, os sinais clínicos se tornam evidentes dentro de um período de um mês a vários anos (SLAPPENDEL, 1988; KOUTINAS et al., 1999; CARDOSO et al., 2004; ROZE, 2005).

Cães jovens e adultos são mais afetados por PA associada à LV (HOPPER, 1993; BENNETT; MAY, 1995; JACQUES et al., 2002; SILVA, 2009; HOFFMANN et al., 2012). Relatos de PA em associação com a *Leishmania* spp. e imunossupressão em humanos com 32 anos de idade já foi descrito, encontrando-se o paciente em uma faixa etária jovem-adulto para a espécie (PERELLÓ-ROSO et al., 1996).

Animais com leishmaniose visceral apresentam sinais clínicos variados e inespecíficos (SLAPPENDEL, 1988). Embora as alterações ortopédicas sejam consideradas como incomuns em cães infectados por *Leishmania* spp. (KONTOS; KOUTINAS, 1993), o presente estudo demonstrou que 32,6% (15/46) dos animais portadores da doença apresentavam poliartrite, similar ao descrito por Turrel; Pool (1982), Slappendel (1988) e Silva (2009), em que os autores identificaram alterações articulares em 30%, 37,5% e 38% dos animais, respectivamente. Da mesma forma, Agut et al. (2003) observaram a presença de poliartrite em 44,8% dos cães com leishmaniose visceral. Frente a esses valores de frequências relativas, podemos afirmar que os distúrbios locomotores, associados a leishmaniose visceral, não são uma condição incomum na doença. Segundo Blavier et al. (2001), as lesões articulares podem ser causadas pela presença direta do parasita na sinóvia ou por meio da deposição de imunocomplexos na cápsula articular.

A presença de febre, claudicação e artrodinia foi frequentemente observada em cães com poliartrite, portadores de leishmaniose visceral

(ROUSH et al., 1989; BENNETT; MAY, 1995). No entanto, na presente pesquisa, apesar de identificar claudicação em 40% (6/15) e artralgia em 20% (3/15) dos cães avaliados, notou-se também, porém em menor frequência, edema de tecidos moles, rigidez articular, crepitação e impotência funcional dos membros, similar ao descrito em outros estudos (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 1997; AGUT et al., 2003; FONT et al., 2004; BANETH; AROCH, 2008; SILVA, 2009; HOFFMANN et al., 2012; SILVA et al., 2012a). Com base nesses achados, a leishmaniose visceral deve ser incluída no diagnóstico diferencial de distúrbios esqueléticos, associada com neuralgia, polimiosite, artralgia e poliartrite.

Quanto aos sinais radiográficos, 67,4% (31/46) dos animais apresentaram mudanças osteoarticulares sugestivas de poliartrite, associada a leishmaniose visceral. Tais modificações foram visualizadas tanto em cães sintomáticos (11/15), como naqueles assintomáticos (20/31), sendo as mesmas apresentadas de forma simétrica e bilateral. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Turrel; Pool (1982), Slappendel (1988), Buracco et al. (1997), Koutinas et al. (1999), Blavier et al. (2001), McConkey et al. (2002), Agut et al. (2003), Souza et al. (2005), Santos et al. (2006), Collignon et al. (2009), Silva (2009), Hoffmann et al. (2012).

Lesões ósseas e articulares têm sido frequentemente observadas em radiografias de cães infectados por *Leishmania* spp. (TRYPHONAS et al., 1977; TURREL; POOL, 1982; CUCINOTTA et al., 1991; SPRENG, 1993; WOLSCHRIJN et al., 1996; BURACCO et al., 1997; AGUT et al., 2003; SILVA, 2009), bem como nos seres humanos (PERELLÓ-ROSO et al., 1996). Curiosamente em alguns casos de leishmaniose visceral descritos, não foram notadas mudanças radiográficas significativas, provavelmente explicada pelos autores por não haverem tempo hábil para o desenvolvimento das mesmas de forma a serem sensíveis ao exame (SPRENG, 1993; JACQUES et al., 2002; EUGÊNIO et al., 2008; PARABONI et al., 2008).

Os achados de exames radiográficos mais comumente encontrados no corrente estudo foram: trabeculado ósseo grosseiro, esclerose óssea, osteólise, lesões ósseas mistas (osteólise e osteoproliferativa), edema de tecidos moles, colapso dos espaços interarticulares, proliferação óssea e cisto ósseo. Segundo a literatura compilada, no que tange aos achados radiológicos,

diferentes relatos descreveram a poliartrite por *Leishmania* spp. como sendo não-erosiva (SPRENG, 1993; KOUTINAS et al., 1999; AGUT et al., 2003) ou erosiva (WOLSCHRIN et al., 1996; KOUTINAS et al., 1999; BLAVIER et al., 2001; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003), similar aos achados do presente estudo. Entretanto, sinais radiográficos de osteólise e osteoproliferação também puderam ser notados concomitantemente em alguns animais. Desta forma, acredita-se que as lesões radiográficas em cães com poliartrite, associada à leishmaniose visceral, não apresentam um padrão típico ou patognomônico para a doença. Contudo, em caso de suspeita, indica-se a avaliação do membro contralateral, tendo em vista que, os achados de imagem apresentaram-se de forma simétrica e bilateral.

Além disso, pode-se confirmar que as articulações mais afetadas, nessa doença, foram as tarsais (29/46) e as carpais (21/46), corroborando com os relatos pretéritos (SLAPPENDEL, 1988; BURACCO et al., 1997; BLAVIER et al., 2001; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; SANTOS et al., 2006; CUOMO et al., 2009; COLLIGNON et al., 2009; HOFFMANN et al., 2012). Outrossim, tais achados foram encontrados em um paciente humano imunodeprimido descrito por Perelló-Roso et al. (1996).

Estudos prévios afirmam que as articulações carpais e tarsais são mais comumente afetadas em casos de poliartrites causadas por depósitos de imunocomplexos (HOPPER, 1993; BENNETT; MAY, 1995). Por sua vez, as articulações coxofemorais e do ombro são mais afetadas em pacientes com poliartrite infecciosa (HOPPER, 1993). No estudo apresentado, as articulações carpais e tarsais foram as mais afetadas, sugerindo que, geralmente, essas lesões advêm de um processo imunomediado.

Na presente pesquisa não foi possível observar diferença estatística ao comparar as lesões entre os animais sintomático e assintomáticos por meio do exame radiográfico, o que difere do proposto pelos autores da revisão, onde há maior ocorrência das lesões em caninos sintomáticos (CUCCINOTA et al., 1991; BURACCO et al., 1997; BLAVIER et al., 2001; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; SANTOS et al., 2006; SILVA et al., 2007; CUOMO et al., 2009; SILVA, 2009; HOFFMANN et al., 2012; SILVA et al., 2012a). Chamamos a atenção para esse achado, tendo em vista que caninos portadores de *Leishmania infantum chagasi*, mesmo assintomáticos, podem desenvolver

quadro clínico de poliartrite, seja pela circulação de imunocomplexos depositados sobre a membrana sinovial ou por uma reação inflamatória granulomatosa, causada pela presença do parasita.

No que concerne aos achados por tomografia computadorizada, 91,30% (42/46) dos animais apresentaram lesões osteoarticulares sugestivas de poliartrite, associada à infecção por *Leishmania infantum chagasi*, demonstrando maior sensibilidade dessa técnica imaginológica, quando comparada ao exame radiográfico. Até o presente momento, conforme revisão sistemática de literatura não foram relatados estudos sobre o esqueleto apendicular, por meio desse exame, em casos de leishmaniose visceral canina, sendo o presente ensaio considerado a primodescrição.

Por meio desta técnica, notadamente as alterações foram identificadas em 100% (15/15) dos animais sintomáticos, bem como em 87,10% (27/31) dos cães assintomáticos, sendo as mesmas apresentadas de forma simétrica e bilateral, similar aos achados radiográficos encontrados neste estudo e da literatura (TURREL; POOL, 1982; SLAPPENDEL, 1988; BURACCO et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; BLAVIER et al., 2001; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; SOUZA et al., 2005; SANTOS et al., 2006; COLLIGNON et al., 2009; SILVA, 2009; HOFFMANN et al., 2012). Frente a esses resultados, acredita-se que é preferível a avaliação por tomografia computadorizada ao exame radiográfico do esqueleto apendicular de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi*, baseado na maior sensibilidade dessa técnica imaginológica.

Pouco se sabe quanto a caracterização das lesões ósseas e articulares presentes em exames por tomografia computadorizada de cães com leishmaniose visceral, bem como nos seres humanos. Na corrente análise, observou-se a presença de trabeculado ósseo evidente, esclerose óssea, osteólise, lesões osteolíticas e proliferativas em associação, edema de tecidos moles, osteófitos, cistos ósseos e colapso articular, confirmando os achados da imagem radiográfica. Em adição, foi possível observar lesões osteogênicas e *flaps* de cartilagem. No que tange aos *flaps* articulares, acredita-se que os mesmos não foram diagnosticados por meio do exame radiográfico devido a sua composição cartilaginosa e apenas visualizados quando da sua mineralização.

Desta forma, pode-se notar que as alterações encontradas por meio do exame tomográfico computadorizado foram semelhantes às encontradas na literatura pretérita, no que tange a avaliação radiográfica de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (TURREL; POOL, 1982; SLAPPENDEL, 1988; BURACCO et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; BLAVIER et al., 2001; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; SOUZA et al., 2005; SANTOS et al., 2006; COLLIGNON et al., 2009; SILVA, 2009; HOFFMANN et al., 2012). Entretanto, foi possível perceber que a tomografia computadorizada proporcionou melhor definição do grau ou gravidade das lesões e como estavam acometidas as articulações, assim como, de forma similar aos achados radiográficos, por meio desta técnica também notamos ausência de sinais patognomônico para a doença e uma tendência para o acometimento osteoarticular bilateral.

Na presente avaliação, pode-se notar que as articulações mais acometidas foram as tarsais, seguidas das juntas do joelhos, carpais e cotovelos, diferindo dos achados radiográficos deste ensaio, onde as sindesmoses mais afetadas são as distais do esqueleto apendicular (tarsal e carpal). Entretanto, relatos de literatura apontam o envolvimento radiográfico da articulação do joelho na leishmaniose visceral canina (TRYPHONAS et al., 1977; TURREL; POLL, 1982; SPRENG, 1993; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; CUOMO et al., 2009; SILVA, 2009; SILVA et al., 2011; HOFFMANN et al., 2012; SILVA et al., 2012b).

Em relação à tomografia computadorizada, não houve diferença estatística entre os achados obtidos nas articulações de animais assintomáticos e com alterações locomotoras, similar aos resultados encontrados no exame radiográfico do presente estudo. Esses achados divergem dos obtidos na literatura prévia, onde propõe maior envolvimento radiográfico em cães sintomáticos (CUCCINOTA et al., 1991; BURACCO et al., 1997; BLAVIER et al., 2001; McCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; SANTOS et al., 2006; SILVA et al., 2007; CUOMO et al., 2009; SILVA, 2009; HOFFMANN et al., 2012; SILVA et al., 2012a). Contudo, não há estudos que comparem as alterações obtidas na tomografia computadorizada de cães com e sem sinais clínicos, portadores de leishmaniose visceral.

7. CONCLUSÕES

Diante do estudo conduzido em cães naturalmente portadores de leishmaniose visceral podemos concluir que:

- Os exames de tomografia computadorizada possibilitam uma identificação mais sensível dos sinais de alterações osteoarticulares quando comparados aos radiográficos, sendo os mesmos importantes ferramentas de diagnóstico complementar em casos de poliartrites associada à leishmaniose visceral canina.
- As alterações radiográficas e tomográficas de cães naturalmente infectados por *Leishmania infatum chagasi* apresentam-se simétricas e bilaterais, sendo as mesmas predominantemente distais, com ausência de padrão típico ou patognomônico.
- A poliartrite é condição frequente em pacientes acometidos por leishmaniose visceral canina.
- A leishmaniose visceral deve ser incluída no diagnóstico diferencial de poliartrite, mesmo na ausência dos sinais clínicos clássicos da doença, sendo importante que os médicos veterinários considerem as manifestações clínicas atípicas, como as alterações osteoarticulares, em seu diagnóstico diferencial.
- As alterações ósteoarticulares podem ser observadas em exames de tomografia computadorizada e radiográfico, mesmo que o animal não apresente sintomatologia.

8. BIBLIOGRAFIA

AGUT, A.; CORZO, N.; MURCIANO, J.; LAREDO, F.G.; SOLER, M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs whit leishmaniasis. **Veterinary Record**, v.153, n.21, p.648-652, 2003.

AKERBLOM, S.; SJÖSTRÖM, L. Evaluation of clinical, radiographical and cytological findings compared to arthroscopic findings in shoulder joint lameness in the dog. **Veterinary and Comparative Orthopedics and Traumatology**, v.20, n.2, p.136-141, 2007.

ALMEIDA, A.B.P.F.; MENDONÇA, A.J.; SOUSA, V.R.F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1610-1615, 2010.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1-88, 2004.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX P.; CANO J.; JANNIN, J.; BOER, M.D.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v.7, n.5, p.1-12, 2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v.22, n.12, p.552-557, 2006.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.H. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, p.259-265, 2004.

ANTONIALLI, S.A.C.; TORRES, T.G.; PARANHOS FILHO, A.C.; TOLEZANO, J.E. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brasil. **Journal of Infection**, v.54, n.5, p.509-514, 2007.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonosis. **International Journal of Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1269-1281, 2000.

AZEVEDO, M.A.; DIAS, A.K.; PAULA, H.B.; PERRI, S.H.V.; NUNES, C.M. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, estado do Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.3, p.123-127, 2008.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **Veterinary Journal**, v.175, n.1, p.14-15, 2008.

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

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. cap.73, p.735-748.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.28, n.7, p.329-337, 2006.

