

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

**AVALIAÇÃO ELETRONEUROGRÁFICA E
HISTOPATOLÓGICA DE NERVOS PERIFÉRICOS EM
CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS PELA
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Mauro Henrique Bueno de Camargo
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SP – BRASIL
2008

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

**AVALIAÇÃO ELETRONEUROGRÁFICA E HISTOPATOLÓGICA
DE NERVOS PERIFÉRICOS EM CÃES NATURALMENTE
ACOMETIDOS PELA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Mauro Henrique Bueno de Camargo

Orientadora: Prof. Adjunto Mary Marcondes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

Jaboticabal – SP
Agosto – 2008

Ficha Catalográfica (verso 2ª capa)

B928a Bueno de Camargo, Mauro Henrique
Avaliação eletroneurográfica e histopatológica de nervos
periféricos em cães naturalmente acometidos pela leishmaniose
visceral / Mauro Henrique Bueno de Camargo -- Jaboticabal, 2008
xiv, 72f. : il..; 28 cm

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientadora: Mary Marcondes
Banca Examinadora: Márcia Dalastra Laurenti, Raimundo
Souza Lopes, Silvia Regina Ricci, Márcia Rita Fernandes
Machado.

Bibliografia

1. Leishmaniose visceral 2. Neuropatia Periférica 3.
Eletroneurografia 4. Histopatologia 5. Cão I. Título. II. Jaboticabal -
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

CDU 619:616.993.161:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – Unesp, *campus* de Jaboticabal.
E-mail: maurohbc@gmail.com

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAURO HENRIQUE BUENO DE CAMARGO – Natural de São Paulo, SP, nascido em 30 de junho de 1971, ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, *Campus* de Jaboticabal, em março de 1995, concluindo-o em dezembro de 1999. Em março de 2000, iniciou curso de mestrado em Medicina Veterinária (Patologia Animal) na mesma unidade universitária, concluindo-o em agosto de 2002. Em agosto de 2004, ingressou no curso de Doutorado, pelo Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária (Patologia Animal), desta Universidade, concluindo-o em agosto de 2008.

Dedico,

*A meus pais, que me apoiaram
sempre, e também durante todo
este trajeto...*

Amo muito vocês!!!

Ofereço,

*Às duas pessoas mais
importantes na minha vida...*

*Felicidade é estar ao lado de
você...*

Gisela e Letícia,

Amo vocês muito, muito mais que

Bastantão!!!

Aos animais,

*Meu Muito Obrigado
pela enorme “colaboração”
involuntária*

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Mary Marcondes, pela orientação, apoio, confiança e dedicação concedidas durante este projeto.

À Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, por toda compreensão e apoio.

Aos participantes da Comissão Examinadora, Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes, Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas e Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado, pelas correções e sugestões feitas para a melhoria deste trabalho.

À Gisela, pela paciência durante todos estes anos... Te amo!!!

À Lelê, o melhor “acontecimento” deste doutorado...

A meus pais, por tudo que fizeram para esta conquista.

A meus irmãos, por todo apoio que nos deram durante estes anos.

Ao Adauri e o Matt, por toda amizade, amor, ajuda, atenção e carinho sempre presentes.

Ao Dio e Rachel pelo apoio nestes anos.

À Eveline, pela Amizade, por ser sempre prestativa, e por todo apoio concedido não só durante este trabalho.

Ao Fabrício, pela grande amizade!

À Profa. Márcia Rita Fernandes Machado pela amizade e por estar sempre pronta para nos ajudar.

Aos colegas de Araçatuba, Fabiana, Cláudio, Denis, Camila e Celina, por toda ajuda na realização deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

À Deus, por tudo, e por permitir a realização desta etapa!

MUITO OBRIGADO!!!!

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Jaboticabal e ao seu curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pelo ensejo da realização do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Ao Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, do Curso de Medicina Veterinária, da Faculdade de Odontologia (FOA), UNESP - Araçatuba, pela permissão do uso de suas instalações para a realização dos exames eletromiográficos e colheita das amostras.

Ao Laboratório de Imunologia do Departamento de Clínica Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária, da Faculdade de Odontologia (FOA), UNESP - Araçatuba, na pessoa da Profa. Dra. Valéria Marçal Félix Lima, pela realização do método de ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

À Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado do Departamento de Clínica Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária, da Faculdade de Odontologia (FOA), UNESP - Araçatuba, pela orientação na análise histopatológica e leitura das lâminas.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba - SP, pela disponibilização dos animais.

Ao Denis Carvalho Costa, aluno de iniciação científica do Curso de Medicina Veterinária, da Faculdade de Odontologia (FOA), UNESP - Araçatuba, pela leitura das lâminas para o diagnóstico parasitológico e pela ajuda na colheita de todo o material.

À Camila Mariana Vieira e Celina Bertelli Simões, alunas de iniciação científica do Curso de Medicina Veterinária, da Faculdade de Odontologia (FOA), UNESP - Araçatuba, pela ajuda na colheita do material.

À Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV, UNESP - Jaboticabal, pelo uso do seu laboratório para a leitura das lâminas e realização das fotomicrografias.

Ao Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Animal da FCAV, UNESP – Jaboticabal, nas pessoas das auxiliares técnicas Francisca de A. Ardisson e Maria Inês Y. de Campos, pela confecção das lâminas histológicas.

Aos funcionários dos setores de Pós-graduação e Biblioteca da FCAV, UNESP – Jaboticabal, pela atenção e presteza.

Ao Dr. Adauri Bueno de Camargo, médico fisiatra e neurofisiologista do Departamento de Neurofisiologia Intra-operatória do Montefiore Medical Center, Nova Iorque - EUA, pela orientação na análise eletroneurográfica.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xiii
SUMMARY	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	2
III. MATERIAL E MÉTODOS	15
Local de realização dos exames	15
Animais	15
Delineamento Experimental	16
Colheita das amostras	16
Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i> no soro	17
Eletroneurografia	17
Exame citológico de linfonodo, medula óssea baço e fígado	24
Colheita dos fragmentos de nervos	24
Exame histopatológico	24
Análise estatística	25
IV. RESULTADOS	26
Eletroneurografia	26
Exame histopatológico	34
V. DISCUSSÃO	39
VI. CONCLUSÕES	44
VI. REFERÊNCIAS	44
APÊNDICES	53
Apêndice A: Técnica de ELISA para leishmaniose visceral, como descrita por LIMA et al. (2005), para determinar a presença de IgG anti- <i>Leishmania</i> sp. no soro dos animais	54
Apêndice B: Resultados individuais dos exames sorológico e parasitológico	

dos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral	55
Apêndice C: Resultados individuais do exame físico geral dos cães naturalmente acometidos por leishmaniose víscera	57
Apêndice D: Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico, duração e velocidade de condução nervosa obtidas por meio de estimulação proximal e distal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e de cães negativos para a doença. (Jaboticabal, 2008)	59
Apêndice E: Alterações histopatológicas	70

AVALIAÇÃO ELETRONEUROGRÁFICA E HISTOPATOLÓGICA DE NERVOS PERIFÉRICOS EM CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS PELA LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - A leishmaniose visceral é uma antropozoonose, que vem aumentando no Brasil em número de casos e já sendo endêmica em vários estados. Os cães, considerados o principal reservatório doméstico, são de grande importância na manutenção do ciclo epidemiológico da leishmania visceral, já que a mesma é mais prevalente na população canina que na humana, e também podem servir como modelo experimental da doença. Partindo-se da hipótese de que a leishmaniose visceral causa uma neuropatia periférica em cães, o presente ensaio teve como objetivos analisar as alterações eletroneurográficas e histopatológicas dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos pela doença. Assim, 33 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, e quatro cães sem a doença foram submetidos a exames eletroneurográficos e retirada de fragmentos dos nervos para análise histopatológica. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que cães com leishmaniose visceral podem apresentar velocidade de condução nervosa motora diminuída, caracterizando um quadro de neuropatia periférica; apresentar alterações histopatológicas indicativas de uma neuropatia periférica; e que as principais alterações histopatológicas nos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães com leishmaniose visceral foram aumento de tecido conjuntivo no endoneuro, variação no diâmetro de fibras nervosas, degeneração axonal, infiltrado inflamatório no perineuro e no tecido adiposo, desmielinização e aumento de tecido conjuntivo no perineuro.

Palavras-Chave: eletroneurografia, histopatologia, *Leishmania* sp., neuropatia periférica

ELECTRONEUROGRAPHIC AND HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF PERIPHERAL NERVES OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY – Visceral leishmaniasis is an antropozoonosis, that is increasing in Brazil in number of cases and already being endemic in several states. The dogs, considered the main domestic reservoir, are of great importance in the maintenance of the epidemic cycle of the visceral leishmania, since the same is more prevalent in the canine population than in the human, and they can also serve as experimental model of the disease. Breaking of the hypothesis that the leishmaniasis visceral cause an outlying neuropathy in dogs, the present study aimed to analyze the alterations electroneurographics and histopathologics of the radial, ulnar, tibial and peroneal nerves of dogs attacked by the disease. Like this, 33 dogs naturally attacked by visceral leishmaniasis, and four dogs without the disease were submitted to eletroneurography and retreat of fragments of the nerves for analysis. The results obtained in this work allowed to end that dogs with visceral leishmaniasis can present reduced motor nerve conduction velocity, characterizing a neuropathy; to present histopathologics alterations indicative of an outlying neuropathy; and that the main alterations in the radial, ulnar, tibial and peroneal nerves of dogs with visceral leishmaniasis were increase of conjunctive tissue in the endoneurium, variation in the diameter of nervous fibers, degeneration axonal, infiltrated inflammatory in the perineurium and in the adipous tissue, desmielinization and increase of conjunctive tissue in the perineurium.

Keywords: eletroneurography, histopathology, *Leishmania* sp., peripheral neuropathy

I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma antropozoonose, que vem aumentando no Brasil em número de casos e em dispersão geográfica, já sendo endêmica em vários estados. No Estado de São Paulo o primeiro caso canino autóctone da doença foi diagnosticado no município de Araçatuba em 1998, enquanto o primeiro diagnóstico da doença em seres humanos foi realizado no mesmo município em 1999. De 1998 a 2006, 37.000 cães foram submetidos à eutanásia e 911 casos foram diagnosticados em seres humanos, dos quais 83 vieram a óbito. De acordo com os dados da Direção Regional de Saúde, 41 municípios do Estado já apresentam confirmação da doença, inclusive com casos autóctones identificados na região metropolitana da cidade de São Paulo.

Os cães, considerados o principal reservatório doméstico, são de grande importância na manutenção do ciclo epidemiológico da leishmania visceral, já que esta enfermidade mesma é mais prevalente na população canina que na humana. Além disso, a infecção no cão usualmente causa uma doença sistêmica crônica, que, clinicamente, é similar à humana, de forma que o cão pode servir como modelo experimental da doença.

Dentre os sintomas descritos em seres humanos, destacam-se aqueles relacionados ao comprometimento do sistema nervoso periférico, e embora também existam relatos de neuropatias periféricas em cães com leishmaniose visceral, pouco se conhece sobre a patogenia da doença nesse sistema.

Desta forma, partindo-se da hipótese de que a leishmaniose visceral causa uma neuropatia periférica em cães, o presente ensaio teve como objetivos analisar as alterações eletroneurográficas e histopatológicas dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos pela doença, na tentativa de se obter uma melhor compreensão da fisiopatogenia da mesma no sistema nervoso periférico.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Calazar, é uma enfermidade parasitária cujos agentes etiológicos são protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*, transmitidos, no Brasil, através da picada de dípteros do gênero *Lutzomyia*. As leishmanias fazem parte de dois grandes grupos, o que causa a leishmaniose visceral e o que causa a leishmaniose tegumentar. A espécie responsável pela forma visceral da doença no Brasil é a *Leishmania chagasi* (GENARO, 1993; CASTRO, 1996; SANTA-ROSA & OLIVEIRA, 1997; POCAI et al., 1998; BANETH, 2006).

As leishmanioses (visceral e tegumentar) são endêmicas nos cinco continentes, em 88 países localizados em regiões tropicais e subtropicais, com cerca de 350 milhões de indivíduos vivendo em áreas de risco. Embora a leishmaniose visceral seja conhecida como uma doença tipicamente rural, vários surtos epidêmicos urbanos têm sido relatados devido às condições epidemiológicas favoráveis (GONTIJO & MELO, 2004; MARCONDES, 2007).

Na América Latina, 90% dos casos humanos concentram-se no Brasil. A importância da leishmaniose visceral reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada a quadros de má nutrição e a outros agentes infecciosos (BORGES et al, 1999; GONTIJO & MELO, 2004). Outro aspecto relevante neste contexto de expansão e urbanização da leishmaniose visceral em todo o mundo é a possibilidade de contração da doença através de transfusão sangüínea (GENARO, 2002; CAMARGO-NEVES & SANTUCCI, 2005).

Em São Paulo o primeiro caso canino autóctone da doença foi diagnosticado no município de Araçatuba, região noroeste do Estado, no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em maio de 1998. A partir de então o número de casos vem aumentando consideravelmente na região, sendo que, de acordo com os dados da Direção Regional de Saúde, 41

municípios já apresentaram casos confirmados da doença, tendo sido notificados oficialmente 18.566 casos caninos de 1998 a 2004. Desde então já foram submetidos à eutanásia mais de 30 mil cães na região (LEISHMANIOSE..., 2005a; 2005b; MARCONDES, 2007).

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina é difícil de ser realizado devido à variedade de sintomas da doença (FERRER, 1999; GRADONI, 2002). Os sintomas são comuns a outras enfermidades, tornando o diagnóstico laboratorial ou parasitológico necessários para a confirmação da suspeita (FEITOSA et al., 2005). As alterações histopatológicas também são inespecíficas e as lesões são semelhantes às aquelas observadas em outras doenças infecciosas e imunomediadas (FERRER, 1999; GRADONI, 2002), tendo uma característica histológica comum: o acúmulo inicial de células fagocíticas mononucleares nos tecidos invadidos, o que promove a hiperplasia das células do sistema fagocítico mononuclear dos órgãos envolvidos (MALLA & MAHAJAN, 2006).

No cão a infecção por *L. chagasi* usualmente causa uma doença sistêmica crônica, que, clinicamente, é similar à humana. Em ambos os casos ocorre febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso e caquexia no estágio final da doença. Em muitos animais observa-se uma mioatrofia, inicialmente nos músculos das fossas temporais, seguida, sucessivamente, pelo resto da musculatura do corpo. Os animais acometidos podem apresentar, ainda, alterações dermatológicas, renais, hepáticas, respiratórias, cardíacas, locomotoras, neurológicas e oculares; sendo freqüente, também, a observação de diáteses hemorrágicas (NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000; SCOTT et al., 2001; FERRER, 2002; CIARAMELLA & CORONA, 2003; FEITOSA et al., 2005).

Apesar da descrição de sintomas neurológicos em seres humanos e cães portadores de leishmaniose visceral, existem contradições na literatura quanto à patogênese da doença no sistema nervoso central (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NIETO et al., 1996; NOLI, 1999; BANETH, 2006; IKEDA et al., 2007). A literatura médica também descreve alguns quadros de neuropatia periférica associados à doença. MUSTAFÁ (1965) descreveu o quadro clínico de 30 seres humanos no Sudão,

portadores de leishmaniose visceral, os quais referiam dor em queimação na planta dos pés e outros sintomas como paresia, com perda de alguns reflexos em membros inferiores, e hipoalgesia nas pernas, tornozelos e pés. Na época, creditou-se a etiologia a uma provável hipovitaminose do complexo B, particularmente, de tiamina e ácido pantotênico.

Outro relato de sintomas neurológicos é o de CHUNGE et al. (1985), que descreveram a presença de tremores generalizados em um paciente portador de leishmaniose visceral. Os autores sugeriram que a severidade dos mesmos era diretamente proporcional à contagem parasitária e verificaram que, após o tratamento, os tremores desapareceram, sem, entretanto, determinar a patogênese do quadro neurológico.

Na literatura existem, ainda, descrições de quadros de neuropatias periféricas em associação com leishmaniose tegumentar, mimetizando casos de hanseníase. KUBBA et al. (1987) observaram, por meio de biopsias de lesões de pele, comprometimento de nervos periféricos em 5% dos casos da doença em seres humanos. SATTI et al. (1989) relataram o envolvimento de nervos periféricos em um homem naturalmente acometido, e em nove de 13 ratos, que experimentalmente receberam injeções de formas promastigotas de *L. major*. Na análise histopatológica das lesões de pele e de nervos periféricos dos ratos, descreveram três estágios de envolvimento neural, dependendo da severidade da doença, mas sem correlação entre esses e a duração da lesão cutânea. Dentre os principais achados histopatológicos desses estudos destacam-se um quadro de neurite, com identificação do parasita nas células de Schwann e na região perineural, e presença de intenso infiltrado inflamatório.

Trinta anos depois de Mustafá, HASHIN et al. (1995), também no Sudão, descreveram a ocorrência de uma neuropatia periférica em 52 pacientes portadores de calazar. O quadro clínico era de dor severa em queimação nos pés, hiperestesia de membros inferiores e pequenos distúrbios motores. Muitos indivíduos apresentavam múltiplos sinais de envolvimento de nervos cranianos, sendo, o principal, a surdez. Os autores confirmaram a ocorrência de neuropatia periférica por meio de estudos de neurocondução e verificaram diminuição da velocidade de condução nervosa motora e

sensitiva nos nervos do membros pélvicos de quase todos os indivíduos, os quais retornaram aos valores de normalidade, ou próximos a eles, após o tratamento da doença. Através desses estudos foi possível confirmar a presença de um quadro de desmielinização, variando de moderada a severa, acompanhado de degeneração axonal. Logo após o tratamento houve remissão gradativa das alterações sensitivas e motoras, indicando uma remielinização da fibra nervosa. A etiologia da neuropatia não foi determinada, porém, os autores contestaram a hipótese anterior da hipovitaminose, já que nenhum paciente apresentou evidências clínicas ou laboratoriais de deficiência vitamínica.

FEITOSA et al. (2005), avaliando cães com sintomas neurológicos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, observaram a ocorrência de sinais de envolvimento de nervos cranianos (cegueira bilateral, dificuldade de deglutição, ptose palpebral e labial), de lesões em tronco encefálico (anisocoria e midríase bilateral), de acometimento do sistema vestibular e do cerebelo (ataxia, quedas, tremor de intenção, inclinação lateral da cabeça, estrabismo e nistagmo posicionais), vocalização, andar em círculos, convulsões generalizadas, mioclonias, tetraparesia e tetraplegia.

A maior parte das doenças musculares e do sistema nervoso periférico apresenta sintomas relacionados à musculatura esquelética. No entanto, nem sempre é possível ao clínico determinar se as alterações são primárias ou secundárias. Para tanto, existem os testes eletrodiagnósticos (eletroneurografia e eletromiografia) que melhoram a capacidade de avaliação do examinador, complementando o exame físico e auxiliando na localização da lesão. Em muitos casos os resultados destes procedimentos fornecem informações que não poderiam ser obtidas por meio de outros métodos (CHRISMAN, 1991; CHRISMAN & CLEMMONS, 1993).

A eletroneurografia é um exame que consiste na estimulação direta de um nervo e no traçado de um potencial de ação no músculo (condução nervosa motora), ou na estimulação direta de um nervo e na captação de um potencial de ação no próprio nervo (condução nervosa sensitiva) (SIMS, 1983; VAN NES, 1986). Para o estudo das velocidades de condução nervosa (VCN) podem ser utilizados vários sítios de estimulação e de captação. No entanto, quando da obtenção de resultados e avaliação

da latência, amplitude e duração dos potenciais de ação, os valores devem ser confrontados com aqueles obtidos nos mesmos sítios de estimulação e captação (BROWN & ZAKI, 1979; MALIK et al., 1989; CHRISMAN, 1991; CHRISMAN & CLEMMONS, 1993; FEITOSA et al., 2000a, 2000b).

Quando se estimula um nervo, as diferenças de potenciais são amplificadas e simultaneamente apresentadas num osciloscópio para uma monitorização visual (DUNCAN, 1980; PINTO, 2006). Obtém-se, inicialmente, um artefato de choque, depois um período de latência e, finalmente, um potencial de ação evocado. O período de latência é expresso em milissegundos e representa o tempo necessário para a condução através do axônio, da junção neuromuscular e do músculo (CHRISMAN, 1991; CHRISMAN & CLEMMONS, 1993).

A velocidade de condução nervosa motora não é constante ao longo de todo o nervo, pois o impulso se alentece à medida que atinge a porção distal, onde existem ramos terminais não mielinizados e a junção neuromuscular. Além disso, existe o tempo de cerca de 0,5 ms que é consumido entre o início da despolarização da fibra muscular e sua contração (CHRISMAN, 1991; CHRISMAN & CLEMMONS, 1993; DUMITRU et al, 2002; PINTO, 2006). Para se determinar a velocidade de condução nervosa eliminando-se este retardo (conhecido como latência residual), o nervo motor pode ser consecutivamente estimulado em dois pontos. Após as estimulações, obtêm-se dois potenciais de ação. O tempo decorrido entre o estímulo do nervo e o aparecimento do potencial de ação é o tempo de condução ou tempo de latência. A diferença entre os dois tempos de latência obtidos é o tempo gasto para o impulso percorrer a distância entre os dois pontos estimulados. A fórmula para determinar a velocidade de condução nervosa em metros por segundo é: a distância em milímetros dividida pelo tempo em milissegundos. O comprimento deste segmento (mm) dividido pela diferença nos tempos (ms) fornece a velocidade de condução nervosa em metros por segundo (m/s) (CHRISMAN & CLEMMONS, 1993; FEITOSA et al., 2000a, 2000b).

Além da latência, analisam-se, durante a realização do exame, a amplitude e a duração das respostas. A duração é medida do início do potencial até o ponto em que sua deflexão retorna à linha isoeétrica. A amplitude do potencial é a medida do pico

negativo ao pico positivo, e serve para determinar se existe ou não uma diminuição do número de axônios funcionantes, uma vez que ela está relacionada com o número de unidades motoras ativadas. Este é um parâmetro importante e deve ser cuidadosamente avaliado porque permite uma estimativa da porcentagem de fibras motoras sobreviventes quando de lesões. A amplitude depende também do tamanho do músculo escolhido e da posição e tipo de eletrodo (FEITOSA et al., 2000a; DUMITRU et al., 2002; PINTO, 2006).

Na degeneração axonal há uma perda de fibras nervosas e, portanto, uma diminuição na amplitude do potencial de ação muscular evocado, porque um menor número de fibras musculares é inervado (PINTO, 2006).

A duração é um parâmetro mais utilizado nas respostas motoras. Ela informa sobre a integridade das fibras de condução lenta, enquanto a latência informa sobre a integridade das fibras de condução rápida. Fibras nervosas isoladas variam consideravelmente em diâmetro e, portanto, na sua velocidade de condução. Essa variação na velocidade de condução resulta em diferenças no tempo em que um impulso demora para chegar no eletrodo registrador, o que acaba resultando numa dispersão temporal do potencial de ação, isto é, em sua duração. Em outras palavras, a duração do potencial de ação é um reflexo da sincronia com que as fibras musculares sofrem descargas no tempo. Assim, retardos de latência podem indicar comprometimento de fibras rápidas e o aumento na duração pode indicar um comprometimento de fibras lentas. Portanto, alterações nas duas (latência e duração) indicam uma lesão afetando os dois tipos de fibras. Em processos desmielinizantes a diminuição da velocidade de condução nervosa não é a mesma em todas as fibras, por este motivo ocorre também uma dispersão do potencial de ação (BRAUND, 1994; DUMITRU et al., 2002; PINTO, 2006).

Após uma estimulação nervosa distal, as fibras musculares são ativadas quase que sincronicamente pelos axônios motores que as inervam. Após uma estimulação proximal, no entanto, as diferenças nas velocidades de condução dos vários axônios motores resultam em uma dispersão temporal do potencial evocado, isto é, um potencial mais largo. Quanto maior a distância de condução, maior a dispersão

temporal e maior a discrepância entre as respostas evocadas ao nível proximal e distal. Quanto maior a sincronia com a qual os potenciais de ação musculares são iniciados na região do eletrodo registrador, maior será a amplitude e menor a duração do potencial. Portanto, uma neuropatia, por diminuir a sincronia e o número de potenciais de ação muscular iniciados, reduz a amplitude e aumenta a duração dos potenciais evocados (BRAUND, 1994; FEITOSA et al., 2000a).