BARBOSA, D.S.; ROCHA, A.L.; SANTANA, A.A.; SOUZA, C.S.F.; DIAS, R.A.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; ABREU-SILVA, A.L. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.3, p.653-659, 2010.

BARROUIN-MELO, S.M.; LARANJEIRA, D.F.; ANDRADE FILHO, F.A.; TRIGO, J.; JULIÃO, F.S.; FRANKE, C.R.; AGUIAR, P.H.P.; DOS-SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v.171, n.2, p.331-339, 2006.

BENNETT, D. Immune – mediated and infective arthritis. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 6.ed. St. Louis: Elsevier, 2005. v.2, cap. 278, p.1958-1962.

BENNETT, D.B.; MAY, C. Joint diseases of dogs and cats. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal medicine**. 4.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 1995. p.2032-2077.

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

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v.162, n.2, p.108-120, 2001.

BRAGA, M.D.M.; COELHO, I.C.B; POMPEU, M.M.L; EVANS, T.G.; MacAULLIFE, I.T.; TEIXEIRA, M.J.; LIMA, J.W.O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.5, p.419- 424, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose Visceral - Sistema de Informações de Agravos e Notificação – Sinan Net**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.de>>. Acesso em: 21 fev. 2014, 2014e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica nº 48/2011 – CGDT/DEVIT/SVS/MS – Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_48_2011_diagnostico_lvc_19_9_2011.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2014, 2014f.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Letalidade de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. Brasília, DF, [s.n.], 2000-2010**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_letalidade_05_09_11.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2014, 2014c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Óbitos de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. Brasília, DF, [s.n.], 1990-2010.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CASOS_CONF_2010LV.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2014, 2014d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. Brasília, DF, [s.n.], 1990-2010.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2014, 2014a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral, Brasília.** 1. ed., 120 p., 2006.

BURACCO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, R.; MORELLO, E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with leishmania donovani infection in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.38, n.1, p.29-30, 1997.

CABRERA, M.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.; MARZOCHI, M.C.; XAVIER, S.C.; DA SILVA, A.V.; JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n.2, p.79-83, 2003.

CARDOSO, L.; RODRIGUES, M.; SANTOS, H.; SCHOONE, G.J.; CARRETA, P.; VAREJÃO, E.; van BENTHEM, B.; AFONSO, M.O.; ALVES-PIRES, C.; SEMIÃO-SANTOS, S.J.; RODRIGUES, J.; SCHALLIG, H.D. Sero-epidemiological study of canine Leishmania spp. infection in the municipality of Alijó. **Veterinary Parasitology**, v.121, n.1-2, p.21-32, 2004.

CARDOSO, L.; SCHALLIG, H.D.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; CABRAL, M.; ALUNDA, J.M.; RODRIGUES, M. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.117, n.1-2, p.35-41, 2007.

CEPAGRI (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura). **Bauru.** Disponível em: <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_068.html>. Acesso em: 06 fev. 2014.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

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

COLLIGNON, C.; ZAHRA, A.; GUENEGO, L.; GAUTIER, R.; MADELENAT, A. Polyarthrititis associated to leishmanianis in a young dog. **Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie**, n.44, v.1, p.27-34, 2009.

CORTES, S.; VAZ, Y.; NEVES, R.; MAIA, C.; CARDOSO, L.; CAMPINO, L. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean. **Veterinary Parasitology**, v.189, n.2-4, p.189-196, 2012.

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

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; REIS, L.E.S.; BRAGA, S.L.; MORAIS, M.H.F.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.8, p.1-10, 2011.

CUCINOTTA, G.; IANNELLI, N.; MUSICÒ, M.; LOMBARDO, N. Singolare forma di leishmaniosi: lesioni osteo-articolari bilaterali del carpo e del tarso in un cane. **Praxis Veterinaria**, v.12, n.3, p.12-14, 1991.

CUOMO, A.; VALERII, V.; GALDO, A.; MACOLINO, A.; PIERANTOZZI, M. Rheumatoid like arthritis in canine leishmaniasis: clinical and radiographic findings. In: SOCIETÀ ITALIANA DI CHIRURGIA VETERINARIA (SICV), XVI CONGRESSO NAZIONALE SICV, 2009, Parma, Italia, **Atti...** Parma, 2009.

CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”). **Leishmaniose Visceral Americana Humana – Números de casos por município LPI. Nota técnica de 20 dez. 2011.** Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_leishvis.html>. Acesso em 21 fev. 2014.

DANTAS-TORRES, F.; de BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.140, n.1-2, p.54–60, 2006.

DE MARTIN, B.W.; IWASAKI, M. **Noções de radiodiagnóstico veterinário.** São Paulo: [s.n.], 1976. 50 p.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.27, n.5, p.305-318, 2004.

DISH, J.; MACIEL, F.C.; OLIVEIRA, M.C.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.97, n.4, p.391-395, 2003.

DOMINGOS, I.H. **Teste rápido TR-DPP® no contexto do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina.** 2012. 86f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

DUNN, K.J.; DUNN, J.K. Diagnostic investigations in 101 dogs with pyrexia of unknown origin. **Journal Small Animal Practice**, v.39, n.12, p.574-580, 1998.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Monitoramento por Satélite, São Paulo.** Disponível em:<<http://www.urbanizacao.cnpm.embrapa.br/conteudo/uf/sp.html>>. Acesso em: 06 fev. 2014.

EUGÊNIO, F.R. Semiologia do sistema locomotor de cães e gatos. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária a arte do diagnóstico.** 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. cap.11, p.553-579.

EUGÊNIO, F.R.; SILVA, A.A.L.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V.; LIMA, V.M.F.; BONELLO, F.L. Estudo clínico-laboratorial das articulações na leishmaniose experimental em cães. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.2, p.278-287, 2008.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PORROZZI, R.; COSTA, M.V.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPO-NETO, A.; GRIMALDI, G.JR. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, n.4, p.559-565, 2009.

FARROW, C.S. Miscellaneous Extremity Disorders. In: _____. **Veterinary diagnostic imaging: the dog and cat**. 1.ed. St. Louis: Mosby, 2003. cap.9, p.180-181.

FEITOSA, M.M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. COLÉGIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 1; 2006, Jaboticabal, São Paulo, **Anais...** Jaboticabal, 2006.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, ano V, n.28, p.36-44, 2000.

FERNANDES, P.J. Análise de líquido sinovial. In: CROWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. 3.ed. São Paulo: MedVet, 2009. p.193-209.

FERRARO, G.C.; MACHADO, G.F.; BUENO DE CAMARGO, M.H.; SIMÕES, C.B.; VIEIRA, C.M.; COSTA, D.C.; GOMES, A.A.D.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Histopathological evaluation of the skeletal muscle of dogs with visceral leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE (ACVIN) FORUM, 2009, Montreal, **Proceedings...** Montreal, 2009.

FERRARO, G.C.; MACHADO, G.F.; LAURENTI, M.D.; BUENO DE CAMARGO, M.H.; GOMES, A.A.D.; COSTA, D.C.; VIEIRA, C.M.; SIMÕES, C.B.; LIMA, V.M.F.; MARCONDES, M. Alterações eletromiográficas e histopatológicas da musculatura de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.49, n.5, p.404-413, 2012.

FERREL, E.A; CLIFFORD, R.B; THRALL, D.E. Paradigmas de interpretação para o esqueleto apendicular. In: THRALL, D.E. **Diagnóstico de radiologia veterinária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap.13, p.222-239.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999. **Proceedings...** International Canine Leishmaniasis Forum, 1999. p.6-10.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **Current veterinary therapy: small animal practice**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p.266-270.

FERRER, L. RABANAL, R.M.; DOMINGO, M.; RAMOS, J.A.; FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research in Veterinary Science**, v.44, n.2, p.194-196, 1988.

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v.136, n.20, p.514-516, 1995.

FISHER, D.J. Sistema musculoesquelético. In: RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2003. cap.12, p.265-268.

FONT, A.; MASCORT, J.; ALTIMIRA, J.; CLOSA, J.M.; VILAFRANCA, M. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.45, n.4, p.199-201, 2004.

FOURNEL, C.; CHABANNE, L.; MONIER, J.C.L. Polyarthrites des carnivores. **Encyclopédie Vétérinaire**, p.13, 1992.

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais States, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.2-3, p.161-173, 2003.

FRASER, C.M. Leishmaniose visceral. **Manual Merck de Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Roca, 1991, p.366-367.

GÁLVEZ, R.; MIRÓ, G.; DESCALZO, M.A.; NIETO, J.; DADO, D.; MARTÍN, O.; CUBERO, E.; MOLINA, R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). **Veterinary Parasitology**, v.169, n.3-4, p.327-334, 2010.

GENARO, O.; MARQUES, M.J.; REIS, A.B.; SILVA, A.L.F.F.; MICHALICK, M.S.M.; COSTA, C.A.; MAYRING, W.; DIAS, M. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000, p.56-72.

GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.121, p.23-33, 2008a.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.84, p.269-277, 2008b.

GOMES, A.A.D. **Fatores de risco e análise espacial para a leishmaniose visceral no município de Juazeiro – Bahia - Brasil**. 2013. 120 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jabotical, 2013.

GOMES, A.A.D.; FERRARO, G.C.; LAURENTI, M.D.; BUENO DE CAMARGO, M.H.; COSTA, D.C.; SIMÕES, C.B.; VIEIRA, C.M.; VIDES, J.P.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Immunohistochemical evaluation of the skeletal muscle in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29 (Supl.), 2009.

GOMES, A.A.D.; LAURENTI, M.D.; FERRARO, G.C.; CAMARGO, M.H.B.; COSTA, D.C.; MACHADO, G.F.; PERRI, S.H.V.; MARCONDES, M. Subclinical muscle injuries in dogs infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.5, n.3, p.108-115, 2012.

GOMES, Y.M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v.175, n.1, p.45-52, 2008.

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

GORMAN, N.T. Immunology. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat**. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p.1978-2002.

GREENE, C.E.; BUDSBERG, S.C. Musculoskeletal infections. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2006. p.837-840.

GRIMALDI, G.JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; dos SANTOS, C.B.; PINTO, Id.; AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medecine Hygiene**, v.106, n.1, p.54–59, 2012.

HOFFMANN, A.R.; NAVARRO, I.T.; CAMARGO JUNIOR, V.E.; CALDART, E.T.; BREGANÓS, R.M.; PEREIRA, P.M. *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil – relato de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, suplemento 2, p.3265-3270, 2012.

HOPPER, P.E. Immune-mediated joint diseases. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 2.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 1993. p.1928-1937.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Censo Demográfico 2010: Resultado da amostra**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?codmun=350600&search=sao-paulo|bauru>>. Acesso em: 06 fev. 2014a.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Produto Interno Bruto a preços correntes e Produto Interno Bruto per capita segundo as Grandes Regiões, as Unidades da Federação e os municípios – 2005-2009**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pibmunicipios/2005_2009/tabelas_pdf/tab01.pdf>. Acesso em: 06 fev. 2014b.

IKEDA-GARCIA, F.A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano XI, n.62, p.32-38, 2006.

JACQUES, D.; CAUZINILLE, L., BOUVY, B.; DUPRE G. A retrospective study of 40 dogs with polyarthritis. **Veterinary Surgery**, v.31, n.5, p.428-434, 2002.

JULIÃO, F.S.; SOUZA, B.M.P.S; FREITAS, D.S.; OLIVEIRA, L.S.; LARANGEIRA, D.F.; DIAS-LIMA, A.G.; SOUZA, V.M.M.; BARROUIN-MELO, S.M.; JR MOREIRA, E.D.; PAULE, B.J.A.; FRANKE, C.R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.8, p.319-324, 2007.

KEALY, J.K.; McALLISTER, H. Bones and joints. In: KEALY, J.K.; McALLISTER, H. **Diagnostic radiology & ultrasonography of the dog and cat**. 4.ed. St. Louis: Elsevier, 2005. Cap. 4, p. 299.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old World Canine Leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education Small Animal**, v.15, n.7, p.949-959, 1993.

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

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.67, p.13-23, 2009.

LAURENTI, M.D.; MARCONDES, M.; ROSSI, C.N.; IKEDA-GARCIA, F.A.; TOMOKANE, T.Y.; RIZZARDI, R.L.; SECUNDINO, N.F.C.; PIMENTA, P.F.P.; CORBETT, C.E.P. Canine leishmaniasis: potential of symptomatic and asymptomatic dogs on the parasite transmissibility to the vector. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 14, 2009. **Anais...** Lucknow: Abstract Book WorldLeish4, 2009. p.271.

LOPES, E.G.P.; MAGALHÃES, D.F.; SILVA, J.A.; HADDAD, J.P.A.; MOREIRA, E.C. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte - MG, 1993-2007. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1062-1071, 2010.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.4, n.1, p.84-95, 1912.

LUVIZOTTO, M.C.R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. COLÉGIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 1; 2006, Jaboticabal, São Paulo, **Anais...** Jaboticabal, 2006.

MACHADO, J.G.; HOFFMANN, J.L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, ano XII, n.71, p.50-58, 2007.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, n.4, p.566-567, 1988.

MARCONDES, M; BIONDO, A.W.; GOMES, A.A.; SILVA, A.R.; VIEIRA, R.F.; CAMACHO, A.A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.175, n.1-2, p.15-19, 2011.

MARCONDES, M; LIMA, V.M.; ARAÚJO, M.F.; HIRAMOTO, R.M.; TOLEZANO, J.E.; VIEIRA, R.F.; BIONDO, A.W. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Veterinary Parasitology**, v.197, n.3-4, p.649-52, 2013.

McCONKEY, S.E. LÓPEZ, A.; SHAW, D.; CALDER, J. Leishmanial polyarthritis in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v.43, n.8, p.607-609, 2002.

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R.O.; MACHADO, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.162, n.3-4, p.248-256, 2009.

MICHALICK, M.S.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.67-83.