Quando uma corrente elétrica é aplicada a um nervo periférico, as grandes fibras axonais atingem o limiar de disparo mais facilmente que as menores. A grande área das fibras maiores oferece menos resistência ao fluxo da corrente do que as pequenas. Desta forma, os grandes nervos periféricos são capazes de conduzir a uma velocidade maior do que os pequenos. Além disso, a mielinização e a distância internodal também determinam a velocidade de condução. Quanto maior a bainha de mielina, maior a distância internodal e maior a velocidade de condução nervosa (FEITOSA & USHIKOSHI, 2001).

SIMS & REDDING (1979), analisando os potenciais evocados nos músculos interósseos palmares através de estimulação dos nervos ulnar direito e esquerdo de cães clinicamente saudáveis, não constataram diferenças estatisticamente significativas entre os dois lados e obtiveram os seguintes valores; amplitude proximal (ao nível da articulação úmero-rádio-ulnar) de $23,3 \pm 4,7$ mV, amplitude distal (articulação carpo-radial) de $22,9 \pm 3,5$ mV, duração proximal de $4,9 \pm 0,4$ ms e duração distal de $4,2 \pm 0,3$ ms.

WALKER et al. (1979), em estudos eletroneurográficos da amplitude e duração dos potenciais evocados por estimulação dos nervos ulnar, tibial e peroneal, verificaram amplitudes médias obtidas nos músculos interósseos palmares após estimulação do nervo ulnar de $22,0 \pm 1,9$ mV, quando a estimulação era feita na face medial da articulação úmero-rádio-ulnar e $25,2 \pm 1,7$ mV quando a estimulação era um pouco acima do osso acessório do carpo. Para os mesmos pontos de estimulação, as durações dos potenciais foram $4,1 \pm 0,2$ ms e $4,0 \pm 0,2$ ms, respectivamente. Já o nervo tibial, que teve como sítios proximal e distal de estimulação o trocanter maior do fêmur e a face lateral do terço distal da tíbia, apresentou amplitudes e durações médias de

potenciais obtidos nos músculos interósseos plantares de $20,1 \pm 1,6$ mV e $4,6 \pm 0,2$ ms no sítio proximal, e $23,3 \pm 2,3$ mV e $4,0 \pm 0,2$ ms no sítio distal. Para os potenciais evocados no músculo tibial cranial após estimulação do nervo peroneal, a amplitude e duração médias na altura do trocanter maior do fêmur foram $19,8 \pm 1,4$ mV e $6,4 \pm 0,4$ ms, e ao nível da articulação fêmur-tibial $19,5 \pm 1,5$ mV e $6,6 \pm 0,3$ ms.

TAKAKURA e INADA (1983), estimulando o nervo ulnar direito e esquerdo na articulação úmero-rádio-ulnar (sítio proximal) e próximo ao osso acessório do carpo (sítio distal), verificaram potenciais evocados nos músculos interósseos palmares com amplitude média de $27,6 \pm 6,7$ mV e $28,0 \pm 8,5$ mV e duração média de $3,7 \pm 0,4$ ms e $3,5 \pm 0,5$ ms, respectivamente. Da mesma forma, estimulando o nervo tibial direito e esquerdo na articulação fêmur-tibial (sítio proximal) e próximo à tuberosidade calcânea (sítio distal) e registrando os potenciais nos músculos interósseos plantares, observaram amplitudes médias de $27,0 \pm 5,1$ mV e $32,7 \pm 6,4$ mV e duração média de $4,1 \pm 0,7$ ms e $3,8 \pm 0,6$ ms, respectivamente. Não foram constatadas diferenças entre a amplitude e a duração dos potenciais nos lados direito e esquerdo. Por outro lado, a amplitude do potencial obtida por estimulação proximal não diferiu daquela obtida por estimulação distal nos músculos interósseos palmares, mas a primeira foi bem menor do que a segunda no caso dos músculos plantares.

MALIK et al. (1989), comparando as características dos potenciais de ação dos músculos interósseos plantares obtidos por estimulação proximal e distal do nervo tibial, puderam constatar que o potencial distal (articulação tíbio-társica) possuía uma amplitude de $20,2 \pm 5,3$ mV e que, à medida que o sítio de estimulação era desviado proximalmente, o potencial tornava-se progressivamente menor e mais largo, até atingir uma amplitude de $16,2 \pm 4,3$ mV na fossa poplíteia e de $13,6 \pm 4,0$ mV sobre o trocanter maior do fêmur. Da mesma forma, na estimulação do nervo ulnar, obtiveram potenciais de ação nos músculos interósseos palmares com uma amplitude distal (sobre os ossos do carpo) de $16,2 \pm 4,3$ mV e proximal (articulação úmero-rádio-ulnar) de $12,8 \pm 3,9$ mV. Por outro lado, observando potenciais de ação registrados no músculo tibial cranial, após estimulação do nervo peroneal, verificaram uma amplitude distal (fossa poplíteia) de $26,9 \pm 6,1$ mV e proximal (trocanter maior do fêmur) de $25,6 \pm 5,5$ mV.

FEITOSA et al. (2000b), aplicando estímulos no nervo radial sobre a face cranial da articulação úmero-rádio-ulnar e sobre o terço médio do rádio, em sua face cranial, próximo à veia cefálica, e captando o estímulo sobre o músculo extensor digital comum, na face dorsal da articulação carpo-radial, obteve valores de $2,46 \pm 0,72$ ms e $1,58 \pm 0,62$ ms para as latências proximal e distal, respectivamente. Nos mesmos pontos, a amplitude de pico a pico e a duração foram $8,79 \pm 2,26$ mV e $2,85 \pm 0,76$ ms para o estímulo proximal, e $9,52 \pm 2,42$ mV e $2,71 \pm 0,75$ ms para o sítio de estimulação distal. No nervo ulnar, com captação sobre os músculos interósseos palmares e com estímulo proximal sobre a articulação úmero-rádio-ulnar, os valores de latência obtidos foram $4,17 \pm 0,53$ ms, de amplitude $10,72 \pm 2,60$ mV, e duração de $2,23 \pm 0,38$ ms; com estímulo distal sobre o terço distal da ulna os valores foram $2,67 \pm 0,38$ ms para a latência, $11,72 \pm 2,81$ mV para a amplitude e $2,04 \pm 0,35$ ms de duração.

Os mesmos autores (FEITOSA et al., 2000a) estimularam o nervo tibial nas regiões do trocanter maior do fêmur e sobre a face lateral da tíbia, próximo a veia cefálica, e registraram os valores sobre uma falange proximal ou média do segundo dedo. Para este nervo, com estimulação proximal, os valores de latência obtidos foram $6,55 \pm 0,86$ ms, a amplitude foi $7,33 \pm 1,37$ mV e a duração foi $1,65 \pm 0,38$ ms. Com estimulação distal a latência foi $3,09 \pm 0,53$ ms, a amplitude $9,92 \pm 2,08$ mV e a duração $1,59 \pm 0,43$ mV. No nervo peroneal a estimulação proximal foi feita sobre a região do trocanter maior do fêmur, e a distal sobre a face caudal da articulação fêmur-tibial, com captação sobre o músculo tibial cranial. Os valores obtidos neste nervo, com estimulação proximal, foram $3,86 \pm 1,14$ ms para latência, $7,89 \pm 2,10$ mV para amplitude e $2,11 \pm 0,84$ ms para duração. Com estimulação distal os valores foram de $2,40 \pm 1,14$ ms para latência, $8,01 \pm 2,20$ mV para amplitude e $2,00 \pm 0,74$ ms para duração.

A velocidade de condução nervosa é o maior auxílio no diagnóstico e monitorização de neuropatias periféricas. Nas neuropatias desmielinizantes a perda da mielina afeta diretamente a condução nervosa, observando-se um alentecimento ou um bloqueio na condução. O alentecimento da condução é resultado ou de um atraso na

excitação de nódulos sucessivos, mesmo quando a condução permanece saltatória, ou de uma reversão para uma condução contínua. Em um processo de desmielinização nem todas as fibras são afetadas com a mesma intensidade. Desta forma, as fibras conduzirão em diferentes velocidades, resultando numa dispersão temporal do potencial de ação evocado. Esta redução pode chegar a 70% dos valores normais, observando-se até velocidades de cinco a 10 m/s (NIEDERHAUSER & HOLLIDAY, 1989; PINTO, 2006).

A velocidade de condução nervosa pode permanecer normal, no limite inferior da normalidade ou um pouco diminuída, até que muitas fibras de grande diâmetro sejam afetadas. Se a lesão for severa o suficiente para causar perda da maioria ou de todas as fibras mielinizadas, a condução obviamente não ocorrerá (DUNCAN, 1980; NIEDERHAUSER e HOLLIDAY, 1989).

LEE & BOWEN (1970), SWALLOW & GRIFFITHS (1977), DUNCAN (1980), MALIK et al. (1989) e CHRISMAN & CLEMMONS (1993), determinando a velocidade de condução motora dos nervos ulnar e tibial, observaram valores de $60,0 \pm 1,7$ m/s, $60,0 \pm 5$ m/s, $60,7 \pm 5$ m/s, $61,4 \pm 9$ m/s e $60,0 \pm 1,1$ m/s para o nervo ulnar e valores de $60,0 \pm 1,1$ m/s, $61,0 \pm 5$ m/s, $60,8 \pm 4,9$ m/s, $68,3 \pm 4,2$ m/s e $60,0 \pm 1,7$ m/s para o nervo tibial, respectivamente.

Enquanto HOERLEIN (1978) afirmou que a velocidade de condução nervosa motora do nervo peroneal varia de 62 a 92 m/s, com uma média de 77m/s, WALKER et al. (1979) observaram velocidades médias de $79,8 \pm 1,8$ m/s e MALIK et al. (1989) obtiveram valores médios de $95,1 \pm 10,7$ m/s para a VCN do mesmo nervo.

De acordo com WALKER et al. (1979) a velocidade média de condução nervosa motora do nervo radial é $72,1 \pm 1,9$ m/s. FEITOSA et al. (2000a, 2000b), determinando os valores médios da velocidade de condução nervosa motora dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães, observaram valores de 66 m/s, 60 m/s, 58 m/s e 71 m/s, respectivamente.

O sistema nervoso periférico difere do sistema nervoso central em alguns aspectos fundamentais, como sua composição e capacidade de regeneração. Ainda, as

células de Schwann são muito ativas e resistentes a uma série de lesões naturais e experimentais (RIET-CORREA et al., 2002).

As duas principais respostas do nervo periférico a uma lesão baseiam-se no alvo do insulto, isto é, a célula de Schwann ou ao axônio. As doenças que afetam a célula de Schwann levam a uma perda da bainha de mielina, causando uma desmielinização segmentar. Em contraste, o acometimento primário do neurônio e de seu axônio produz uma degeneração axonal. Enquanto um dos dois processos tende a predominar, os dois estão geralmente presentes em vários graus, dependendo do estágio da doença (NIEDERHAUSER & HOLLIDAY, 1989; MUELLER et al., 2001; PINTO, 2006).

Histologicamente, a desmielinização segmentar ocorre quando existe uma disfunção da célula de Schwann ou um dano à bainha de mielina, sem anormalidade primária do axônio. Este processo não afeta todas as células e a mielina que está sendo desintegrada é englobada inicialmente por outras células de Schwann e, a seguir, por macrófagos. O axônio pode permanecer intacto, mas incapaz de conduzir impulsos, ou, em repetidos quadros de desmielinização, pode haver também lesão axonal. Nos casos em que o axônio está íntegro, células presentes no endoneuro possuem capacidade de substituir as células de Schwann lesadas, envolvê-lo e, com o passar do tempo, mielinizar a porção lesada. Porém, a nova bainha de mielina é fina em relação ao diâmetro do axônio (BRAUND et al., 1996; KOESTNER & JONES, 2000; MUELLER et al., 2001; SALVADORI et al., 2005; PINTO, 2006).

Fibras nervosas com menor diâmetro e espaços internodais mielinizados mais curtos são indicativos da ocorrência de um processo de remielinização. O diâmetro reduzido das fibras, junto com o aumento de fibras de colágeno induzem à formação de novos fascículos, compostos por fibras mais finas e em menor número (RIET-CORREA et al., 2002).