MIRANDA, S.; ROURA, X.; PICADO, A. FERRER, L.; RAMIS, A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. **Research in Veterinary Science**, v.85, n.1, p.35-38, 2008.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitology**, v.18, n.9, p. 399-405, 2002.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000. p.65.

OLIVEIRA, C.D.L.; ASSUNÇÃO, R.M.; REIS, I.A.; PROIETTI, F.A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, n.5, p.1231-1239, 2001.

PACHECO, R.A. A indústria em Bauru. **Vivendo Bauru**. Disponível em: <<http://www.vivendobauru.com.br/economia/segmentos/industria>>. Acesso em: 06 fev. 2014.

PACIELLO, O.; OLIVA, G.; GRADONI, L.; MANNA, L.; FOGLIA MANZILLO, V.; WOJCIK, S.; TRAPANI, F.; PAPPARELLA, S. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. **Neuromuscular Disorders**, v.19, n.2, p.124-130, 2009.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANCA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.5, p.510-7, 2001.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.36, n.11, p.1184-1191, 2010.

PARABONI, C.; FRANCO, P.A.; MATTEI, D.R. Poliartrite por leishmaniose visceral canina: relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (CONBRAVET), 2008, Gramado, Rio Grande do Sul. **Anais...** Gramado, 2008.

PERELLÓ-ROSO, A.; LÓPEZ-ALDEGUER, J.; GARCÍA-GASCÓ, P.; BLANES, M. Polyarthrititis caused by *Leishmania* in a patient with AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, n.6, p.1113-1116, 1996.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, n.1, p.229-235, 1994.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.128, n.1-3, p.87-95, 2009.

ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, v.2, n.2239, p.1401, 1903.

ROUSH, J.K.; MANLEY, P.A.; DUELAND, R.T. Rheumatoid arthritis subsequent to *Borrelia burgdorferi* infection in two dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.195, n.7, p.951-953, 1989.

ROZE, M. Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. **European Journal of Companion Animal practice**, v.15, p.39-52, 2005.

SANTOS-GOMES, G.M.; FONSECA, I.P. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 1. ed., v.1, 2008. 108 p.

SANTOS, M.; MARCOS, R.; ASSUNÇÃO, M.; MATOS, A.J.F. Polyarthrititis associatede with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. **Veterinary Parasitology**, v.141, n.3-4, p.340-344, 2006.

SHANG, Q.L.; PENG, W.; JIN, H.; XU, D.; ZHONG, N.; WANG, W.; WU, Y.; LIU, Q. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in Sichuan Province, southwester China detected by real time PCR. **Parasites & Vectors**, v.4, n.1, p.173-5, 2011.

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.5, p.577-579, 2006.

SILVA, A.R.S.; ROSSI, C.N.; GOMES, A.A.D.; VIEIRA, R.F.C.; IKEDA-GARCIA, F.A.; CIARLINI, P.C.; CIARLINI, L.D.R.P.; FEITOSA, M.M. Osteoartrite por *Leishmania* sp. em cão Pitt Bull – Relato de caso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.2, p.730-732, 2007.

SILVA, A.R.S. **Avaliação radiográfica das articulações dos membros locomotores de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no município de Araçatuba-SP**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

SILVA, A.R.S.; GOMES, A.A.D.; VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; MARCONDES, M.; LIMA, V.M.F.; CIARLINI, P.C.; CIARLINI, L.D.R.P. Lesões osteoarticulares em cães naturalmente acometidos por leishmaniose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA. 32., 2011, Goiânia, Goiás, **Anais...** Goiânia, 2011.

SILVA, A.R.S.; MAMPRIM, M.J.; ALMEIDA, B.F.M.; CIARLINI, P.C.; CIARLINI, L.D.R.P.; FERREIRA, W.L. Radiographic and tomographic aspects of osteoarticular lesions in dogs naturally affected visceral leishmaniasis. In: INTERNATIONAL VETERINARY RADIOLOGY ASSOCIATION MEETING & EVDI ANNUAL MEETING. 16., 2012, Bursa, Turquia. **Proceedings...** Bursa, 2012a.

SILVA, A.R.S.; ZULIM-LIMA, R.M.I.; MAMPRIM, M.J.; RAHAL, S.C.; CIARLINI, L.D.R.P. Osteomyelitis canine caused by *Leishmania* spp. In: EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY CONGRESS - ESVOT. 16., 2012, Bologna, Italy. **Proceedings...** Bologna, 2012b.

SILVA, F.T.S.; SANTOS, J.T.; NETTO, E.M.; BAVIA, M.E.; NAKATANI, M.; SOUZA, F.D.P.; CARDIMA, L.L.; CARNEIRO, D.D.M.T. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina no distrito de Monte Gordo, Camaçari (BA). **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.34, n.4, p.783-795, 2010.

SILVEIRA, F.T.; CARNEIRO, L.A.; RAMOS, P.K.; CHAGAS, E.J.; LIMA, L.V.; CAMPOS, M.B.; LAURENTTI, M.D.; GOMES, C.M.; CORBETT, C.E. A cross-sectional study of canine *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of specific IgG-antibody response than delayed-type hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. **Parasitology Research**, v.111, n.4, p.1513-1522, 2012.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. **The Veterinary Quarterly**, v.10, n.1, p.1-16, 1988.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1998. p.450-458.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian Hound presents a predominantly cellular immune response against natural leishmania infection. **Veterinary Parasitology**, v.90, n.1-2, p.37-45, 2000.

SONODA, M.C. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. 2007. 115p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SOUZA, A.I.; JULIANO, R.S.; GOMES, T.S.; DINIZ, S.A.; BORGES, A.M.; TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Veterinary Parasitology**, v.129, n.1-2, p.51-54, 2005.

SPRENG, D. Leishmanial polyarthritis in two dogs. **Journal Small Animal Practice**, v.34, n.11, p.559-563, 1993.

TILLEY, L.P.; SMITH JR, F.W.K. Leishmaniose. In: TILLEY, L.P.; SMITH JR, F.W.K. **Consulta Veterinária em 5 minutos – espécies canina e felina**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2008 p.1604.

TRYPHONAS, L.; ZAWIDZKA, Z.; BERNARD, M.A.; JANZEN, E.A. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.41, n.1, p.1–12, 1977.

TURREL, J.M.; POOL, R.R. Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Radiology**, v.23, n.6, p.243-249, 1982.

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

VIDES, J.P.; GOMES, A.A.D.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Clinical aspects from dogs naturally infected with visceral leishmaniasis in Araçatuba - São Paulo State (Brazil). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29 (Supl.), 2009.

WOLSCHRIJN, C.F.; MEYER, H.P.; HAZEWINKE, H.A.W.; WOLVEKAMP, W.Th.C. Destructive polyarthritis in a dog with leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.37, n.12, p.601, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Magnitude of the problem.** Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html>. Acesso em: 01 fev. 2014.

YAMAGUCHI, R.A.; FRENCH, T.W.; SIMPSON, G.F.; HARVEY, J.W. *Leishmania donovani* in the synovial fluid of a dog with visceral leishmaniasis. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.19, p.723-726, 1983.

ZIVICNJAK, T.; MARTINKOVIĆ, F.; MARINCULIĆ, A.; MRLJAK, V.; KUCER, N.; MATIJATKO, V.; MIHALJEVIĆ, Z.; BARIĆ-RAFAJ, R. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently health dogs in Croatia. **Veterinary Parasitology**, v.131, n.1-2, p.35-43, 2005.

ANEXOS

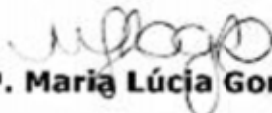
Anexo 1. Atestado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-UNESP-Botucatu, aprovando que a pesquisa apresenta-se em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"	 fmvz - unesp Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campus de Botucatu
--	---

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa **"Leishmaniose visceral canina: estudo imaginológico abdominal e do esqueleto apendicular em cães naturalmente infectados"**, Protocolo nº 159/2011-CEUA, de **Alexandre Redson Soares da Silva**, aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Doutorado, desta Faculdade, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 21 de maio de 2012.


Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a realização do projeto de pesquisa intitulado “Leishmaniose visceral canina: estudo imaginológico abdominal e do esqueleto apendicular em cães naturalmente infectados”, junto ao Centro de Controle de Zoonose do município de Bauru, São Paulo, Brasil.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente, doo e autorizo a realização dos procedimentos: colheita de sangue e urina; ultrassonografia abdominal; eutanásia; necropsia; colheita de fragmentos de rim, baço, fígado e esqueleto apendicular; radiografia e tomografia do esqueleto apendicular; sorologia para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina (ELISA e TR-DPP), referente ao Projeto de Pesquisa intitulado “Leishmaniose visceral canina: estudo imaginológico abdominal e do esqueleto apendicular em cães naturalmente infectados”, de responsabilidade da Profa. Adjunto Maria Jaqueline Mamprim e colaboração dos discentes Alexandre Redson Soares da Silva, Hugo Salvador Oliveira e Lidice Araújo Campos, de 50 (cinquenta) cães acometidos por leishmaniose visceral, apresentados ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde de Bauru, São Paulo, Brasil, na qualidade de responsável dessa instituição municipal.

Nome do Responsável: JOSE RODRIGUES GONCALVES NETO

RG: 10.346.836

CPF: 413.844.551-72

CRMV-SP: 6536

Data: 08 / 08 / 2013

Assinatura: _____

Assinatura manuscrita de José Rodrigues Gonçalves Neto
José Rodrigues Gonçalves Neto
Médico Veterinário - CRMV: 6536
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - campus Botucatu
Departamento de Fisiologia, Patologia Animal e Radiologia Veterinária
Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, SP. CEP: 13618-970.

APÊNDICES

Apêndice 1. Identificações individuais dos animais quanto a espécie, a raça, o sexo e a idade.

Animal	Espécie	Raça	Sexo	Idade (ano)
01	Canina	SRD*	Macho	03
02	Canina	SRD*	Macho	04
03	Canina	SRD*	Fêmea	01
04	Canina	Chow Chow	Macho	06
05	Canina	SRD*	Macho	04
06	Canina	SRD*	Fêmea	03
07	Canina	SRD*	Macho	02
08	Canina	SRD*	Fêmea	04
09	Canina	SRD*	Fêmea	06
10	Canina	SRD*	Macho	01
11	Canina	Poodle	Macho	04
12	Canina	SRD*	Macho	07
13	Canina	SRD*	Fêmea	02
14	Canina	SRD*	Macho	10
15	Canina	Pastor Alemão	Fêmea	03
16	Canina	SRD*	Fêmea	03
17	Canina	American Pit Bull Terrier	Macho	01
18	Canina	SRD*	Macho	01
19	Canina	SRD*	Macho	01
20	Canina	SRD*	Fêmea	06
21	Canina	SRD*	Macho	04
22	Canina	American Pit Bull Terrier	Fêmea	02
23	Canina	SRD*	Macho	01
24	Canina	SRD*	Fêmea	07
25	Canina	Pastor Alemão	Fêmea	05

continua ...

continuação ...

26	Canina	SRD*	Fêmea	03
27	Canina	SRD*	Fêmea	05
28	Canina	SRD*	Macho	08
29	Canina	American Pit Bull Terrier	Fêmea	02
30	Canina	SRD*	Macho	02
31	Canina	SRD*	Fêmea	02
32	Canina	SRD*	Fêmea	02
33	Canina	Poodle	Macho	02
34	Canina	SRD*	Fêmea	06
35	Canina	SRD*	Fêmea	03
36	Canina	Maltês	Fêmea	08
37	Canina	SRD*	Macho	02
38	Canina	SRD*	Macho	03
39	Canina	SRD*	Macho	02
40	Canina	SRD*	Macho	07
41	Canina	SRD*	Macho	01
42	Canina	SRD*	Fêmea	01
43	Canina	SRD*	Fêmea	03
44	Canina	Cocker Spaniel	Macho	03
45	Canina	SRD*	Fêmea	02
46	Canina	SRD*	Fêmea	06
47	Canina	American Pit Bull Terrier	Fêmea	03
48	Canina	SRD*	Fêmea	12
49	Canina	SRD*	Macho	04
50	Canina	SRD*	Fêmea	01

* SRD – Sem Raça Definida

Apêndice 2. Resultados individuais para a pesquisa de leishmaniose visceral através do ensaio imunocromatográfico, por meio do Teste Rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP® - Bio-Manguinhos), sorologia por meio do ensaio Imunoenzimático (ELISA) e em preparados citológicos obtidos por meio de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo.

Animal	TR-DPP®	ELISA*	CAAF	Resultado
01	Positivo	0,822	Positivo	Positivo
02	Positivo	0,914	Positivo	Positivo
03	Positivo	0,117	Negativo	Positivo
04	Negativo	0,150	Positivo	Positivo
05	Positivo	0,422	Positivo	Positivo
06	Negativo	0,058	Negativo	Negativo
07	Positivo	0,451	Positivo	Positivo
08	Negativo	0,000	Negativo	Negativo
09	Positivo	0,833	Positivo	Positivo
10	Positivo	0,587	Positivo	Positivo
11	Positivo	0,653	Positivo	Positivo
12	Positivo	0,433	Positivo	Positivo
13	Positivo	0,489	Positivo	Positivo
14	Positivo	0,677	Positivo	Positivo
15	Positivo	0,459	Positivo	Positivo
16	Positivo	0,725	Positivo	Positivo
17	Negativo	0,075	Negativo	Negativo
18	Positivo	0,380	Positivo	Positivo
19	Positivo	0,326	Positivo	Positivo
20	Positivo	0,666	Positivo	Positivo
21	Positivo	0,396	Positivo	Positivo
22	Positivo	0,169	Positivo	Positivo
23	Positivo	0,806	Positivo	Positivo
24	Positivo	0,436	Positivo	Positivo
25	Positivo	0,454	Positivo	Positivo

continua ...

continuação ...