A degeneração axonal caracteriza-se pela destruição primária do axônio, com desintegração secundária de sua bainha de mielina. O dano axonal pode ser devido a um evento único e localizado, como um traumatismo ou uma isquemia, ou a uma anormalidade subjacente do neurônio (neuronopatia). Quando a degeneração axonal

ocorre como resultado de uma transecção, a porção distal da fibra sofre degeneração secundária ou Walleriana. Após um dia o axônio desintegra-se, e as células de Schwann afetadas começam a catabolizar a mielina e englobar fragmentos de axônios, formando pequenos compartimentos ovóides de mielina. Os macrófagos são recrutados para dentro da área, e participam na fagocitose dos detritos axonais e derivados da mielina. Nas neuropatias ou axonopatias de evolução lenta a evidência de desintegração da bainha de mielina é pequena, pois somente poucas fibras estão sofrendo degeneração num mesmo momento (KOESTNER & JONES, 2000; MUELLER et al., 2001).

Os cotos proximais dos axônios degenerados podem desenvolver novos cones de crescimento, que se estendem ao longo do trajeto do axônio degenerado. A presença de múltiplos axônios de pequeno calibre, intimamente agregados e delicadamente mielinizados, constitui uma evidência de regeneração. Esse crescimento de axônios é um processo vagaroso, na ordem de dois milímetros por dia. Esta regeneração é responsável por parte do potencial de recuperação funcional após uma lesão axonal periférica (MUELLER et al., 2001).

A perda da mielina sem degeneração axonal primária geralmente é desencadeada por reações imunomediadas. Nesses casos a bainha de mielina pode se regenerar, desde que o corpo celular mantenha-se intacto e que seja eliminado o fator desencadeador da reação auto-imune (STEVENS & LOWE, 2002).

O nervo periférico é susceptível a uma ampla variedade de doenças de etiologia inflamatória, infecciosa, traumática, metabólica, tóxica, genética e neoplásica. As neuropatias inflamatórias caracterizam-se pela presença de infiltrados celulares mononucleares, compostos por linfócitos, macrófagos e poucos plasmócitos, variando em distribuições escassas a grandes coleções de células disseminadas nas regiões endoneurais e perivenulares de todo o nervo. A desmielinização segmentar é a lesão primária, seguida por uma degeneração axonal, principalmente quando a doença for grave. Os focos inflamatórios, as alterações no tecido conjuntivo do endoneuro e a desmielinização, são amplamente distribuídos por todo o sistema nervoso periférico,

embora com intensidade variável (BRAUND et al., 1996; MUELLER et al., 2001; PRINZ et al., 2003).

Dentre as doenças parasitárias que podem causar neuropatias em cães encontram-se a toxoplasmose, a neosporose e a leishmaniose visceral. O *Toxoplasma gondii* pode causar degeneração axonal, desmielinização e ocasional presença de cistos endoneurais nas raízes nervosas e nervos periféricos. HASS et al. (1989) relataram que as manifestações neurológicas causadas pela toxoplasmose podem ser divididas em processo central (freqüentemente associada com uma rápida progressão do quadro clínico) e neuropatia periférica (freqüentemente associada com miosite). De forma semelhante, o *Neospora caninum* também pode causar desmielinização e degeneração axonal e, conseqüentemente, diminuição da velocidade de condução nervosa motora (BRAUND et al., 1996). WOLF et al. (1991), avaliando eletroneurograficamente cães com neosporose, relataram que os resultados foram compatíveis com uma neuropatia periférica.

Apesar dos relatos de neuropatias periféricas causadas por *Leishmania infantum* em seres humanos, a literatura veterinária é escassa no que diz respeito à descrição de sintomas neurológicos em cães com leishmaniose visceral, e os poucos trabalhos existentes referem-se a quadros de comprometimento do sistema nervoso central, exceto o de FEITOSA et al. (2000), que relataram sintomas compatíveis com lesões no sistema nervoso periférico (nervos cranianos).

Um único trabalho da literatura veterinária descreve a avaliação da velocidade de condução nervosa motora em cães com leishmaniose visceral. Este, foi realizado por VAMVAKIDIS et al. (2000), com nove cães, nos quais não foram observadas alterações na velocidade de condução nervosa do nervo tibial, que se encontravam variando de 67 a 69 ms.

Desta forma, partindo-se da hipótese de que a leishmaniose visceral causa uma neuropatia periférica em cães, o presente ensaio teve como objetivos analisar as alterações eletroneurográficas e histopatológicas dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos pela doença, na tentativa de se obter uma melhor compreensão da fisiopatogenia da mesma no sistema nervoso periférico.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização dos exames

Os exames eletroneurográficos foram realizados no Laboratório de Eletroneuromiografia do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, do Curso de Medicina Veterinária, da Faculdade de Odontologia, UNESP, *campus* de Araçatuba.

Animais

Foram avaliados 37 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba – SP.

A confirmação da infecção por *Leishmania* sp. baseou-se no achado de formas amastigotas do parasita no exame citológico das punções biopsia aspirativa de linfonodo, baço e fígado, e na reação sorológica imunoenzimática (ELISA). De forma semelhante, a exclusão da infecção teve como critérios a ausência de sintomas e exames sorológico e parasitológico negativos.

O primeiro grupo (Grupo LVC) foi constituído por 33 animais naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, e o segundo (Grupo controle), por quatro cães sem a doença. Os cães eram adultos, machos ou fêmeas, e não possuíam raça definida.

Baseando-se na determinação da velocidade de condução nervosa motora, para cada nervo, os animais do grupo com leishmaniose visceral canina foram subdivididos em dois outros grupos. Um com evidências eletroneurográficas de desmielinização, degeneração axonal (Grupo LVC VCN-d) ou com evidência de ambas, e outro sem evidências eletroneurográficas de neuropatias (Grupo LVC VCN-n). Para tanto, foram considerados como referência os valores obtidos nos quatro cães do Grupo controle.

Delineamento experimental

Inicialmente os animais eram submetidos a um exame físico com ênfase no exame neurológico, e à colheita de sangue total. Para a realização da eletroneurografia os cães receberam medicação pré-anestésica à base de acepromazina¹ na dose de 0,055 mg/kg por via intravenosa, seguida, 15 minutos depois, de uma indução e manutenção anestésica com pentobarbital sódico² na dose de 15mg/kg/IV. Após o término do exame realizava-se a eutanásia, com aprofundamento do plano anestésico e aplicação de uma ampola de cloreto de potássio a 19,1%³, conforme procedimentos recomendados pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2002). Os cães com leishmaniose visceral foram submetidos à eutanásia seguindo-se as recomendações do Ministério da Saúde, em cumprimento ao Decreto nº. 51.838, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores da doença devem ser submetidos à eutanásia. Os cães do grupo controle foram submetidos à eutanásia por se tratarem de animais provenientes do CCZ de Araçatuba, que realiza o mesmo procedimento em cães doados por proprietários.

Após a eutanásia eram realizadas as biopsias aspirativas de linfonodos, medula óssea, fígado e baço para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp., e colhidos os fragmentos de nervos para posterior processamento histopatológico. Os nervos submetidos à análise histopatológica foram os mesmos avaliados por meio de eletroneurografia, entretanto as amostras foram obtidas do membro contralateral ao da realização da eletroneurografia.

Colheita das amostras

Sangue total

Amostras de 20 mL de sangue eram colhidas por punção da veia jugular externa, com agulhas 25x8mm acopladas a tubos vacutainer siliconizados. O sangue era mantido à temperatura ambiente até a coagulação e retração visível do coágulo. Em seguida sofria centrifugação a 3.000 r.p.m., durante 5 minutos, para melhor separação

¹ Acepran 0,2% – Univet AS Indústria veterinária – São Paulo, SP

² Hypnol 3% – Fortoveter – Itapira – SP

³ Cloreto de potássio a 19,1% – Darrow – Rio de Janeiro, RJ

do soro, que era transferido para frascos plásticos apropriados, com o auxílio de uma pipeta automática, e congelado imediatamente a -20°C até o momento do seu processamento.

Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. no soro

As reações sorológicas imunoenzimáticas (ELISA) para pesquisa de IgG anti-*Leishmania* sp. no soro foram realizadas no Laboratório de Imunologia do Curso de Medicina Veterinária da UNESP, *campus* de Araçatuba, segundo o método descrito por LIMA et al. (2005)⁴. A densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 492nm, utilizando-se leitor de ELISA⁵. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida das amostras em triplicata.

Eletroneurografia

Para a realização dos testes eletroneurográficos utilizou-se um equipamento de eletroneuromiografia da marca VIASYS⁶ - modelo Viking Quest - com dois canais, portátil (Figura 1). Os nervos avaliados foram o radial, ulnar, peroneal e tibial. Para cada nervo foram avaliados os seguintes parâmetros: latência (ms), amplitude (mV), duração dos potenciais de ação (ms) e velocidade de condução nervosa motora (m/s). A distância (mm) entre os pontos de estimulação e captação foi medida com fita métrica inelástica, sempre com o membro estendido.

A estimulação foi feita com um estimulador manual, com duas barras fixas (um cátodo e um ânodo) separadas por uma distância de três centímetros. O controle da intensidade do estímulo era realizado no próprio estimulador, variando de zero a 180V (Figura 2A). Os estímulos foram supramáximos, espaçados em um segundo, com duração de 0,05ms. Os eletrodos registrador (ativo), referência e terra, colocados na superfície da pele, eram do tipo jacaré,⁷ ou placa retangular com dois pólos⁸ ou, ainda,

⁴ Apêndice A - Técnica de ELISA para Leishmaniose Visceral descrita por LIMA et al. (2005)

⁵ Labsystems Multiskan EX - Thermo Fisher Scientific Inc. – Waltham, MA.

⁶ Nicolet Compass Meridian® - Nicolet Biomedical Inc.® - EUA

⁷ Alfamedic® - Brasil

⁸ Alfamedic® - Brasil

em forma de adesivos retangulares⁹ (1,5 x 2,0 cm), na dependência do tamanho do animal (Figura 2B, 2C e 2D). A faixa de filtragem do aparelho foi calibrada de dois a 10KHz, com varredura de tela de dois milisegundos por dois microvolts por divisão.

Antes da colocação dos eletrodos foi realizada uma tricotomia da região, seguida de limpeza do local com álcool, para retirada de sujidades e gordura da superfície cutânea a fim de diminuir a impedância da pele. Em alguns animais a pele foi escarificada. Os locais dos eletrodos de captação do tipo Jacaré foram constantemente umedecidos com álcool, com o mesmo objetivo. Os eletrodos de estimulação, e os de captação tipo barra, e os tipo placa, foram utilizados com gel eletrolítico para melhorar o contato elétrico entre eles e a pele, conforme recomendado por PINTO (2006).

Durante todo o exame a temperatura ambiente foi controlada e mantida por volta de 22° C a 24° C, e a temperatura dos animais foi aferida antes da avaliação de cada nervo, mantendo-se o animal aquecido por meio de colchão térmico.

⁹ Neuroline® - Malásia



Figura 1. Aparelho de eletroneuromiografia do Laboratório de Eletroneuromiografia do Hospital Veterinário do Curso de Medicina Veterinária, Unesp – *campus* de Araçatuba – SP.

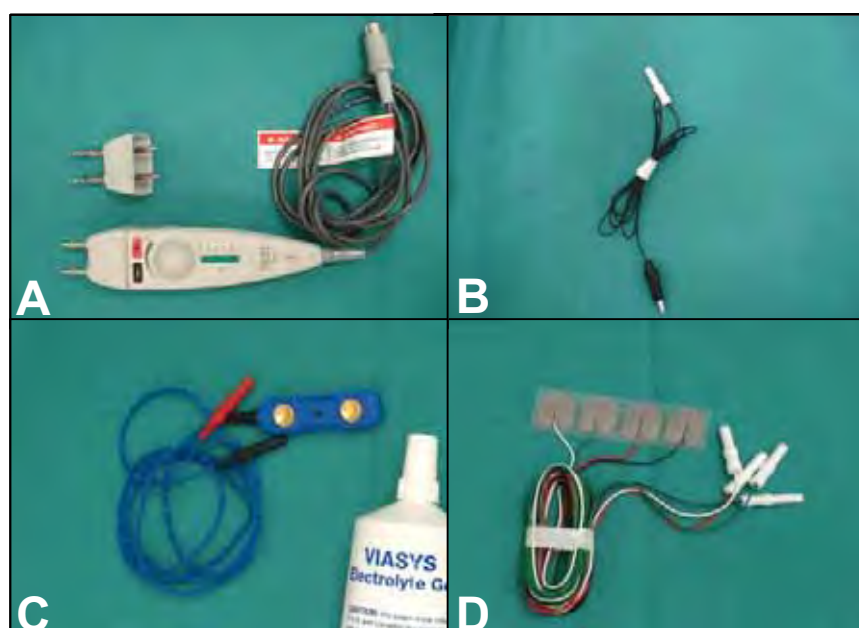


Figura 2. Estimulador utilizado para realização dos exames de eletroneurografia (A). Eletrodos de captação tipo jacaré (B), tipo placa retangular com dois pólos (C) e tipo adesivos retangulares (D). Laboratório de Eletroneuromiografia do Hospital Veterinário do Curso de Medicina Veterinária, Unesp – *campus* de Araçatuba – SP.

Os pontos de estimulação e captação dos nervos foram os mesmos descritos por FEITOSA et al. (2000a, 2000b), a saber:

- Para o nervo radial o eletrodo registrador foi colocado sobre a face dorsal da articulação carpo-radial, próximo à emergência dos ramos dorsais digitais comuns, sobre o músculo extensor digital comum; e o eletrodo referência colocado três centímetros distalmente ao registrador, sobre os ossos do carpo ou as falanges proximais. O eletrodo terra foi posicionado sobre a face medial do membro, entre os eletrodos registrador e referência. Realizou-se a estimulação proximal sobre a face cranial da articulação úmero-rádio-ulnar, e a distal sobre o terço médio do rádio, em sua face cranial, próximo à veia cefálica (Figura 3).

- Para o nervo ulnar o eletrodo registrador foi colocado sobre os músculos interósseos palmares, e o referência a três centímetros distalmente, sobre uma falange do quarto dedo. O eletrodo terra foi mantido sobre o osso acessório do carpo. A estimulação proximal foi aplicada sobre a face medial da articulação úmero-rádio-ulnar, e a distal sobre a face caudal do terço distal da ulna (Figura 4).

- A estimulação proximal do nervo tibial foi realizada com o estimulador sobre o trocanter maior do fêmur, e a distal com o estimulador sobre a face lateral do terço distal da tíbia, próximo à veia safena. Os eletrodos registradores e referência foram colocados sobre os músculos interósseos plantares e, a três centímetros de distância, sobre uma falange proximal ou média do segundo dedo, respectivamente. O eletrodo terra foi posicionado sobre a tuberosidade calcânea (Figura 5).

- O nervo peroneal foi avaliado mantendo-se o eletrodo registrador sobre o músculo tibial cranial, e o eletrodo referência a três centímetros distal do mesmo, sobre os ossos do tarso. O eletrodo terra foi colocado sobre a face lateral da tíbia. A estimulação proximal foi realizada na região do trocanter maior do fêmur e a distal na face caudal da articulação fêmur-tibial (Figura 6).

Em todos os animais os nervos foram testados duas vezes e os valores comparados. Nos casos de discrepância de resultados os dados foram desconsiderados.

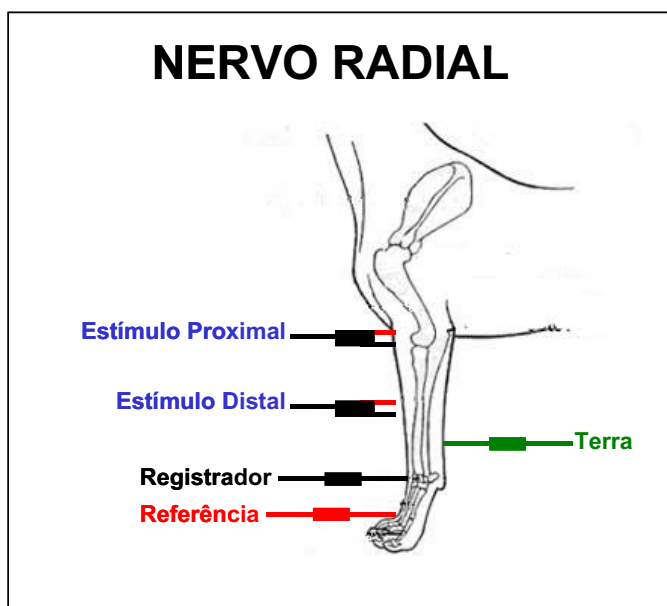


Figura 3. Desenho esquemático dos pontos de estimulação (estímulo proximal e distal), captação (registrador) e colocação dos eletrodos terra e referência, para a avaliação da velocidade de condução nervosa motora do nervo radial. (Jaboticabal – SP, 2008)

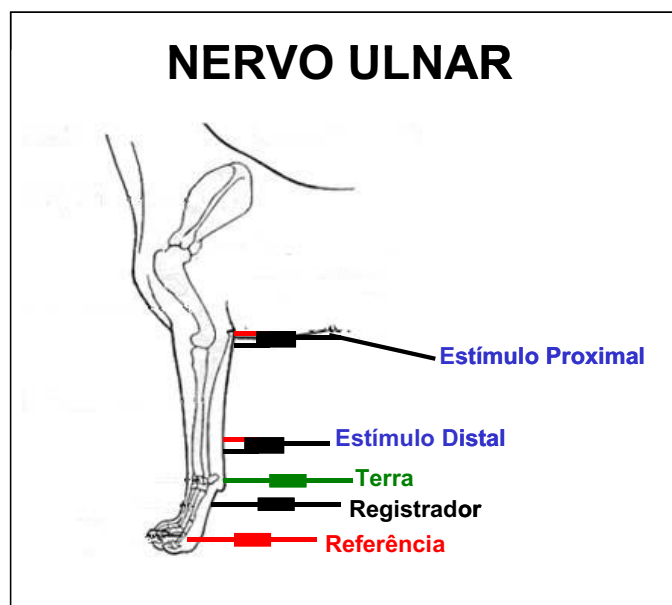


Figura 4. Desenho esquemático dos pontos de estimulação (estímulo proximal e distal), captação (registrador) e colocação dos eletrodos terra e referência, para a avaliação da velocidade de condução nervosa motora do nervo ulnar. (Jaboticabal – SP, 2008)

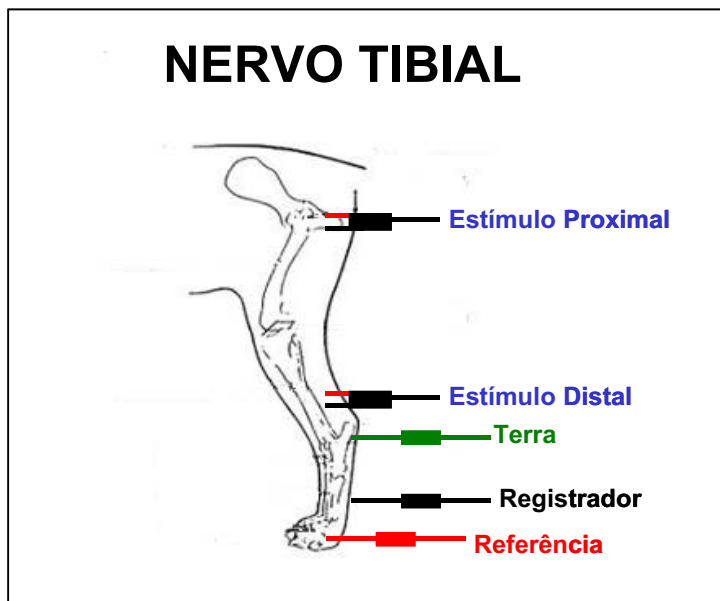


Figura 5. Desenho esquemático dos pontos de estimulação (estímulo proximal e distal), captação (registrador) e colocação dos eletrodos terra e referência, para a avaliação da velocidade de condução nervosa motora do nervo tibial. (Jaboticabal – SP, 2008)

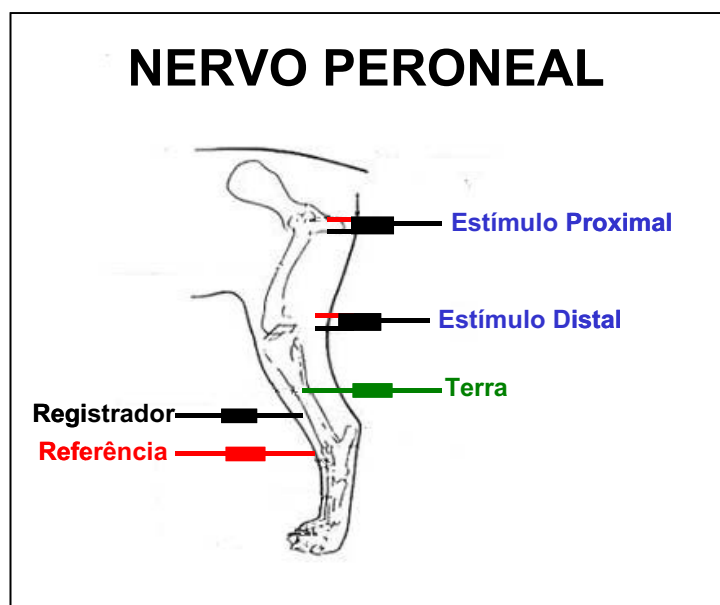


Figura 6. Desenho esquemático dos pontos de estimulação (estímulo proximal e distal), captação (registrador) e colocação dos eletrodos terra e referência, para a avaliação da velocidade de condução nervosa motora do nervo peroneal. (Jaboticabal – SP, 2008)



Figura 7. Fotografia onde se observa a realização de eletroneurografia do nervo radial em cão. Estimulação proximal sobre a face dorsal da articulação carpo-radial e colocação dos eletrodos, para a avaliação da velocidade de condução nervosa motora. (Jaboticabal – SP, 2008)

Exame citológico de linfonodo, baço e fígado

As punções biopsia aspirativas de linfonodo, medula óssea, fígado e baço foram realizadas com agulhas hipodérmicas 25x7mm, acopladas a uma seringa de 10mL. Os esfregaços foram realizados imediatamente após a colheita do material, secos ao ar e corados com corante hematológico¹⁰ para posterior observação ao microscópio de luz em aumento de 100x, e pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

Colheita dos fragmentos de nervos

Após a eutanásia foram colhidos fragmentos dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal. As colheitas foram alternadas de maneira a obterem-se amostras do membro direito e esquerdo, sendo sempre realizadas no membro contralateral ao da realização da eletroneurografia. Os fragmentos foram fixados em solução de formalina a 10% tamponada com fosfatos (ph 7,4) para posterior processamento histopatológico.

Exame histopatológico

Colheu-se uma amostra de dois centímetros de comprimento de cada nervo avaliado, a qual foi fixada em formalina tamponada por 24 horas e, então, armazenada em álcool 70°. De cada fragmento de nervo foram feitos cortes transversais seriados de três a cinco micrômetros de espessura, corados com hematoxilina-eosina (HE), Tricrômico de Massom (TM), Vermelho Congo (VC), Luxol Fast Blue (LX) e Azul de Toluidina (AT). Nos cortes histológicos corados por HE foram avaliados os aspectos morfológicos genéricos do nervo, com especial atenção às alterações como diferenças no tamanho das fibras nervosas, presença de processos inflamatórios e modificações estruturais. Naqueles corados com Tricrômico de Massom, foram evidenciadas as fibras do tecido conjuntivo nervoso para a avaliação do tamanho das mesmas, da presença de degeneração e/ou regeneração axonal, e presença ou ausência de fibrose e sua quantificação. A coloração com Vermelho Congo procurou identificar a presença de substância amilóide. Nos cortes corados com Luxol Fast Blue e Azul de Toluidina foram evidenciadas a presença ou ausência da bainha de mielina axonal.

¹⁰ Panótico Rápido – Laborclin – Curitiba, PR

Análise Estatística

Para a comparação dos resultados eletroneurográficos entre os três grupos foi determinada a média e o desvio padrão de cada parâmetro analisado, e a comparação entre os grupos foi realizada pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5%. Utilizou-se o programa Graphpad Prism® (3.00, 1999).

Os resultados dos exames histopatológicos foram demonstrados por meio de análise descritiva das ocorrências e distribuição de frequências. A comparação entre os grupos foi feita pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5%, somando-se o número de nervos que apresentavam alterações histopatológicas. Utilizou-se o programa Graphpad Prism® (3.00, 1999).

IV. RESULTADOS

Dos 33 cães com diagnóstico de leishmaniose visceral (Apêndice B), 15 (45,45%) eram assintomáticos e 18 (54,55%) sintomáticos. Esses apresentavam diferentes graus de emagrecimento, moderada a intensa atrofia muscular, principalmente em membros pélvicos, chegando à caquexia. Um cão apresentava tosse produtiva, outro hematoquesia, três tinham pododermatite, três secreção ocular purulenta, quatro hiperqueratose de coxins, calos de apoio e saliências ósseas, e seis, lesões dermatológicas, como lesões ulcerativas difusas pelo corpo, disqueratinização sem presença de úlceras cutâneas. Um único animal (L18) apresentou alterações ao exame neurológico, onde se identificou paresia dos membros pélvicos, associada à intensa atrofia muscular dos mesmos. Nos outros 17 não foram observados distúrbios locomotores ou neurológicos (Apêndice C).