26	Negativo	0,076	Negativo	Negativo
27	Positivo	0,198	Positivo	Positivo
28	Positivo	0,350	Positivo	Positivo
29	Positivo	0,665	Positivo	Positivo
30	Positivo	0,359	Positivo	Positivo
31	Positivo	0,684	Positivo	Positivo
32	Positivo	0,239	Positivo	Positivo
33	Positivo	0,190	Positivo	Positivo
34	Positivo	0,776	Positivo	Positivo
35	Positivo	0,995	Positivo	Positivo
36	Positivo	0,489	Positivo	Positivo
37	Positivo	0,399	Positivo	Positivo
38	Positivo	0,176	Positivo	Positivo
39	Positivo	0,930	Positivo	Positivo
40	Positivo	0,343	Positivo	Positivo
41	Positivo	0,313	Negativo	Positivo
42	Positivo	0,543	Positivo	Positivo
43	Positivo	0,509	Positivo	Positivo
44	Negativo	0,411	Positivo	Positivo
45	Positivo	0,264	Positivo	Positivo
46	Positivo	0,364	Positivo	Positivo
47	Positivo	0,326	Positivo	Positivo
48	Positivo	0,674	Positivo	Positivo
49	Positivo	0,640	Positivo	Positivo
50	Positivo	0,779	Positivo	Positivo

* Cut off = 0,134

ARTIGO CIENTÍFICO

Diretrizes para Autores

• Artigos Científicos

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

- **Introdução**: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.
- **Material e Métodos**: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.
- **Resultados**: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/GBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.
- **Discussão**: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.
- **Conclusões**: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

- **Referências:** Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).
- **Deverão** ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.
- **Referências e Citações:** As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.
- **Exemplos:**
- *Citações*
- O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).
- Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.
- Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização.
- Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.
- O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).
- O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).
- *Referências*
- Indique somente até seis autores. Em caso de mais autores, usar et al. após o sexto autor.
- **1. Artigo de revista**
- Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.
- Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.
- **2. Organização como autor**
- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis.

12nd ed. Washington; 1975.

- Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.
- **3. Livro**
- Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.
- **4. Capítulo de livro**
- Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.
- Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22.
- **5. Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc**
- Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3.
- **6. Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos**
- Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- **7. Publicações disponíveis na Internet**
- Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: .

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

- A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
- Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, com numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página.
- URLs para as referências foram informadas quando necessário.
- O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento, como anexos.
- O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para autores, na seção Sobre a Revista.
- A identificação de autoria do trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, conforme instruções disponíveis em Assegurando a

Avaliação Cega por Pares. O nome dos autores e suas filiações estão devidamente preenchidos em "metadados".

Declaração de Direito Autoral

- Pelo presente instrumento, concedemos os direitos autorais referente ao trabalho submetido para a possível publicação na Revista "Veterinária e Zootecnia", da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Botucatu – SP.

Política de Privacidade

- Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

“Trabalho a ser enviado para a revista Veterinária e Zootecnia”

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ESTUDO IMAGINOLÓGICO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS

Alexandre Redson Soares da Silva¹

Hugo Salvador Oliveira²

Hugo Enrique Orsini Beserra³

Miriam Harumi Tsunemi⁴

Maria Jaqueline Mamprim⁵

RESUMO

Alterações locomotoras são incomuns em cães com leishmaniose visceral. Embora a origem dos sinais clínicos permaneça obscura, a poliartrite deve ser considerada como um potencial diagnóstico nestes casos. Muitos agentes etiológicos podem causar poliartropatias, sendo estas classificadas em não inflamatórias e inflamatórias. Acredita-se que a poliartrite induzida por *Leishmania* spp. seja decorrente de uma reação inflamatória granulomatosa, causada pela presença de parasitos ou por uma resposta celular e humoral. O diagnóstico clínico ainda é um desafio para os profissionais de saúde, devido à grande variedade de sinais inespecíficos em decorrência da leishmaniose visceral. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos avaliar radiotomograficamente as articulações umeroradioulnares, radiocarpicametacarpicas, femurotibiopatelares e tibiotarsicametatarsicas, a fim de caracterizar as lesões osteoarticulares, fornecendo subsídios para os clínicos que atuam em áreas endêmicas. Para tanto, foram utilizados 46 cães, naturalmente infectados, com diagnóstico firmado por meio dos exames imunocromatográfico (95,65%), ELISA (97,82%) e/ou parasitológico direto (95,65%), provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Bauru. Não houve predileção quanto ao sexo (1:1). A maioria dos animais não apresentava precisa definição racial (78,26%). A idade variou entre um a 12 anos, com mediana igual a três anos. Sinais clínicos compatíveis com poliartrite foram observados em 32,60%. Alterações radiográficas e tomográficas importantes foram observadas em 77% e 91% dos caninos, respectivamente, sendo as articulações tibiotarsicametatarsicas a mais afetada em ambos os testes, acometendo cães sintomáticos e assintomáticos. Os sinais imaginológicos foram variados, não sendo possível determinar um padrão específico para a doença, porém a presença de trabeculado ósseo evidente, esclerose óssea e osteólise foram os mais frequentemente observados. Ademais, notou-se uma tendência para o envolvimento bilateral e simétrico. Notou-se ausência de significância quando comparadas as lesões radiotomográficas entre os animais sintomáticos e assintomáticos. Diante do estudo conduzido em cães naturalmente portadores de leishmaniose visceral podemos concluir que o exame tomográfico foi mais

¹ Doutorando em Radiologia de Animais, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, Universidade Estadual Paulista, *campus* Botucatu e Professor Assistente de Diagnóstico por Imagem em Veterinária, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

² Mestrando em Radiologia de Animais, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, Universidade Estadual Paulista, *campus* Botucatu.

³ Mestrando em Patologia Animal, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, *campus* Botucatu.

⁴ Professora Assistente Doutora, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, *campus* Botucatu.

⁵ Professora Adjunto, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, *campus* Botucatu.

Endereço para correspondência: Prof. Ass. Alexandre Redson Soares da Silva (alexandreredson@ufrb.edu.br), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, n 710, Centro, CEP: 44.380-000, Cruz das Almas-BA, Brasil.

sensível que o radiográfico; as alterações radiotomográficas apresentaram-se simétricas, bilaterais e com ausência de sinais patognomônicos; as articulações tiobiotarsicametatarsicas foram as mais afetadas; a poliartrite associada a leishmaniose visceral é uma condição frequente; a leishmaniose visceral deve ser incluída no diagnóstico diferencial de poliartrite, mesmo na ausência dos sinais clínicos clássicos da doença.

Palavras-chave: *Leishmania* spp., zoonose, radiologia, tomografia computadorizada, artrite

CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS: IMAGING STUDY IN NATURALLY INFECTED DOGS

ABSTRACT

Locomotor alterations are uncommon in dogs with visceral leishmaniasis (VL). Although the origin of clinical signs remain unclear, polyarthritis should be considered as a potential diagnosis in these cases. Many etiological agents may cause polyarthropathies, which are classified into inflammatory and non-inflammatory. It is believed that the polyarthritis induced by *Leishmania* spp. may be due to a granulomatous inflammatory reaction caused by the presence of parasites or by cellular and humoral response. Clinical diagnosis is still a challenge for health professionals, due to the great variety of nonspecific clinical signs on VL. Thus, the aim of the present study were to evaluate radiographically and tomographically elbows, carpal, stifle and tarsal joints, in order to characterize the osteoarticular lesions, providing subsidies for veterinary practitioners in endemic areas. For this, 46 dogs were used, naturally infected, with diagnosis confirmed by immunochromatography (95.65%), ELISA (97.82%) and/or cytological (95.65%) methods, from the Zoonoses Control Center of Bauru. There was no preference to gender (1:1). The majority of animals were mixed breed (78.26%). Ages varied from 1 to 12 years, with a median of 3 years. Clinical signs consistent with polyarthritis were observed in 32.60%. Radiographic and tomographic alterations were observed in 77% and 91% of dogs, respectively, with tarsal joints the most affected on both methods, on asymptomatic and symptomatic dogs. Imaging signs varied, and it was not possible to establish a pattern for the disease, however the presence of apparent trabecular bone, bone sclerosis and osteolysis were the most frequently observed. Furthermore, we noticed a tendency for bilateral and symmetric involvement. It was observed a lack of significance when comparing the radiographic and tomographic lesions between symptomatic and asymptomatic animals. In conclusion, the tomographic exam was more sensitive than radiographic; radiographic and tomographic alterations presented symmetrical, bilateral with lack of pathognomonic signs; the tarsal joints were the most affected; polyarthritis associated with VL is a common condition; VL should be included on differential diagnosis of polyarthritis, even on the absence of clinical signs of the disease.

Keywords: *Leishmania* spp., zoonoses, radiology, computed tomography, arthritis.

LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA: ESTUDIO DE IMAGEN EN LOS PERROS INFECTADOS DE FORMA NATURAL

RESUMEN

Alteraciones del aparato locomotor son poco comunes en los perros con leishmaniasis visceral (LV). Aunque el origen de los signos clínicos siguen sin estar claros, poliartritis debe ser considerado como un diagnóstico potencial en estos casos. Muchos agentes etiológicos

1 pueden causar poliartropatías, que se clasifican en inflamatorio y no inflamatorio. Se cree que
 2 la poliartritis inducida por *Leishmania* spp. puede ser debido a una reacción inflamatoria
 3 granulomatosa causada por la presencia de parásitos o por respuesta celular y humoral. El
 4 diagnóstico clínico sigue siendo un reto para los profesionales de la salud, debido a la gran
 5 variedad de signos clínicos inespecíficos en LV. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como
 6 objetivo evaluar las articulaciones, radiográficamente y tomográficamente, codos, carpo,
 7 rodillas y del tarso, con el fin de caracterizar las lesiones osteoarticulares, la concesión de
 8 subvenciones para los profesionales veterinarios en las zonas endémicas. Para ello, se
 9 utilizaron 46 perros infectados naturalmente, con diagnóstico confirmado mediante
 10 inmunocromatografía (95,65%), ELISA (97,82%) y/o citológico (95,65%) los métodos, desde
 11 el Centro de Control de Zoonosis de Bauru. No hubo preferencia al género (1:1). La mayoría
 12 de los animales eran de raza mixta (78,26%). Edad variaban de 1 a 12 años, con una mediana
 13 de 3 años. No se observaron signos clínicos correspondientes a la poliartritis en 32,60%. Se
 14 observaron radiográficos y tomográficos alteraciones en el 77% y el 91% de los perros,
 15 respectivamente, con los huesos del tarso los más afectados en ambos métodos, en los perros
 16 sintomáticos y asintomáticos. Señales de imagen variaron, y no fue posible establecer un
 17 patrón de la enfermedad, sin embargo, la presencia de hueso trabecular aparente, la esclerosis
 18 ósea y osteolisis fuera el observado con mayor frecuencia. Por otra parte, hemos observado
 19 una tendencia a la afectación bilateral y simétrica. Se observó una falta de significación al
 20 comparar las lesiones radiográficas y tomográficas entre animales sintomáticos y
 21 asintomáticos. En conclusión, el examen tomográfico fue más sensible que la radiografía;
 22 radiográficos y tomográficos alteraciones presentan simétrica, bilateral con la falta de signos
 23 patognomónicos; las articulaciones del tarso fueron los más afectados; poliartritis asociada a
 24 la LV es una condición común; LV debe incluirse en el diagnóstico diferencial de la
 25 poliartritis, incluso en la ausencia de signos clínicos de la enfermedad.

26
 27 **Palabras-clave:** *Leishmania* spp., zoonosis, radiología, tomografía computarizada, artritis.

28 29 INTRODUÇÃO

30
 31 A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose que vem se expandindo pelo Brasil,
 32 principalmente nos grandes centros urbanos, onde nos últimos 10 anos 38.953 casos foram
 33 notificados em 26 dos 27 estados brasileiros, dos quais 2.384 cursaram com o óbito dos
 34 pacientes, segundo dados do Ministério da Saúde, atualizados até agosto do ano de 2013
 35 (1,2,3).

36 De 2003 a 2013, foram notificados 38.953 pessoas portadoras de LV em todo
 37 território brasileiro, dos quais 2.500 vieram a óbito (1,2,3). No estado de São Paulo, conforme
 38 valores do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vrajaç” (CVE), foram
 39 registrados na última década 2.384 casos de LV, com 171 óbitos (4). Já no município de
 40 Bauru, localizado na região noroeste do estado, foram notificados 438 casos de LV, das quais
 41 38 pessoas vieram a óbito, entre 2003 a maio de 2013, de acordo com registros do CVE (4).

42 No ambiente doméstico o cão é o principal reservatório epidemiológico da doença
 43 sendo considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores. Esse fato
 44 torna-o um dos alvos nas estratégias de controle da doença (5,6).

45 A leishmaniose visceral canina (LVC) pode manifestar-se como uma doença sistêmica
 46 crônica, comprometendo diversos sistemas orgânicos (6,7,8). Embora pouco estudada, a
 47 incidência das afecções músculo esqueléticas em áreas endêmicas para LVC pode chegar
 48 entre 30 e 45% (9,10,11,12,13,14,15). Esses cães podem apresentar artralgia, cifose,
 49 claudicação, crepitação articular, edema de partes moles adjacente à articulação e relutância
 50 ao caminhar, proveniente de lesão neural, poliartrite, sinovite, polimiosite e osteomielites

(12,14,15,16,17,18,19,20,21,22).