Eletroneurografia

Não foi possível utilizar os resultados da eletroneurografia dos quatro nervos em todos os cães com leishmaniose visceral. Apesar de todos os animais terem sido submetidos a um exame completo (nervos radial, ulnar, tibial e peroneal), optou-se por utilizar somente os resultados em que se obteve uma repetibilidade dos dados.

Desta forma, dos 33 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Grupo LVC), em 26 foram consideradas as avaliações do nervo ulnar; em 22, dos nervos radial e peroneal e em 20 do nervo tibial.

Como 13 cães com leishmaniose visceral possuíam, pelo menos, um nervo com VCN dentro dos valores de normalidade (Quadro 1), decidiu-se realizar a análise estatística para cada nervo e não por animal. Deste modo, evitou-se um desvio padrão muito elevado dentro do grupo. Assim sendo, o Grupo LVC contou com 66 nervos com diminuição da VCN e 24 nervos com VCN normal.

Quadro 1. Resultados da avaliação da velocidade de condução nervosa motora (VCNM), dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. (Jaboticabal - SP, 2008)

Animal	VCNM			
	<i>n. Radial</i>	<i>n. Ulnar</i>	<i>n. Tibial</i>	<i>n. Peroneal</i>
L1	-	-	Normal	Diminuída
L2	Diminuída	-	-	Diminuída
L3	Normal	Diminuída	-	Diminuída
L4	Normal	Normal	-	Diminuída
L5	Normal	Diminuída	Normal	-
L6	Normal	-	-	Diminuída
L7	Diminuída	-	-	Diminuída
L8	-	Diminuída	Diminuída	Diminuída
L9	Diminuída	Diminuída	Diminuída	-
L10	-	Diminuída	-	-
L11	Normal	Normal	Normal	Diminuída
L12	Normal	Normal	Normal	-
L13	-	Normal	Diminuída	Diminuída
L14	Diminuída	-	Diminuída	-
L15	Diminuída	Normal	Diminuída	Normal
L16	-	Diminuída	Diminuída	Diminuída
L17	Normal	Diminuída	Diminuída	-
L18	-	Normal	Diminuída	-
L19	Diminuída	Diminuída	Diminuída	-
L20	Normal	Diminuída	-	Diminuída
L21	-	Normal	Normal	Diminuída
L22	Diminuída	Diminuída	-	-
L23	Diminuída	Diminuída	Diminuída	Diminuída
L24	-	-	-	Diminuída
L25	Normal	Diminuída	Diminuída	Diminuída
L26	-	Diminuída	-	-
L27	Normal	Diminuída	-	Diminuída
L28	Diminuída	Diminuída	-	Diminuída
L29	Diminuída	Diminuída	-	Diminuída
L30	-	Diminuída	Diminuída	Diminuída
L31	-	-	Diminuída	-
L32	Diminuída	Diminuída	Diminuída	Diminuída
L33	Diminuída	Normal	Diminuída	Diminuída

Os valores médios e desvios-padrões das medidas das latências obtidas por meio de estimulação proximal e distal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal dos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com e sem alterações na

velocidade de condução nervosa motora, e do grupo controle encontram-se apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as latências médias obtidas por estimulação proximal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal, entre os três grupos (Tabela 1). Verificou-se que a latência obtida por estimulação distal do nervo radial apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrões ($\bar{x} \pm s$) das latências (ms) dos potenciais de ação obtidos por meio de estimulação proximal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com velocidade de condução nervosa diminuída (Grupo LVC VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora normal (Grupo LVC VCN-n), e de cães negativos para leishmaniose visceral (Grupo Controle). n = número de nervos avaliados. (Jaboticabal - SP, 2008)

Nervo	Grupo						p*
	LVC VCN-d		LVC VCN-n		Controle		
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	
Radial	12	2,38 ± 0,35 a	10	2,41 ± 0,53 a	4	3,70 ± 1,47 a	0,0592
Ulnar	18	4,25 ± 1,29 a	8	3,65 ± 0,41 a	4	4,38 ± 1,23 a	0,2482
Tibial	15	6,56 ± 1,61 a	5	6,14 ± 1,05 a	4	5,98 ± 1,97 a	0,7809
Peroneal	21	3,82 ± 0,82 a	1	4,50 a	4	4,10 ± 0,50 a	0,5429

* valor descritivo do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$);
médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

Tabela 2. Valores médios e desvios-padrões ($\bar{x} \pm s$) das latências (ms) dos potenciais de ação obtidos por meio de estimulação distal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com velocidade de condução nervosa diminuída (Grupo LVC VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora normal (Grupo LVC VCN-n), e de cães negativos para leishmaniose visceral (Grupo Controle). n = número de nervos avaliados. (Jaboticabal - SP, 2008)

Nervo	Grupo						p*
	LVC VCN-d		LVC VCN-n		Controle		
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	
Radial	12	1,52 ± 0,19 a	10	1,75 ± 0,51 ab	4	2,88 ± 1,42 b	0,0354*
Ulnar	18	2,58 ± 0,78 a	8	2,55 ± 0,55 a	4	2,98 ± 0,78 a	0,5803
Tibial	15	3,63 ± 1,00 a	5	3,54 ± 0,42 a	4	3,63 ± 1,15 a	0,9899
Peroneal	21	2,20 ± 0,68 a	1	3,80 a	4	2,45 ± 0,53 a	0,2196

* valor descritivo do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$);
médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

Os valores médios e desvios-padrões das amplitudes dos potenciais de ação obtidos por meio de estimulação proximal e distal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal dos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com e sem alterações na velocidade de condução nervosa motora, e do grupo controle encontram-se apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Os valores médios de amplitude dos potenciais de ação obtidos por estimulação proximal e distal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal não diferiram estatisticamente entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 3. Valores médios e desvios-padrões ($\bar{x} \pm s$) das amplitudes (mV) dos potenciais de ação obtidos por meio de estimulação proximal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com velocidade de condução nervosa diminuída (Grupo LVC VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora normal (Grupo LVC VCN-n), e de cães negativos para leishmaniose visceral (Grupo Controle). n = número de nervos avaliados. (Jaboticabal - SP, 2008)

Nervo	Grupo						p*
	LVC VCN-d		LVC VCN-n		Controle		
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	
Radial	12	3,06 ± 1,54 a	10	3,12 ± 1,31a	4	1,93 ± 1,09 a	0,2572
Ulnar	18	5,48 ± 2,48 a	8	8,46 ± 3,98 a	4	5,45 ± 3,28 a	0,1273
Tibial	15	4,55 ± 3,55 a	5	3,18 ± 1,28 a	4	3,25 ± 2,33 a	0,5895
Peroneal	21	2,87 ± 1,99 a	1	3,70 a	4	2,95 ± 2,86 a	0,6796

* valor descritivo do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$);
médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

Tabela 4. Valores médios e desvios-padrões ($\bar{x} \pm s$) das amplitudes (mV) dos potenciais de ação obtidos por meio de estimulação distal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com velocidade de condução nervosa diminuída (Grupo LVC VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora normal (Grupo LVC VCN-n), e de cães negativos para leishmaniose visceral (Grupo Controle). n = número de nervos avaliados. (Jaboticabal - SP, 2008)

Nervo	Grupo						p*
	LVC vcn-d		LVC vcn-n		Controle		
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	
Radial	12	3,30 ± 2,08 a	10	3,14 ± 1,96 a	4	2,03 ± 1,20 a	0,4563
Ulnar	18	6,86 ± 3,16 a	8	8,79 ± 4,76 a	4	3,78 ± 1,96 a	0,1394
Tibial	15	6,65 ± 5,51 a	5	4,40 ± 2,23 a	4	3,43 ± 1,40 a	0,4556
Peroneal	21	3,13 ± 2,74 a	1	3,50 a	4	3,65 ± 2,85 a	0,6562

* valor descritivo do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$);
médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

Os valores médios e desvios-padrões das durações dos potenciais de ação obtidos por meio de estimulação proximal e distal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal dos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com e sem alterações na velocidade de condução nervosa motora, e do grupo controle, encontram-se apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as durações obtidas nos potenciais de ação dos nervos estudados.

Tabela 5. Valores médios e desvios-padrões ($\bar{x} \pm s$) das durações (ms) dos potenciais de ação obtidos por meio de estimulação proximal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com velocidade de condução nervosa diminuída (Grupo LVC VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora Normal (Grupo LVC VCN-n), e de cães negativos para leishmaniose visceral (Grupo Controle). n = número de nervos avaliados. (Jaboticabal - SP, 2008)

Nervo	Grupo						p*
	LVC VCN-d		LVC VCN-n		Controle		
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	
Radial	12	5,09 ± 1,61 a	10	5,13 ± 1,83 a	4	6,13 ± 2,26 a	0,5545
Ulnar	18	4,28 ± 1,01 a	8	4,24 ± 0,99 a	4	5,03 ± 0,92 a	0,2750
Tibial	15	4,61 ± 1,20 a	5	4,58 ± 1,02 a	4	4,63 ± 1,25 a	0,9993
Peroneal	21	6,71 ± 1,92 a	1	3,50 a	4	5,75 ± 1,02 a	0,1692

* valor descritivo do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$);
médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

Tabela 6. Valores médios e desvios-padrões ($\bar{x} \pm s$) das durações (ms) dos potenciais de ação obtidos por meio de estimulação distal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com velocidade de condução nervosa diminuída (Grupo LVC VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora normal (Grupo LVC VCN-n), e de cães negativos para leishmaniose visceral (Grupo Controle). n = número de nervos avaliados. (Jaboticabal - SP, 2008)

Nervo	Grupo						p*
	LVC VCN-d		LVC VCN-n		Controle		
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	
Radial	12	4,38 ± 1,48 a	10	5,10 ± 2,13 a	4	6,48 ± 2,22 a	0,2562
Ulnar	18	3,88 ± 0,92 a	8	4,35 ± 1,27 a	4	4,48 ± 0,85 a	0,4600
Tibial	15	3,65 ± 1,11 a	5	3,44 ± 0,72 a	4	4,25 ± 0,72 a	0,2217
Peroneal	21	7.07 ± 1.73 a	1	2.50 a	4	6.83 ± 2.27 a	0,2362

* valor descritivo do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$);
médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

Os valores médios e desvios-padrões das velocidades de condução nervosa motora dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal dos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e do grupo controle encontram-se apresentados na Tabela 7 e Figura 8.

Os valores de velocidade de condução nervosa dos quatro nervos estudados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos LVC com velocidade de condução nervosa motora diminuída e controle. As médias do grupo LVC com velocidade de condução nervosa motora normal não diferiram das médias do grupo controle. Os nervos radial, ulnar e tibial apresentaram médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos com velocidade de condução nervosa motora diminuída e com velocidade de condução nervosa motora normal.

Os valores individuais de latência inicial, amplitude, duração e velocidade de condução nervosa motora de cada nervo examinado estão relacionados no Apêndice D.

Se observa na Figura 9 apresenta exemplos de potenciais evocados obtidos por estimulação nervosa motora do nervo ulnar após estímulo proximal e distal.

Tabela 7. Valores médios e desvios-padrões ($\bar{x} \pm s$) das velocidades de condução nervosa motora (m/s) dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com velocidade de condução nervosa diminuída (Grupo LVC VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora normal (Grupo LVC VCN-n), e de cães negativos para leishmaniose visceral (Grupo Controle). n = número de nervos avaliados. (Jaboticabal - SP, 2008)

Nervo	Grupo						p*
	LVC VCN-d		LVC VCN-n		Controle		
	N	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	
Radial	12	57,26 ± 10,90 a	10	72,29 ± 2,45 b	4	79,00 ± 10,36 b	0,0001*
Ulnar	18	52,72 ± 7,10 a	8	68,75 ± 8,09 b	4	62,53 ± 2,13 b	<0,0001*
Tibial	15	53,27 ± 7,98 a	5	67,46 ± 4,39 b	4	70,96 ± 9,44 b	0,0013*
Peroneal	21	61,93 ± 7,90 a	1	92,86 ab	4	85,59 ± 8,55 b	0,0036*

* valor descritivo do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$);
médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

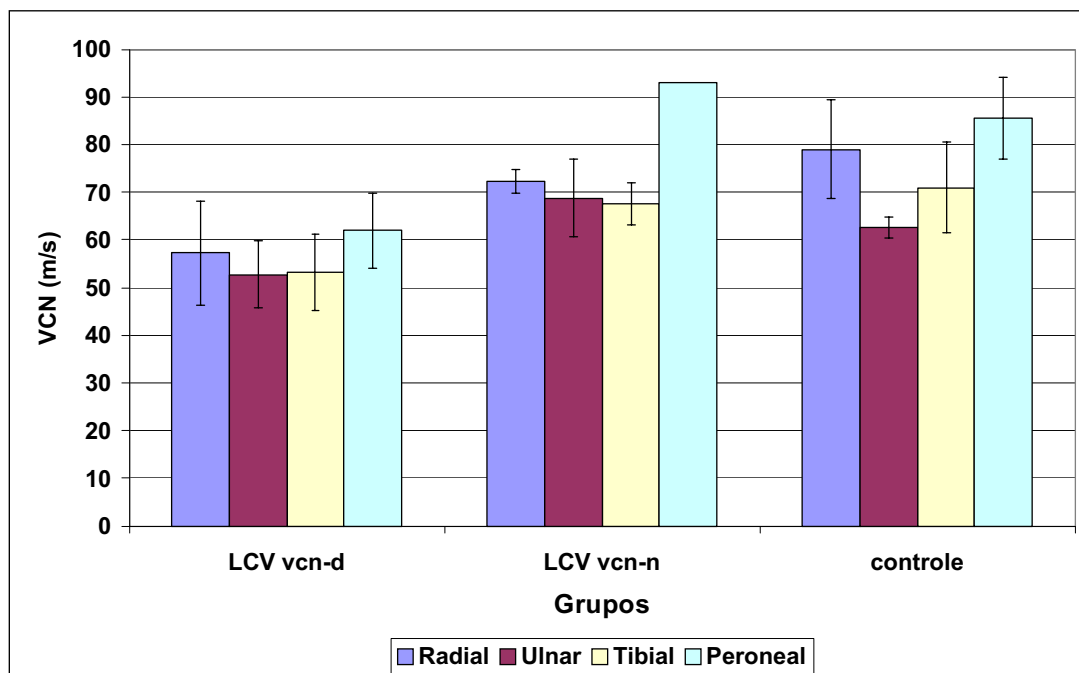


Figura 8. Velocidades médias de condução nervosa motora (m/s) dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com velocidade de condução nervosa diminuída (Grupo LCV VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora normal (Grupo LCV VCN-n), e de cães negativos para leishmaniose visceral (Grupo Controle). (Jaboticabal - SP, 2008)

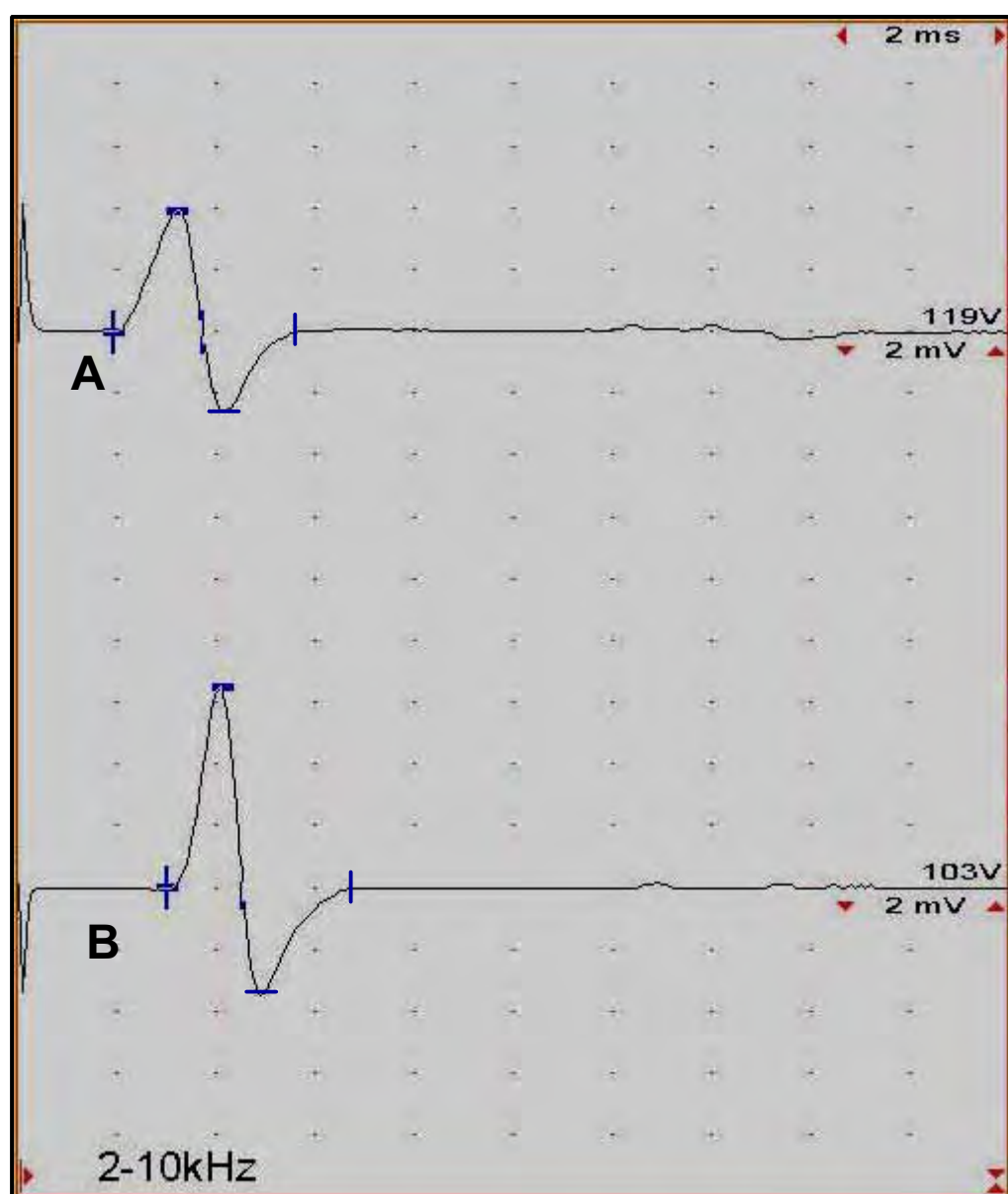


Figura 9. Potenciais evocados obtidos por estimulação nervosa motora do nervo ulnar, após estímulo proximal (**A**) e distal (**B**). (Jaboticabal - SP, 2008)

Exame histopatológico

Não foi possível realizar o exame histopatológico de todos os fragmentos colhidos, pois devido a falhas no processamento do material, algumas amostras foram desprezadas. Deste modo, foram analisadas 18 amostras do nervo radial, 19 do nervo ulnar, 18 do nervo tibial e 16 do nervo peroneal.

As alterações observadas na avaliação histopatológica dos nervos foram; aumento de tecido conjuntivo no endoneuro e perineuro, degeneração axonal, desmielinização, fibrose no endoneuro, infiltrado inflamatório no perineuro, infiltrado inflamatório no tecido adiposo adjacente ao perineuro, infiltrado inflamatório no endoneuro, variação no diâmetro de fibras nervosas e vasculite no tecido adiposo adjacente ao epineuro (Figuras 10 e 11).

Não foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos fragmentos dos nervos avaliados.

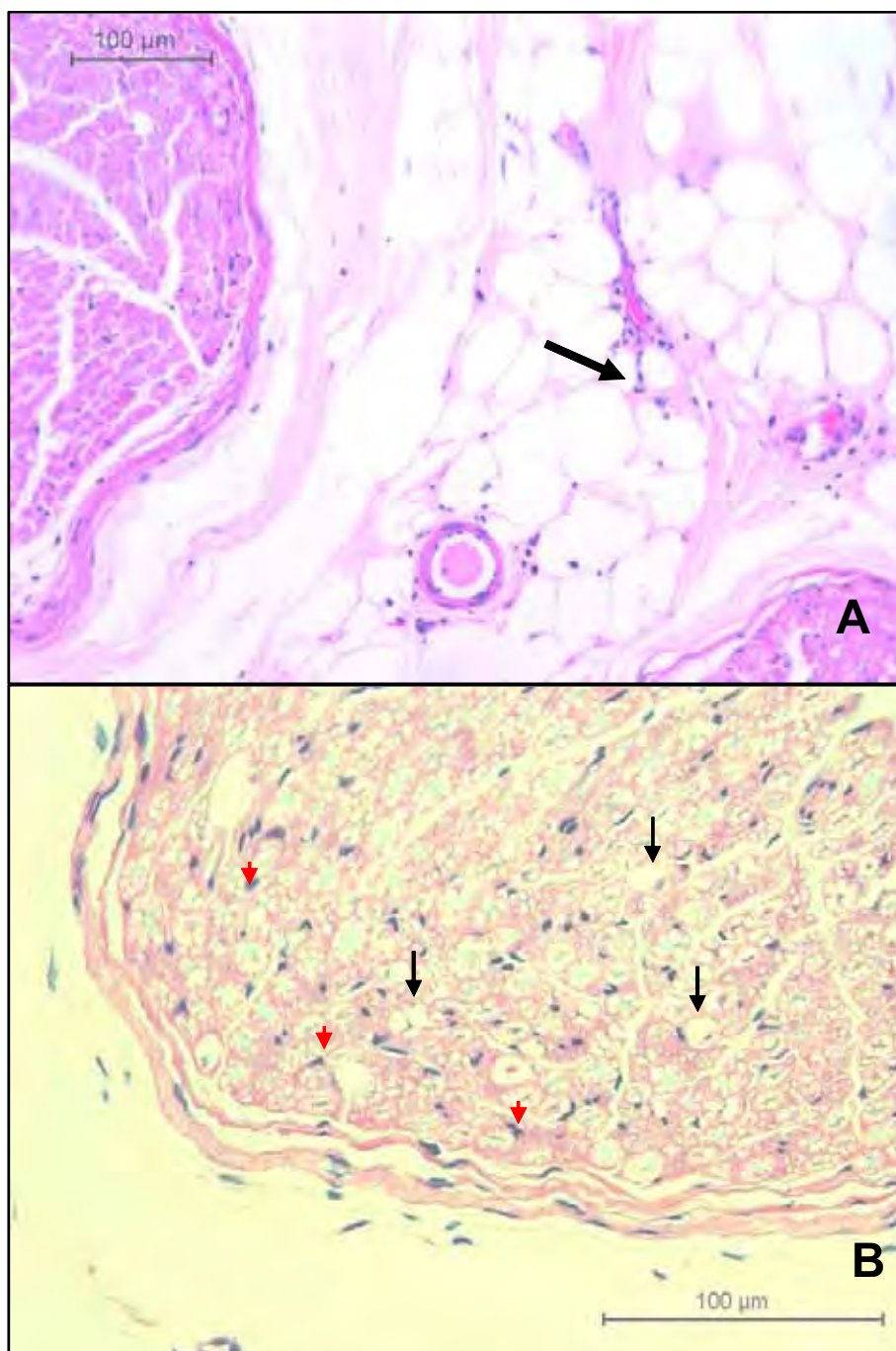


Figura 10. Fotomicrografias de nervos de cães com leishmaniose visceral - (A) infiltrado inflamatório em tecido adiposo adjacente ao perineuro – HE 20x., (B) Corte transversal, notar os núcleos das células de Schwann (**setas vermelhas**) e axônios degenerados (**setas pretas**) – HE 40x. (Jaboticabal – SP, 2008).