Ensaaios radiológicos demonstraram que as lesões osteoarticulares podem ser classificadas como erosivas (12,14,23,24,25), não erosivas (14,23,26) e mistas (15,17,19,21,22), dependendo da evolução da doença e da resposta imune do animal. Contudo, na literatura pretérita pouco são os relatos avaliando o esqueleto apendicular de cães infectados por *Leishmania infantum chagasi*, por meio da tomografia computadorizada (TC) (21). Desta forma, acreditamos que o exame por meio da TC, poderá colaborar com a caracterização de possíveis lesões osteoarticulares em animais positivos, tendo em vista que é uma técnica mais sensível e elaborada, que consiste em uma imagem que representa secções sequenciais de um segmento do corpo, obtidas através do processamento computadorizado.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as articulações dos cotovelos, cárpicas, joelhos e târsicas, por meio dos exames radiográficos digitais e tomografia computadorizada, a fim de caracterizar o tipo, a frequência e a distribuição das lesões osteoarticulares, obtendo informações de alterações para fornecer subsídios para os clínicos veterinários que atuam em áreas endêmicas. Ademais, testar a sensibilidade das técnicas imaginológicas supracitas como ferramentas de diagnóstico complementar nos casos de poliartrites associadas a leishmaniose visceral canina.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Botucatu (FMVZ – UNESP – Botucatu), aprovado na reunião de 21 de maio de 2012, estando registrado sob o protocolo nº 159/2011-CEUA.

O estudo foi realizado no município de Bauru, situado no interior do estado de São Paulo, Brasil, nas dependências do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde de Bauru-SP, bem como no Setor de Diagnóstico por Imagem da FMVZ – UNESP – Botucatu, durante o período entre junho a agosto de 2013.

Foram utilizados 46 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi*, com idade superior a um ano, independente do sexo, raça e sinais clínicos, encaminhados ao CCZ do município de Bauru. O diagnóstico de LV foi confirmado pelo exame citopatológico, realizado em preparados citológicos obtidos por meio de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodos, bem como pela presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp., quando do emprego das técnicas de imunocromatografia e ELISA.

Inicialmente fora realizado o exame semiológico do aparelho locomotor, conforme descrito por Eugênio (27), objetivando identificar possíveis alterações desse sistema. Em sequência, foram colhidas amostras biológicas de sangue e linfonodo dos animais, para fim de diagnóstico da LV, por meio das técnicas de flebocentese da veia jugular e CAAF de linfonodos.

O diagnóstico da doença foi baseado nos resultados do teste de triagem imunocromatográfico para detecção de anticorpos específicos para *Leishmania infantum chagasi* em amostras de soro, bem como pelo ensaio sorológico imunoenzimático, para detecção de anticorpos anti-*Leishmania major like*, e/ou pela pesquisa de formas amastigotas do parasita por meio do exame citopatológico de linfonodos, sendo a positividade o fator de inclusão animal para a pesquisa.

Após a confirmação do diagnóstico da doença os cães receberam medicação pré-anestésica com Acepromazina a 0,2%⁶, na dose de 0,055 mg/kg, via intravenosa (IV), seguida, de anestesia geral com Tiopental Sódico 1g⁷, na dose de 15 mg/kg, via IV, para realização da eutanásia. Posterior a esse procedimento, os caninos receberam aplicação de uma ampola de 10mL de Cloreto de Potássio a 19,1%⁸ (IV), em cumprimento ao Decreto nº. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devam ser submetidos a eutanásia. O método empregado seguiu as recomendações da Resolução nº. 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

Sequencialmente, foram colhidos os membros torácicos e pélvicos, a fim de identificar, caracterizar e determinar as alterações osteoarticulares, por meio dos exames radiotomográficos.

Ao término das avaliações supracitadas, os resultados obtidos foram tabulados em planilhas eletrônicas e analisados estatisticamente.

A investigação clínica foi realizada por meio de dados de resenha, inspeção visual criteriosa, palpação detalhada e a aplicação de testes locomotores específicos, conforme descrito por Eugênio (27).

A colheita de sangue total foi realizada após assepsia local com polivinil pirrolidona iodo a 10%⁹ (PVP-I), em solução aquosa, contendo 1% de iodo ativo, por flebocentese da veia jugular, utilizando agulha hipodérmica de 0,70 x 25mm, acoplada a uma seringa hipodérmica de 10 mL. Obteve-se um volume mínimo de 10mL, sendo a amostra imediatamente acondicionada em tubos coletores de sangue a vácuo 13 x 100 mm de sete mL, contendo ativador de coágulo e gel, permitindo acelerar a coagulação do sangue e separar o soro da amostra, sendo a mesma delicadamente homogeneizada por inversão de 180°, entre cinco a oito vezes para evitar hemólise, e mantida em repouso na posição vertical por 30 minutos para retraindo o coágulo. Após a retração visível do coágulo, a amostra sofreu centrifugação a 1.465 g em macrocentrifuga, durante 10 minutos, para melhor separação do soro. Esse, por sua vez, foi transferido para *ependorfes* e separado em duas alíquotas, por meio de pipetas automáticas, e congeladas a - 20° C, até o momento do seu processamento.

No cenário brasileiro atual, o Ministério Saúde adotou o teste imunocromatográfico¹⁰ rápido de triagem para o diagnóstico da LVC.

As alíquotas de soro foram descongeladas, até ficaram a temperatura ambiente, antes de serem testadas e as plataformas de testes foram identificadas, conforme o número amostral, sendo as amostras analisadas seguindo recomendações do fabricante (28).

O kit utilizado para a detecção de anticorpos contra *Leishmania major like*, para a realização dos exames de ELISA foi o EIE Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos¹¹. Os materiais do conjunto, os soros controles e as *strips* sensibilizadas e as amostras de soro congeladas, foram retiradas de sua temperatura de conservação, até ficar a temperatura ambiente. O conjugado apenas foi retirado de sua temperatura de conservação no momento da sua utilização e retornando para o congelador imediatamente após o seu uso, sendo as amostras avaliadas, seguindo recomendações do fabricante (29).

O ponto de corte (0,134) da reação foi estabelecido utilizando-se a média das densidades óticas dos controles negativos (XCN), dentro da faixa de validação do teste

⁶ Acepran® 0,2% – Vetnil – Louveira, São Paulo, Brasil

⁷ Thiopentax® 1g – Cristália – Itapira, São Paulo, Brasil

⁸ Cloreto de potássio a 19,1% – Isofarma – Eusébio, Ceará, Brasil

⁹ Riodeine Dermo Suave Tópico – Rioquímica – São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

¹⁰ TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

¹¹ EIE® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

(controle positivo $\geq 0,500$ de densidade óptica (DO) e controle negativo $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO), vezes dois.

A amostra foi considerada reagente quando apresentava DO $\geq$ ao CO. Quando a amostra apresentava DO inferior ao CO foi considerada não reagente. Ademais, a amostra pode ser considerada indeterminada quando apresentar valores da DO entre o CO e a faixa cinza (FC), que é determinada pela multiplicação do CO por 1,2.

Os exames citopatológicos foram realizados após a aspiração por agulha fina dos linfonodos poplíteos e pré-escapulares, na dependência de aumento de volume dos mesmos e da facilidade de punção de acordo com o animal, com o auxílio de uma seringa descartável de polietileno de 10mL, acoplada à uma agulha hipodérmica descartável, com espessura e comprimento de 0,70 x 25mm, exercendo vácuo para a aspiração do material a ser colhido. Após esse procedimento, realizou-se o esfregaço do material aspirado em lâminas de vidro para microscopia. Este foi seco ao ar e corados com corante hematológico Panótico Rápido, sendo acondicionados em laminário e posteriormente foram avaliados à microscopia de luz no aumento de 100x, com imersão, para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

Para a realização dos exames radiográficos foi utilizada uma unidade radiológica fixa DR-F de raios-X¹², com gerador de alta frequência com capacidade de 500 miliamperes (mA) e 150 quilovoltagem (kVp) e tempo de exposição de 0,05 a 5 segundos (s).

Para as avaliações das articulações foram utilizadas duas incidências radiográficas, realizadas em ângulo reto uma em relação a outra, em posições padronizadas, obedecendo-se as normas de proteção radiológica (30). Para tanto, as peças do esqueleto apendicular foram previamente descongeladas a temperatura ambiente para melhor manipulação e posicionamento.

Foram estudadas oito articulações de cada animal, sendo as cotovelos, cárpicas, joelhos e társicas, onde a técnica radiográfica utilizada foi a que relaciona mAs e kVp, de acordo com a espessura da região a ser radiografada, preconizada por De Martin & Iwasaki (31). As imagens radiográficas foram identificadas quanto ao número de registro do animal, à espécie, à raça, à idade, ao posicionamento e à lateralidade (direito - R e esquerdo - L). O processamento radiográfico foi feito de forma digital.

Para a avaliação das articulações dos cotovelos e dos joelhos foram realizadas as incidências craniocaudal (CrCa) e mediolateral (ML). Para as articulações radiocarpicametacárpicas fizeram-se as projeções dorsopalmar (DPa) e ML e para as articulações tibiotarsicametatarsicas utilizaram-se as incidências dorsoplantar (DPl) e ML. Posteriormente os exames radiográficos foram analisados com o auxílio de um software de diagnóstico por imagem digital para tratamento de imagens médicas¹³.

As análises radiográficas das articulações supracitadas foram baseadas em um processo básico seguindo as seguintes etapas: detecção, descrição, diferenciação e diagnóstico das lesões, determinando a extensão e o acometimento de tecidos moles adjacentes, conforme descrito por Ferrel et al. (32).

Para a avaliação por meio da tomografia computadorizada (TC) foram utilizadas as mesmas peças anatômicas e regiões estudadas no exame radiográfico supracitado. Para tanto, os membros foram posicionados em paralelo com a mesa, sobre um apoio acolchoado, e colocados de forma estendidas e paralelos um em relação ao outro.

Utilizou-se equipamento de TC helicoidal¹⁴ com fator de exposição de radiação pré-determinado em 120 mA e 120 kVp, com filtro leve e *pitch* de 2,0 mm. Inicialmente foi feito o *scout* para visualização do correto posicionamento e determinação do tamanho da área das

¹² Digital-ready Room (DR-R) – GE Healthcare – Beijing, China

¹³ eFilm Workstation™ Brazil Version 3.3.5 – Microdata Tecnologia – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

¹⁴ Shimadzu SCT-7800TC CT Scanner – Shimadzu Corporation – Nakagyo-ku, Kyoto, Japan

1 articulações a serem avaliadas, ou seja, o campo de visão (*Field of view* - FOV), para então
2 dar início ao escanograma com cortes transversais de 2 mm de espessura por 2 mm de
3 intervalo (2x2). Nas articulações que apresentavam achados radiográficos dignos de nota,
4 foram utilizados cortes com incremento de 1x1 mm, com o intuito de diminuir os artefatos de
5 técnica e permitir melhor reconstrução 3D. As imagens foram reconstruídas em MPR com
6 cortes sagitais e dorsais em janela óssea (WW3500, WL800).

7 Para documentação do trabalho, as imagens foram primariamente salvas no HD
8 interno do aparelho de TC e, posteriormente, repassadas para um disco rígido portátil. As
9 imagens tomográficas foram avaliadas com o auxílio de software de diagnóstico por imagem
10 digital para tratamento de imagens médicas¹⁵.

11 Para realização da análise estatística descritiva os resultados foram tabulados em
12 planilha eletrônica¹⁶ para a obtenção das frequências absoluta (*fi*) e relativa (%), bem como a
13 comparação e distribuição, quanto ao diagnóstico de *Leishmania* spp., variáveis clínicas,
14 radiográficas e tomográficas, de acordo com os resultados, características e comportamento
15 das variáveis.

16 A priori foram verificadas as frequências, a fim de se obter os valores totais (*fi*) e
17 percentuais (%) dos animais positivos para à doença por meio dos exames
18 imunocromatográfico, ELISA e citopatológico. De forma similar, testaram-se as variáveis
19 sexo, raça, faixa etária e sinais clínicos ortopédicos.

20 No que concerne aos exames radiográficos (RX) e tomográficos (TC), primeiramente
21 foram feitas as análises descritivas quanto as frequências, a distribuição, caracterização e
22 ocorrência das lesões.

23 Comparou-se a presença das lesões entre os animais sintomáticos e assintomáticos
24 para cada tipo de lesão, articulação e procedimento através do teste Exato de Fisher ($p =$
25 0,05).

26 27 **RESULTADOS**

28
29 Para a realização do presente estudo foram avaliados 46 cães infectados por
30 *Leishmania infantum chagasi*, onde o diagnóstico da doença foi firmado por meio da
31 positividade em pelo menos um dos três testes realizados, sendo 95,65% (44/46) dos soros
32 dos animais reagentes ao teste de imunocromatografia, 97,82% (45/46) dos soros dos caninos
33 com resultados acima do ponto de corte (*cut-off* $\geq 0,132$) pelo ELISA e 95,65% (44/46) das
34 amostras de tecido linfóide evidenciaram-se formas típicas de *Leishmania* spp., no interior de
35 macrófagos.

36 Na população canina avaliada, a relação entre fêmeas e machos foi de 1:1. Não se
37 observou predisposição racial, sendo 78,26% composta por cães sem raça definida. No que
38 tange a idade, essa variou de um ano a 12 anos, com média de 3,8 anos e mediana de três
39 anos. As principais características da população avaliada encontram-se apresentadas na
40 Tabela 1.

41
42
43
44
45
46

¹⁵ OsiriX MD – OsiriX Imaging Software – Genebra, Suíça

¹⁶ Microsoft® Office Excel®: Mac 2011 Versão 14.3.1 – Microsoft Corporation – Redmond, WA, USA

Tabela 1. Distribuição das frequências absoluta (fi) e relativa (%) conforme as variáveis: sexo, raça e faixa etária de 46 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Variável	Categoria	Número	Percentagem
Sexo	Fêmea	23	50,00%
	Macho	23	50,00%
Raça	*SRD	36	78,26%
	American Pit Bull Terrier	3	6,52%
	Poodle	2	4,34%
	Pastor Alemão	2	4,34%
	Cocker Spaniel	1	2,18%
	Maltês	1	2,18%
	Chow Chow	1	2,18%
Faixa etária	1 a 3 anos	27	58,70%
	4 a 7 anos	15	32,61%
	8 a 10 anos	3	6,52%
	≥ 11 anos	1	2,17%

*Sem raça definida

No presente estudo, 32,60% (15/46) dos animais, manifestaram alterações clínicas do sistema locomotor, sendo mais frequente a observação de rigidez articular, claudicação, edema de tecidos moles adjacentes à articulação, dor articular a palpação, impotência funcional e crepitação. Por vezes, a frequência da ocorrência de mais de um sinal pôde ser notada em um mesmo animal concomitantemente.

As lesões ósseas e articulares sugestivas de osteoartrite foram detectadas por meio do exame radiográfico digital em 67,4% (31/46) dos cães. Ademais, as alterações radiográficas puderam ser visualizadas tanto em cães sintomáticos, como naqueles assintomáticos (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências absoluta (fi) e relativa (%) dos achados radiográficos em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com presença e ausência de sinais clínicos ortopédicos.

Variável	Categoria	Número	Percentagem	Lesão osteoarticular	
				Presente	Ausente
Sinal clínico	Presente	15	32,60%	11 (73,33%)	4 (26,77%)
	Ausente	31	67,40%	20 (64,52%)	11 (35,48%)
Total		46	100,00%	31	15

As alterações radiográficas foram caracterizadas por trabeculado ósseo em evidência, esclerose óssea, osteólise, lesões ósseas mistas (osteolíticas e proliferativas), aumento de volume de tecido moles adjacente às articulações (edema) e outras (colapso articular, proliferação óssea, osteófito e cisto ósseo) (Tabela 3), de acordo com as articulações em estudo (Figuras 1 e 2).

As articulações társicas foram afetadas em 29 delas, as cárpicas em 21, as dos cotovelos em sete e as dos joelhos em duas, havendo uma tendência para o envolvimento bilateral (Figura 3).

1 Tabela 3. Frequência absoluta (fi), distribuição e caracterização das lesões radiográficas em cães naturalmente acometidos por leishmaniose
2 visceral.

Variável	Categoria	Caracterização da lesão radiográfica					
		Trabeculado ósseo evidente	Esclerose subcondral	Osteólise	Osteólise e proliferação óssea	Edema de tecidos moles	*Outros
Cotovelo	Ausência	39	44	43	46	46	45
	Direita	0	0	0	0	0	0
	Esquerda	0	0	1	0	0	1
	Ambas	7	2	2	0	0	0
Total		7	2	3	0	0	1
Carpal	Ausência	25	29	38	43	45	44
	Direita	0	0	0	0	0	2
	Esquerda	1	0	0	0	0	0
	Ambas	20	17	8	3	1	0
Total		21	17	8	3	1	2
Joelho	Ausência	45	45	45	46	46	46
	Direita	0	0	0	0	0	0
	Esquerda	0	0	0	0	0	0
	Ambas	1	1	1	0	0	0
Total		1	1	1	0	0	0
Tarsal	Ausência	18	22	35	41	41	44
	Direita	0	1	0	2	0	0
	Esquerda	0	0	0	0	0	0
	Ambas	28	23	11	3	5	2
Total		28	24	11	5	5	2

*Outros corresponde: colapso articular (n=3), proliferação óssea (n=2), osteófito (n=1) e cisto ósseo (n=1).



Figura 1. Imagens radiográficas digitais das articulações tibiotalar e tarsometatarsais direita (A e B) e esquerda (C e D), em projeções dorso-plantar (A e C) e médio-lateral (B e D), de um cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A e D. Trabeculado ósseo evidente (setas); B. Proliferação óssea (seta); C. Edema de partes moles (setas).



Figura 2. Imagens radiográficas digitais das articulações radiocarpometacarpais esquerda (A) e direita (D), ulnaroradioulnar esquerda (B) e femorotibioapatelar direita (C), em projeções dorso-palmar (A e D) e médio-lateral (B e C), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A. Osteólise (seta); B. Cisto ósseo (setas); C. Osteófito (seta); D. Colapso articular (setas).

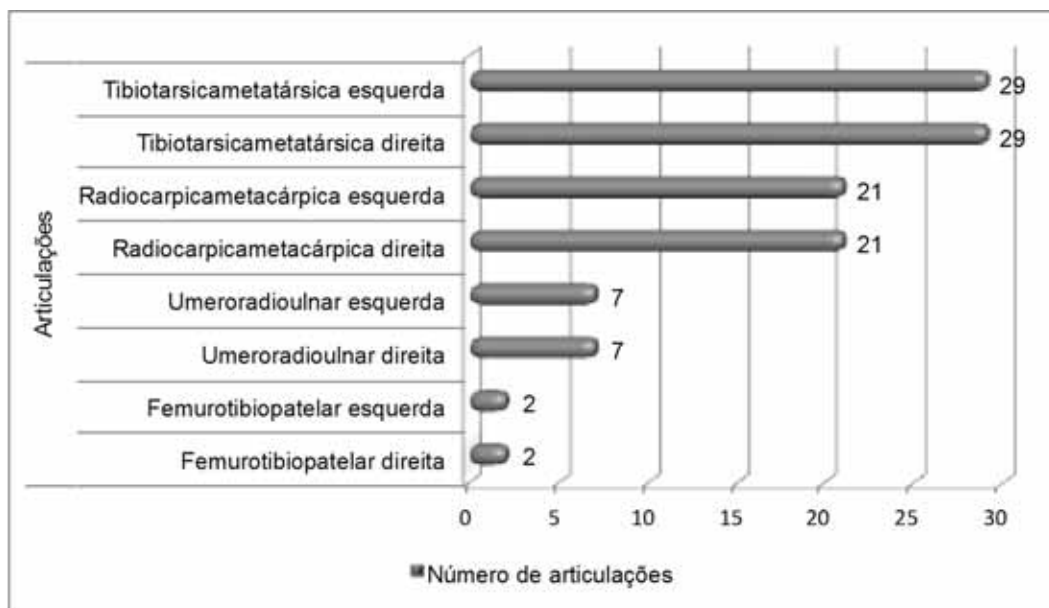


Figura 3. Ocorrência do envolvimento articular por meio do exame radiográfico em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Quando comparou a presença de lesões radiográficas entre os animais que manifestaram sinais clínicos ortopédicos entre aqueles com ausência dos mesmos, ou seja, sintomáticos e assintomáticos, por meio do teste Exato de Fisher, notou-se ausência de significância em todas as variáveis estudadas ($p > 0,05$). Ademais, lesão óssea mista (osteólise e proliferação) e edema de tecidos moles, na junção do cotovelo, bem como osteólise com proliferação óssea concomitante, edema de tecidos moles e outros, na articulação do joelho, não puderam ser testadas pela análise supracitada, tendo em vista que as mesmas não foram identificadas nas análises radiográficas.

No que concerne à avaliação tomográfica do esqueleto apendicular, tendo em vista as articulações distais de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, notou-se que 91,30% (42/46) dos animais apresentaram lesões osteoarticulares dignas de nota.

De forma similar à Roentgenologia, os achados por tomografia computadorizada também puderam ser visualizados nos cães com presença de sinais clínicos ortopédicos, bem como naqueles com ausência dos mesmos, conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Frequência absoluta (f_i) e relativa (%) dos achados tomográficos em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com presença e ausência de sinais clínicos ortopédicos.

Variável	Categoria	Número	Porcentagem	Lesão osteoarticular	
				Presente	Ausente
Sinal clínico	Presente	15	32,60%	15 (100,00%)	0 (0,00%)
	Ausente	31	67,40%	27 (87,10%)	4 (12,90%)
Total		46	100,00%	42	4

Levando em consideração às análises tomográficas computadorizadas, foi possível identificar lesões osteoarticulares como trabeculado ósseo evidente, esclerose óssea, osteólise, lesões ósseas proliferativas, lesões ósseas osteolíticas e proliferativas em associação, edema de tecidos moles, osteófito, cistos ósseos, colapso articular e *flap* de cartilagem (Tabela 5), de acordo com as articulações em estudo (Figuras 4 e 5).

1 Por meio desta técnica imaginológica, pode-se observar que as articulações mais
2 acometidas foram as társicas, seguidas das junções dos joelhos, cárpicas e as dos cotovelos.
3 Conforme demonstrado na Figura 6, pode-se perceber uma tendência para o acometimento
4 osteoarticular bilateral.

TABELA 5. Frequência absoluta (*fi*), distribuição e caracterização das lesões tomográficas em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Variável	Categoria	Caracterização da lesão tomográfica									
		Trabeculado ósseo evidente	Esclerose subcondral	Osteólise	Osteólise e proliferação óssea	Proliferação óssea	Edema de tecidos moles	Osteófito	Cisto	*Outros	
Cotovelo	Ausência	29	30	39	45	46	44	45	43	45	
	Direita	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
	Esquerda	2	0	2	0	0	1	0	2	1	
	Ambas	15	15	4	1	0	1	1	1	0	
Total		17	16	7	1	0	2	1	3	1	
Carpal	Ausência	35	22	44	44	42	45	46	46	46	
	Direita	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
	Esquerda	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Ambas	11	24	1	2	3	1	0	0	0	
Total		11	24	2	2	4	1	0	0	0	
Joelho	Ausência	20	34	41	43	43	46	40	40	45	
	Direita	0	0	3	0	2	0	4	0	0	
	Esquerda	1	1	0	1	0	0	1	5	1	
	Ambas	25	11	2	2	1	0	1	1	0	
Total		26	12	5	3	3	0	6	6	1	
Tarsal	Ausência	33	15	42	43	42	41	45	45	46	
	Direita	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
	Esquerda	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
	Ambas	13	31	2	3	4	4	1	0	0	
Total		13	31	4	3	4	5	1	1	0	

*Outros corresponde: colapso articular (n=1) e flap de cartilagem (n=1).

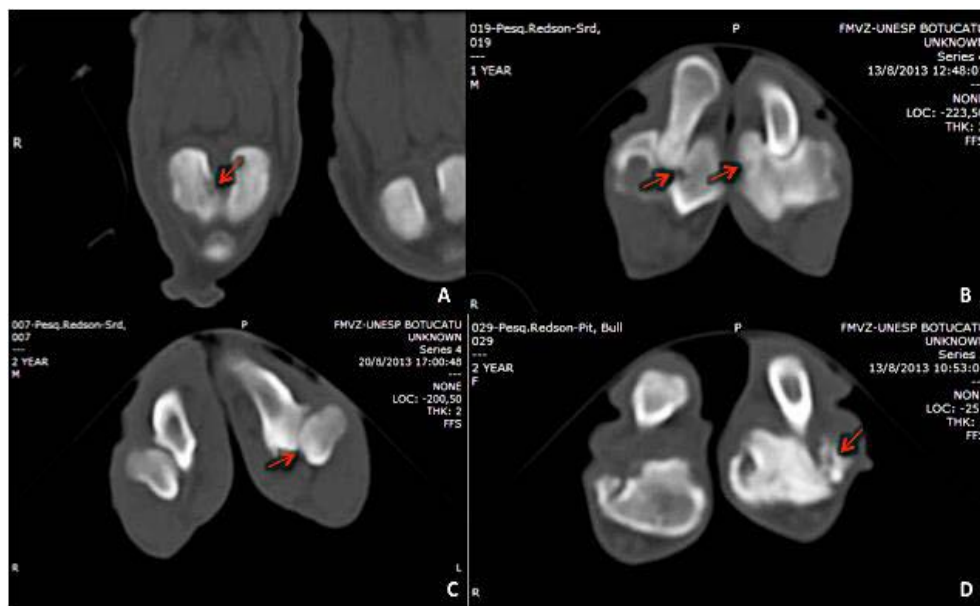


Figura 4. Imagens tomográficas digitais das articulações femurotibiopatelar (A), umeroradioulnar (B), radiocarpicametacárpica (C) e tibiotarsicametatarsica (D), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A. Osteólise (seta); B. Cistos ósseos (setas); C. Colapso articular (seta); D. proliferação óssea (seta).

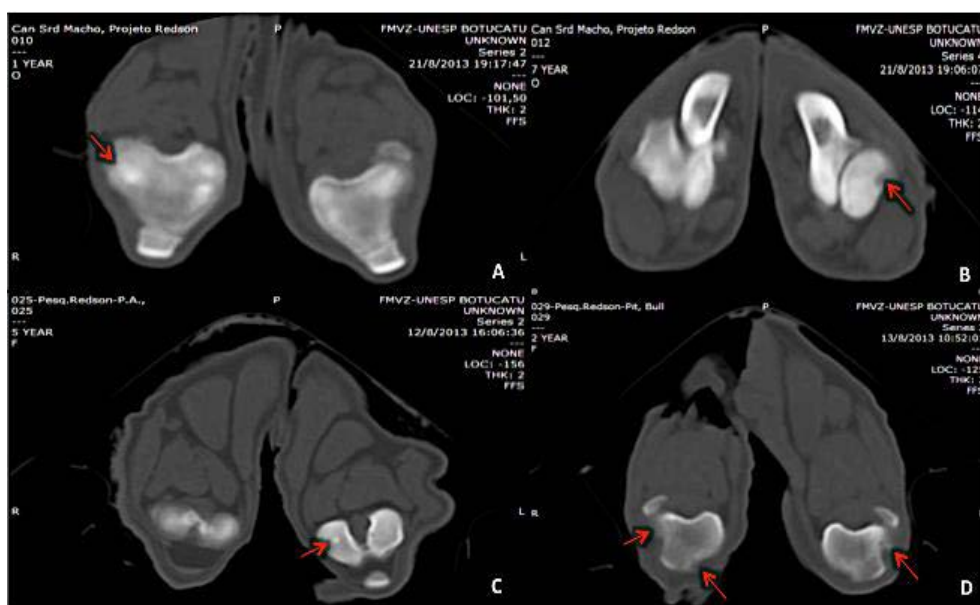


Figura 5. Imagens tomográficas digitais das articulações femurotibiopatelares (A, C e D) e tibiotarsicametatarsica (B), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, demonstrando lesões osteoarticulares. A. Esclerose óssea (seta); B. Cisto ósseo (setas); C. flap de cartilagem (seta); D. Osteófitos (setas).

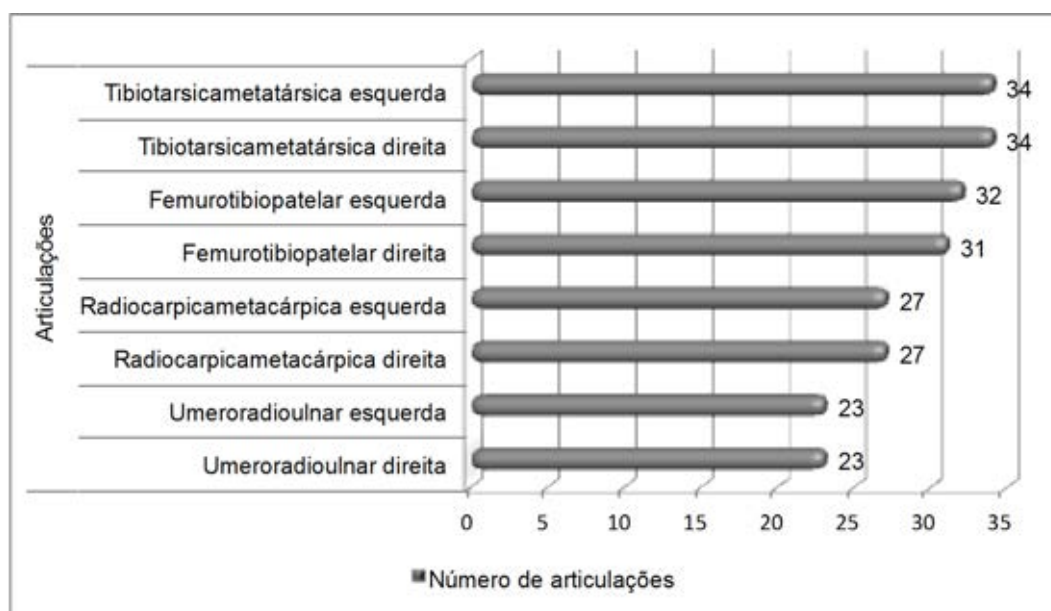


Figura 6. Ocorrência do envolvimento articular por meio do exame tomográfico em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Ao comparar estatisticamente a presença de lesões tomográficas computadorizadas entre os animais sintomáticos e assintomáticos, por meio do teste Exato de Fisher, para cada tipo de lesão por articulação, confirmou-se que não houve significância entre as variáveis estudadas ($p > 0,05$). Contudo, não foi observado a presença de proliferação óssea na articulação do cotovelo, osteófito, cisto e outros na junta do carpo, edema de tecidos moles no joelho e outros na articulação tarsal.

DISCUSSÃO

A análise isolada dos testes sorológicos aplicados nas amostras dos cães apresentaram valores similares, bem como a sensibilidade por meio do teste parasitológico direto, demonstrando que os testes tiveram desempenhos equivalentes. Este fato pode estar associado a uma amostragem intencional, selecionando-se apenas cães do CCZ e, portanto, com maior probabilidade de serem portadores de LV, tendo em vista que o fator de inclusão animal para o presente ensaio era a positividade para a doença em pelo menos um dos testes aplicados.

Apesar da resposta imune humoral heterogênea, que se desenvolve em cães infectados por *Leishmania* spp., que quase sempre envolve múltiplos antígenos que são reconhecidos de maneiras diferentes em indivíduos distintos e em vários estágios da doença no mesmo hospedeiro, sempre que possível, é preferível realizar testes em paralelo ou testes com múltiplos antígenos, para identificar um maior número de animais infectados, conforme relatado por Falqueto et al. (33). Neste trabalho, ao associar os testes diagnósticos para LV, foi possível observar uma sensibilidade dos mesmos em 97,82%, 95,65% e 95,65%, nos exames de ELISA, imunocromatografia e parasitológico direto, respectivamente.

Ainda que possa ocorrer diferenças no desempenho dos testes, provavelmente atribuíveis às concentrações de anticorpos e carga parasitária, que podem por sua vez estarem ligadas a diferentes padrões de idade, imunidade, estado nutricional do paciente ou diversidade do parasito, no presente estudo não se notou tal distinção. Acreditamos, que os valores obtidos no presente ensaio, sejam decorrentes dos diferentes padrões supracitados, tendo em vista que geralmente animais oriundos do CCZ apresentam-se em um estágio mais avançado da doença, imunossuprimidos e com escore corporal abaixo dos padrões de normalidade. Finalmente, a representação dos valores percentuais no corrente estudo foi

1 similar ao encontrado nos relatos para os testes sorológicos (34,35) e parasitológico
2 (36,37,38,39,40,41).

3 Diversos estudos não verificaram predisposição sexual para a ocorrência de LV em
4 cães (14,23,42,43,44), conforme observado no presente trabalho. No entanto, Slappendel (11)
5 relatou maior predisposição em machos, conforme firmado por Miranda et al. (45).

6 Quanto a predisposição racial, 78,26% (36/46) dos cães avaliados não apresentavam
7 raça definida, similar aos achados de Silva (15). Entretanto, Koutinas et al. (23), Sonoda (46)
8 e Agut et al. (14) verificaram a ocorrência da doença em 69% e 66,7% e 55,7% dos cães de
9 raças puras, respectivamente.

10 Teoricamente cães de qualquer raça podem ser acometidos por LV, porém, relata-se
11 maior predisposição em caninos das raças Boxer, Rottweiler, Cocker spaniel e Pastor Alemão
12 (6,14,45,46). Esses dados tornam-se conflitantes, uma vez que esses estudos foram realizados
13 em hospitais escolas, o que pode ter influenciado no padrão racial dos animais, devido ao
14 poder aquisitivo dos proprietários. Já no presente estudo e no proposto por Silva (15), os
15 animais eram oriundos do CCZ, ou seja, uma população geralmente composta por cães
16 errantes e de proprietários com baixo poder aquisitivo, consequentemente donos de caninos
17 sem raça definida.

18 Na presente análise, houve uma predisposição etária para a ocorrência da doença nos
19 caninos jovens, quando os mesmos foram subdivididos em dois grupos, entre um a três anos
20 (58,70%) e entre oito e 10 anos de idade (6,52%). Apesar de a literatura afirmar que cães com
21 menos de três anos e entre oito e dez anos apresentarem uma maior predisposição para
22 adquirir a infecção (47), não foi possível notar tal afirmação na corrente pesquisa. O presente
23 resultado pode está associado ao fato de que os proprietários não conseguiam fornecer com
24 precisão a idade dos animais, e a avaliação da arcada dentária nem sempre era possível ou
25 fidedigna.

26 A população canina foi predominantemente composta por jovens (58,70%) e adultos
27 (32,61%), ou seja, a maior parte dos animais apresentava idade entre um a três anos e quatro a
28 sete anos, confirmando os achados descritos por Slappedel (11); Agut et al. (14); Silva (15),
29 McConkey et al. (25); Spreng (26) e Collignon et al. (48), que referem maior casuística em
30 cães jovens-adultos.

31 Segundo Koutinas et al. (23), parece haver ausência de predileção quanto à idade, o
32 que reflete o longo período de incubação da *Leishmania infantum chagasi*, embora alguns
33 relatos esporádicos apresentem cães acometidos pela doença com período de vida inferior a
34 um ano (13,49,50,51). Dependendo da resistência do hospedeiro, os sinais clínicos se tornam
35 evidentes dentro de um período de um mês a vários anos (11,23,52,55).

36 Cães jovens e adultos são mais afetados por PA associada à LV (15,54,55,56,57).
37 Relatos de PA em associação com a *Leishmania* spp. e imunossupressão em humanos com 32
38 anos de idade já foi descrito, encontrando-se o paciente em uma faixa etária jovem-adulto
39 para a espécie (58).

40 Animais com LV apresentam sinais clínicos variados e inespecíficos (11). Embora as
41 alterações ortopédicas sejam consideradas como incomuns em cães infectados por *Leishmania*
42 spp. (59), o presente estudo demonstrou que 32,6% (15/46) dos animais portadores da doença
43 apresentavam PA, similar ao descrito por Turrel & Pool (9), Slappendel (11) e Silva (15), em
44 que os autores identificaram alterações articulares em 30%, 37,5% e 38% dos animais,
45 respectivamente. Da mesma forma, Agut et al. (14) observaram a presença de PA em 44,8%
46 dos cães com LV. Frente a esses valores de frequências relativas, podemos afirmar que os
47 distúrbios locomotores, associados a LV, não são uma condição incomum na doença.
48 Segundo Blavier et al. (24), as lesões articulares podem ser causadas pela presença direta do
49 parasita na sinóvia ou por meio da deposição de imunocomplexos na cápsula articular.

50 A presença de febre, claudicação e artrodinia foi frequentemente observada em cães

com PA, portadores de LV (55,60). No entanto, na presente pesquisa, apesar de identificar claudicação em 40% (6/15) e artralgia em 20% (3/15) dos cães avaliados, notou-se também, porém em menor frequência, edema de tecidos moles, rigidez articular, crepitação e impotência funcional dos membros, similar ao descrito em outros estudos (9,11,13,14,15,23,24,25,48,49,50,57). Com base nesses achados, a LV deve ser incluída no diagnóstico diferencial de distúrbios esqueléticos, associada com neuralgia, polimiosite, artralgia e poliartrite.

Quanto aos sinais radiográficos, 67,4% (31/46) dos animais apresentaram mudanças osteoarticulares sugestivas de PA, associada a LV. Tais modificações foram visualizadas tanto em cães sintomáticos (11/15), como naqueles assintomáticos (20/31), sendo as mesmas apresentadas de forma simétrica e bilateral. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Turrel & Pool (9), Slappendel (11), Buracco et al. (13), Agut et al. (14), Silva (15), Koutinas et al. (23), Blavier et al. (24), McConkey et al. (25), Collignon et al. (48), Souza et al. (49), Santos et al. (50) e Hoffmann et al. (57).

Lesões ósseas e articulares têm sido frequentemente observadas em radiografias de cães infectados por *Leishmania* spp. (9,12,13,14,15,26,64,65), bem como nos seres humanos (58). Curiosamente em alguns casos de LV descritos, não foram notadas mudanças radiográficas significativas, provavelmente explicada pelos autores por não haverem tempo hábil para o desenvolvimento das mesmas de forma a serem sensíveis ao exame (26,51,56,66).

Os achados de exames radiográficos mais comumente encontrados no corrente estudo foram: trabeculado ósseo grosseiro, esclerose óssea, osteólise, lesões ósseas mistas (osteólise e osteoproliferativa), edema de tecidos moles, colapso dos espaços interarticulares, proliferação óssea e cisto ósseo. Segundo a literatura compilada, no que tange aos achados radiológicos, diferentes relatos descreveram a PA por *Leishmania* spp. como sendo não-erosiva (14,23,26) ou erosiva (12,14,23,24,25), similar aos achados do presente estudo. Entretanto, sinais radiográficos de osteólise e osteoproliferação também puderam ser notados concomitantemente em alguns animais. Desta forma, acredita-se que as lesões radiográficas em cães com PA, associada à LV, não apresentam um padrão típico ou patognomônico para a doença. Contudo, em caso de suspeita, indica-se a avaliação do membro contralateral, tendo em vista que, os achados de imagem apresentaram-se de forma simétrica e bilateral.

Além disso, pode-se confirmar que as articulações mais afetadas, nessa doença, foram as tarsais (29/46) e as carpais (21/46), corroborando com os relatos pretéritos (11,13,14,24,25,48,50,57,67). Outrossim, tais achados foram encontrados em um paciente humano imunodeprimido descrito por Perelló-Roso et al. (58).

Estudos prévios afirmam que as articulações carpais e tarsais são mais comumente afetadas em casos de PA causadas por depósitos de imunocomplexos (54,55). Por sua vez, as articulações coxofemorais e do ombro são mais afetadas em pacientes com PA infecciosa (54). No estudo apresentado, as articulações carpais e tarsais foram as mais afetadas, sugerindo que, geralmente, essas lesões advêm de um processo imunomediado.

Na presente pesquisa não foi possível observar diferença estatística ao comparar as lesões entre os animais sintomático e assintomáticos por meio do exame radiográfico, o que difere do proposto pelos autores da revisão, onde há maior ocorrência das lesões em caninos sintomáticos (13,14,15,17,21,24,25,50,57,65,67). Chamamos a atenção para esse achado, tendo em vista que caninos portadores de *Leishmania infantum chagasi*, mesmo assintomáticos, podem desenvolver quadro clínico de PA, seja pela circulação de imunocomplexos depositados sobre a membrana sinovial ou por uma reação inflamatória granulomatosa, causada pela presença do parasita.

No que concerne aos achados por tomografia computadorizada (TC), 91,30% (42/46) dos animais apresentaram lesões osteoarticulares sugestivas de PA, associada à infecção por *Leishmania infantum chagasi*, demonstrando maior sensibilidade dessa técnica

imaginológica, quando comparada ao exame radiográfico. Até o presente momento, conforme revisão sistemática de literatura não foram relatados estudos sobre o esqueleto apendicular, por meio desse exame, em casos de leishmaniose visceral canina, sendo o presente ensaio considerado a primodescrição.

Por meio desta técnica, notadamente as alterações foram identificadas em 100% (15/15) dos animais sintomáticos, bem como em 87,10% (27/31) dos cães assintomáticos, sendo as mesmas apresentadas de forma simétrica e bilateral, similar aos achados radiográficos encontrados neste estudo e da literatura (9,11,13,14,15,23,24,25,48,49,50,57). Frente a esses resultados, acredita-se que é preferível a avaliação por TC ao exame radiográfico do esqueleto apendicular de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi*, baseado na maior sensibilidade dessa técnica imaginológica.

Pouco se sabe quanto a caracterização das lesões ósseas e articulares presentes em exames por TC de cães com LV. Na corrente análise, observou-se a presença de trabeculado ósseo evidente, esclerose óssea, osteólise, lesões osteolíticas e proliferativas em associação, edema de tecidos moles, osteófitos, cistos ósseos e colapso articular, confirmando os achados da imagem radiográfica. Em adição, foi possível observar lesões osteogênicas e *flaps* de cartilagem. No que tange aos *flaps* articulares, acredita-se que os mesmos não foram diagnosticados por meio do exame radiográfico devido a sua composição cartilaginosa e apenas visualizados quando da sua mineralização.

Desta forma, pode-se notar que as alterações encontradas por meio do exame TC foram semelhantes às encontradas na literatura pretérita, no que tange a avaliação radiográfica de cães naturalmente acometidos por LV (9,11,13,14,15,23,24,25,48,49,50,57). Entretanto, foi possível perceber que a TC proporcionou melhor definição do grau ou gravidade das lesões e como estavam acometidas as articulações, assim como, de forma similar aos achados radiográficos, por meio desta técnica também notamos ausência de sinais patognomônico para a doença e uma tendência para o acometimento osteoarticular bilateral.

Na presente avaliação, pode-se notar que as articulações mais acometidas foram as tarsais, seguidas das junções dos joelhos, carpais e cotovelos, diferindo dos achados radiográficos deste ensaio, onde as sindesmoses mais afetadas são as distais do esqueleto apendicular (tarsal e carpal). Entretanto, relatos de literatura apontam o envolvimento radiográfico da articulação do joelho na LVC (9,14,15,19,22,25,26,57,64,67).

Em relação à TC, não houve diferença estatística entre os achados obtidos nas articulações de animais assintomáticos e com alterações locomotoras, similar aos resultados encontrados no exame radiográfico do presente estudo. Esses achados divergem dos obtidos na literatura prévia, onde propõe maior envolvimento radiográfico em cães sintomáticos (13,14,15,17,21,24,25,50,57,65,67). Contudo, não há estudos que comparem as alterações obtidas na TC de cães com e sem sinais clínicos, portadores de LV.

CONCLUSÕES

Diante do estudo conduzido em cães naturalmente portadores de leishmaniose visceral podemos concluir que:

- Exames de TC possibilitam uma identificação mais sensível dos sinais de alterações osteoarticulares quando comparados aos radiográficos, sendo os mesmos importantes ferramentas de diagnóstico complementar em casos de PA associada à LVC.
- As alterações radiográficas e tomográficas de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi* apresentam-se simétricas e bilaterais, sendo as mesmas predominantemente distais, com ausência de padrão típico ou patognomônico.
- A PA é condição frequente em pacientes acometidos por LVC.
- A LV deve ser incluída no diagnóstico diferencial de PA, mesmo na ausência dos sinais

clínicos clássicos da doença, sendo importante que os médicos veterinários considerem as manifestações clínicas atípicas, como as alterações osteoarticulares, em seu diagnóstico diferencial.

- As alterações ósteoarticulares podem ser observadas em exames de TC e radiográfico, mesmo que o animal não apresente sintomatologia.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filhos”, *campus* de Botucatu, pela oportunidade oferecida para à realização do Curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo de pós-graduação, durante o primeiro ano de curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho de pesquisa (Processo FAPESP nº 2012/02484-2), bem como pela concessão de bolsa de estudo durante os anos seguintes de curso (Processo FAPESP nº 2012/01526-3).

À diretora da Divisão de Vigilância Ambiental do Centro de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Bauru-SP, Ana Paula Nardo Silva, pela permissão da colheita de materiais, bem como ao médico veterinário José Rodrigues Gonçalves Neto, pelo pronto atendimento e receptividade.

BIBLIOGRAFIA

1. Brasil. Letalidade de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. Brasília, DF, [s.n.], 2000-2010. Brasília; 2014c [Cited 2014 Feb 16], Available: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_letalidade_05_09_11.pdf>.
2. Brasil. Óbitos de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. Brasília, DF, [s.n.], 1990-2010. Brasília; 2014d [cited 2014 Feb 16], Available from: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CASOS_CONF_2010LV.pdf>.
3. Brasil. Leishmaniose Visceral - Sistema de Informações de Agravos e Notificação - Sinan Net. Brasília; 2014e [cited 2014 Feb 21], Available from: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sianweb/tabnet/dh?sinanet/leishvi/bases/leishvbrnet.de>>
4. CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”). Leishmaniose Visceral Americana Humana – Números de casos por município LPI. Nota técnica de 20 dez. 2011. Brasília; 2014 [cited 2014 Feb 21], Available from: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_leishvis.html>.
5. Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniasis. In: Greene CE. Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat. 2^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p.450-458.
6. Baneth G, Solano-Gallego L. Leishmaniasis. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 4^a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. p.735-748.
7. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol. 2008; 24, 7:324-330.
8. Vides JP, Gomes AAD, Sobrinho LSV, Marcondes M. Clinical aspects from dogs naturally infected with visceral leishmaniasis in Araçatuba - São Paulo State (Brazil).

- In: Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Association Congress (WSAVA); 2009, São Paulo, São Paulo, Brazil.
9. Turrel JM, Pool RR. Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Radiol.* 1982; 23, 6:243-249.
 10. Yamaguchi RA, French TW, Simpson GF, Harvey JW. *Leishmania donovani* in the synovial fluid of a dog with visceral leishmaniasis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1983; 19, 723-726.
 11. Slappendel RJ. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. *Vet Q.* 1988; 10, 1:1-16.
 12. Wolschrijn CF, Meyer HP, Hazewinkel HAW, Wolvekamp WThC. Destructive polyarthritis in a dog with leishmaniasis. *J Small Anim Pract.* 1996; 37, 12:601-603.
 13. Buracco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with leishmania donovani infection in a dog. *J Small Anim Pract.* 1997; 38, 1:29-30.
 14. Agut A, Corzo N, Murciano J, Laredo FG, Soler M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Vet Rec.* 2003; 153, 21:648-652.
 15. Silva ARS. Avaliação radiográfica das articulações dos membros locomotores de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no município de Araçatuba-SP. Araçatuba, 2009. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Fisiopatologia Médica e Cirúrgica), Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
 16. Vamvakidis CD, Koutinas AE, Saridomichelakis M, Kanakoudis G, Georgiadis G. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec.* 2000; 146, 24:698-703.
 17. Silva ARS, et al. Osteoartrite por *Leishmania* sp. em cão Pitt Bull – Relato de caso. *Acta Sci Vet.* 2007; 35, 2:730-732.
 18. Paciello O, et al. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. *Neuromuscul Disord.* 2009; 19, 2:124-130.
 19. Silva ARS, et al. Lesões osteoarticulares em cães naturalmente acometidos por leishmaniose. In: Anais do 32^o Congresso Brasileiro da Anclivepa; 2011, Goiânia, Goiás.
 20. Gomes AAD, et al. Subclinical muscle injuries in dogs infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. *BJVP.* 2012; 5, 3:108-115.
 21. Silva ARS, Mamprim MJ, Almeida BFM, Ciarlini PC, Ciarlini LDRP, Ferreira WL. Radiographic and tomographic aspects of osteoarticular lesions in dogs naturally affected visceral leishmaniasis. In: Proceedings of the 16^o International Veterinary Radiology Association Meeting & EVDI Annual Meeting; 2012a, Bursa, Turquia.
 22. Silva ARS, Zulim-Lima RMI, Mamprim MJ, Rahal SC, Ciarlini LDRP. Osteomyelitis canine caused by *Leishmania* spp. In: Proceedings of the 16th European Society of Veterinary Orthopaedics and Traumatology Congress – ESVOT; 2012b, Bologna, Italy.
 23. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1999; 35, 5:376-383.
 24. Blavier A, et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J.* 2001; 162, 2:108-120.
 25. McConkey SE, López A, Shaw D, Calder J. Leishmanial polyarthritis in a dog. *Can Vet J.* 2002; 43, 8:607-609.
 26. Spreng D. Leishmanial polyarthritis in two dogs. *J Small Anim Pract.* 1993; 34, 11:559-563.

27. Eugênio FR. Semiologia do sistema locomotor de cães e gatos. In: Feitosa FLF. Semiologia veterinária a arte do diagnóstico. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2008. p.553-579.
28. Bio-Manguinhos. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. TR DPP®. Leishmaniose Visceral Canina. Teste Rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*. Rio de Janeiro; 2011.
29. Bio-Manguinhos. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. EIE Leishmaniose Visceral – Bio-Manguinhos®. Leishmaniose Visceral Canina. Teste Rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*. Rio de Janeiro; 2012.
30. Kealy JK, McAllister H. Bones and joints. In: Kealy JK, McAllister H. Diagnostic radiology & ultrasonography of the dog and cat. 4ª ed. St. Louis: Elsevier, 2005. p. 299.
31. De Martin BW, Iwasaki M. Noções de radiodiagnóstico veterinário. São Paulo: [s.n.], 1976.
32. Ferrel EA, Clifford RB, Thrall DE. Paradigmas de interpretação para o esqueleto apendicular. In: Thrall, DE. Diagnóstico de radiologia veterinária. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.222-239.
33. Falqueto A, et al. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). AJTMH. 2009; 80, 4:559-565.
34. Santos-Gomes GM, Fonseca IP. Leishmaniose canina. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 1ª ed. v.1, 2008.
35. Domingos IH. Teste rápido TR-DPP® no contexto do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. Campo Grande, 2012. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Saúde Animal), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
36. Braga MDM, et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. SBMT. 1998; 31, 5:419-424.
37. Ferrer L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Proceedings of the First International Canine Leishmaniasis Forum; 1999, Barcelona; 1999. p.6-10.
38. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonosis. Int J Parasitol. 2000; 30, 12-13:1269-1281.
39. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004; 7, 3:338–349.
40. Barrouin-Melo SM, et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. Vet J. 2006; 171, 2:331-339.
41. Brasil. Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1ª ed. 2006.
42. França-Silva JC, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais States, Brazil. Vet Parasitol. 2003; 111, 2-3:161-173.
43. Silveira FT, et al. A cross- sectional study of canine *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of specific IgG-antibody response than delayed-type hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. Parasitol Res. 2012; 111, 4:1513-1522.
44. Gomes AAD. Fatores de risco e análise espacial para a leishmaniose visceral no município de Juazeiro – Bahia – Brasil. Jaboticabal, 2013. 120 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Clínica Médica Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e

- Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” 2013.
45. Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L, Ramis A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Res Vet Sci.* 2008; 85, 1:35-38.
 46. Sonoda MC. Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007. 115 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária). Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
 47. Paltrinieri S, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *JAVMA.* 2010; 36, 11:1184-1191.
 48. Collignon C, Zahra A, Guenego L, Gautier R, Madelenat A. Polyarthrititis associated to leishmanianis in a young dog. *PMCAC.* 2009; 44, 1:27-34.
 49. Souza AI, et al. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Vet Parasitol.* 2005; 129, 1-2:51-54.
 50. Santos M, Marcos R, Assunção M, Matos AJF. Polyarthrititis associatede with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Vet Parasitol.* 2006; 141, 3-4:340-344.
 51. Paraboni C, Franco PA, Mattei DR. Poliartrite por leishmaniose visceral canina: relato de caso. In: *Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET); 2008, Gramado, Rio Grande do Sul. Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária e Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul; 2008. p.176-180.*
 52. Cardoso L, et al. Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó. *Vet Parasitol.* 2004; 121, 1-2:21-32.
 53. Roze M. Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *EJCAP.* 2005; 15, 1:39-52.
 54. Hopper PE. Immune-mediated joint diseases. In: Slatter D. *Textbook of small animal surgery.* 2ª ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 1993. p.1928-1937.
 55. Bennett DB, May C. Joint diseases of dogs and cats. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal medicine.* 4ª ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 1995. p.2032-2077.
 56. Jacques D, Cauzinille L, Bouvy B, Dupre G. A retrospective study of 40 dogs with polyarthrititis. *Vet Surg.* 2002; 31, 5:428-434.
 57. Hoffmann AR, Navarro IT, Camargo Junior VE, Caldart ET, Breganós RM, Pereira PM. *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil – relato de caso. *Semina: Ci Agrárias.* 2012; 33, supl. 2: 3265-3270.
 58. Perelló-Roso A, López-Aldeguer J, García-Gascó P, Blanes M. Polyarthrititis caused by *Leishmania* in a patient with AIDS. *CID.* 1996; 22, 6:1113-1116.
 59. Kontos VJ, Koutinas AF. Old World Canine Leishmaniasis. *Comp Cont Educ Educ Small Anim.* 1993; 15, 7:949-959.
 60. Roush JK, Manley PA, Dueland RT. Rheumatoid arthritis subsequent to *Borrelia burgdorferi* infection in two dogs. *JAVAMA.* 1989; 195, 7:951-953.
 61. Ciaramella P, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniosis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.* 1997; 141, 21:539-543.
 62. Font A, Mascort J, Altimira J, Closa JM, Vilafranca M. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. *JSAP.* 2004; 45, 4:199-201.
 63. Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Vet J.* 2008; 175, 1:14-15.
 64. Tryphonas L, Zawidzka Z, Bernard MA, Janzen EA. Visceral leishmaniasis in a dog:

- 1 clinical, hematological and pathological observations. *Can J Vet Res.* 1977; 41, 1:1–
2 12.
- 3 65. Cucinotta G, Iannelli N, Musicò M, Lombardo N. Singolare forma di leishmaniosi:
4 lesioni osteo-articolari bilaterali del carpo e del tarso in un cane. *Vet Praxis.* 1991; 12,
5 3:12-14.
- 6 66. Cuomo A, Valerii V, Galdo A, Macolino A, Pierantozzi M. Rheumatoid like arthritis
7 in canine leishmaniasis: clinical and radiographic findings. In: *Annali del XVI*
8 *Congresso Nazionale di Società Italiana di Chirurgia Veterinaria (SICV); 2009;*
9 *Parma: SICV; 2009.*