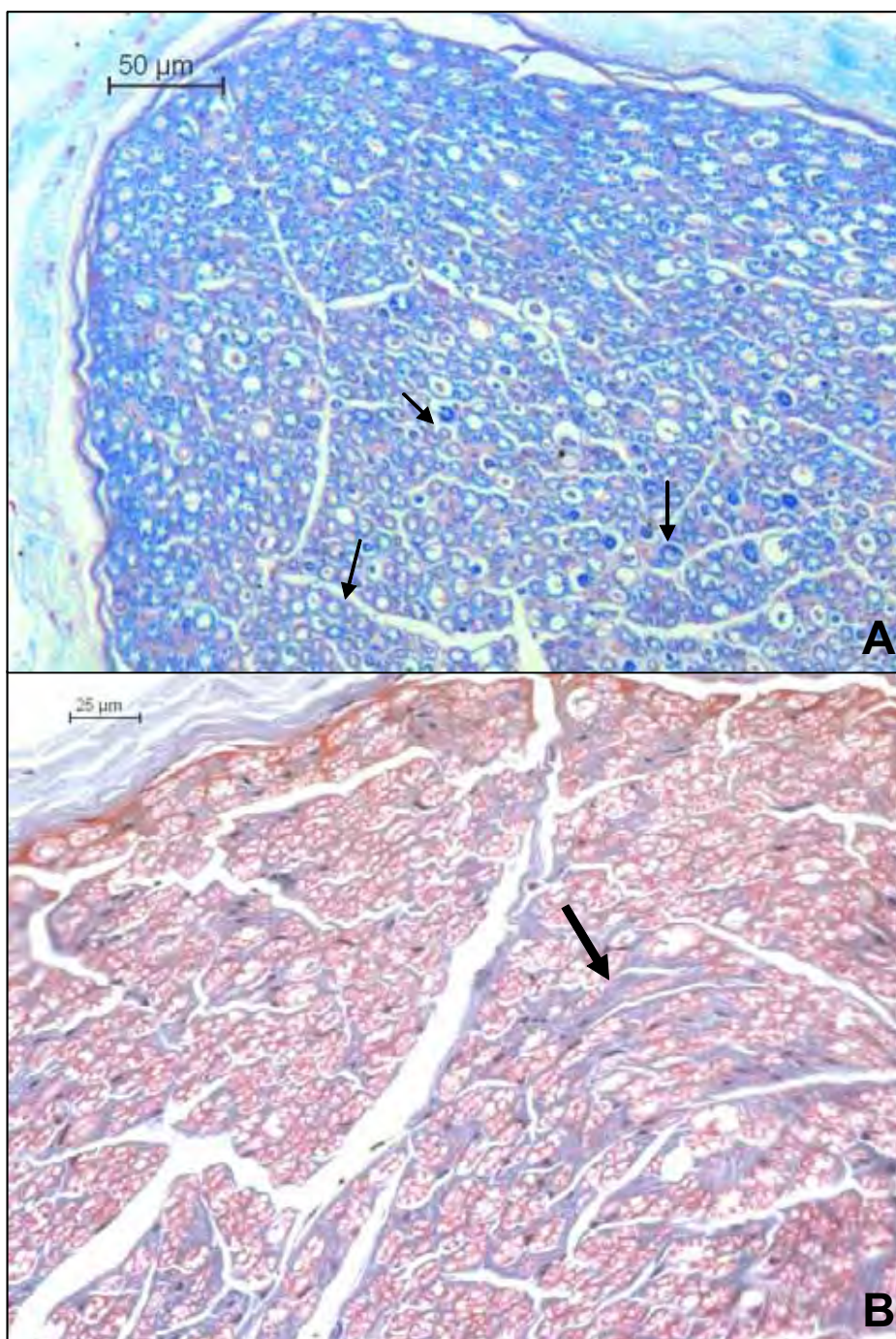


Figura 11. Fotomicrografias de nervos de cães com leishmaniose visceral (**A**) corte transversal, fibras nervosas mielinizadas, notar a variação no diâmetro das fibras nervosas (**setas**) – Luxol Fast Blue 20x; (**B**) Aumento de tecido conjuntivo no endoneuro (**seta**) – TM 40x. (Jaboticabal – SP, 2008)

Nos cães do grupo controle foram observadas algumas alterações histopatológicas, tais como; aumento de tecido conjuntivo no endoneuro, aumento de tecido conjuntivo no perineuro, fibrose no endoneuro, variação no diâmetro das fibras.

A análise estatística da soma do número de alterações observadas em cada grupo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os animais do grupo controle e os cães com velocidade de condução nervosa diminuída, quanto à degeneração axonal e à variação no diâmetro das fibras nervosas.

As alterações histopatológicas de cada nervo examinado estão relacionados no Apêndice E.

A somatória do número de alterações histopatológicas observadas lesões e sua frequência nos três grupos avaliados, bem como o resultado da análise estatística encontram-se apresentados na Tabela 8 e Figura 12.

Tabela 8. Somatória do número de alterações (n) e percentagem (%) das alterações histopatológicas observadas nos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com velocidade de condução nervosa diminuída (Grupo LVC VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora normal (Grupo LVC VCN-n), e de cães negativos para leishmaniose visceral (Grupo Controle). (Jaboticabal - SP, 2008)

ALTERAÇÃO	GRUPO					
	LVC VCN-d		LVC VCN-n		Controle	
	N total: 37 nervos		N total: 18 nervos		N Total: 16 nervos	
	n	%	n	%	n	%
Aumento de tecido conjuntivo no endoneuro	12	17,39	1	5,56	2	28,57
Aumento de tecido conjuntivo no perineuro	6	8,70	2	11,10	2	28,57
Degeneração axonal	11	15,94 a	0	- b	0	- b
Desmielinização	3	4,35	1	5,56	0	-
Fibrose no endoneuro	4	5,80	0	-	2	28,57
Infiltrado inflamatório no perineuro	9	13,04	7	38,89	0	-
Infiltrado inflamatório no tecido adiposo	10	14,49	6	33,33	0	-
Infiltrado inflamatório no endoneuro	1	1,45	0	-	0	-
Variação no diâmetro de fibras nervosas	12	17,39 a	1	5,56 b	1	14,29 b
Vasculite no tecido adiposo adjacente ao perineuro	1	1,45	0	-	0	-
	69	100,00	18	100,00	7	100,00

* valor descritivo do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$);
médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

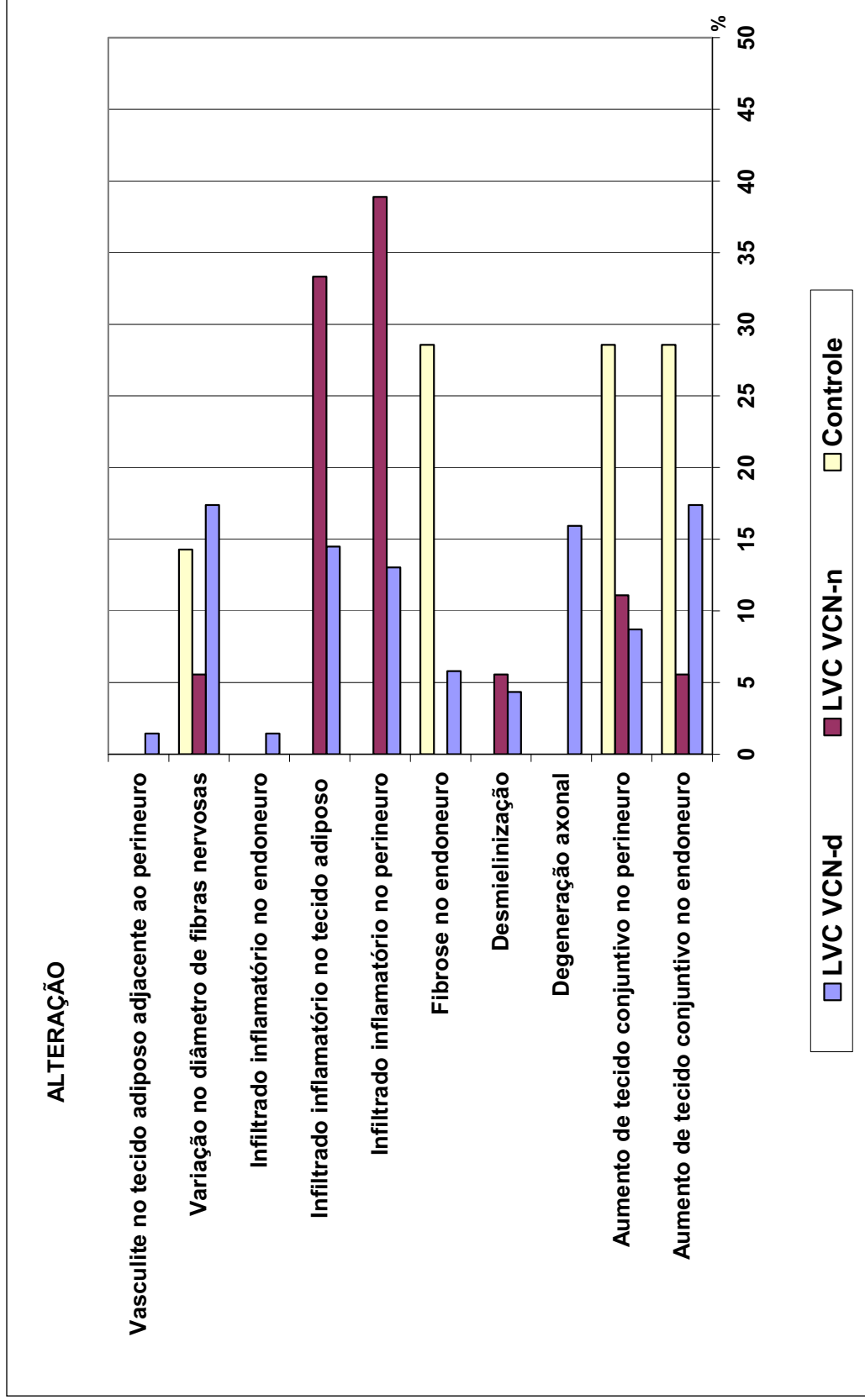


Figura 12. Representação gráfica da frequência (%) das alterações histopatológicas observadas nos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com velocidade de condução nervosa diminuída (Grupo LVC VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora normal (Grupo LVC VCN-n), e de cães negativos para leishmaniose visceral (Grupo Controle). (Jaboticabal - SP, 2008)

V. DISCUSSÃO

Os sintomas observados nos cães com leishmaniose visceral do presente estudo foram semelhantes aos descritos na literatura por NOLI (1999), FEITOSA et al. (2000), SCOTT et al. (2001), FERRER (2002), CIARAMELLA & CORONA (2003) e FEITOSA et al. (2005).

Uma justificativa para a dificuldade encontrada na estimulação de alguns nervos pode ser o fato de que uma percentagem da população apresenta desvios anatômicos no trajeto dos nervos periféricos, dificultando a localização dos pontos de estimulação conforme descrições de PINTO (2006).

Neste estudo foram utilizados vários tipos de eletrodos de superfície (jacaré, adesivo e placa), e foram realizados testes comparativos para verificar possíveis diferenças nos resultados obtidos com o uso de cada eletrodo. De acordo com os relatos de DUMITRU et al. (2002), tratando-se de eletrodos de superfície, o tipo não interfere nos resultados, fato que foi confirmado neste estudo.

Os valores de latências proximais e distais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas exceto para a estimulação distal do nervo radial. Esta diferença pode ser atribuída à dificuldade na localização dos pontos de estimulação e captação deste nervo, também verificada por BROWN & ZAKI (1979). No entanto, apesar de não ter sido evidenciada diferença estatística entre os grupos para a estimulação proximal do nervo radial, ao se observar as médias dos grupos e o valor de p (0,0592), é possível verificar que o grupo controle apresentou valores superiores aos outros dois, como na estimulação distal.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amplitudes dos potenciais de ação dos três grupos, tanto na estimulação proximal, quanto na distal. Os valores médios obtidos em todos os grupos encontram-se dentro dos limites propostos por CHRISMAN (1991) e CHRISMAN & CLEMMONS (1993) que afirmaram que a amplitude dos potenciais de ação varia de um a 15 mV. Por outro lado, no presente ensaio os valores foram bem menores do que os descritos por SIMS &

REDDING (1979), TAKAKURA & INADA (1983) e MALIK et al. (1989), e foram um pouco abaixo dos descritos por FEITOSA et al. (2000a, 2000b).

Apesar da amplitude dos potenciais de ação dos cães do grupo controle ter sido inferior à dos animais com leishmaniose, essa diminuição não foi conseqüente a uma degeneração axonal, fato evidenciado pela análise histopatológica dos referidos nervos. Somente no grupo de cães com leishmaniose visceral e velocidade de condução nervosa diminuída observou-se degeneração axonal por meio de análise histopatológica, fato que não foi evidenciado pela amplitude dos potenciais de ação. Deste modo, fica evidente que, apesar da eletroneurografia se prestar para a avaliação de degeneração axonal, como afirmado por FEITOSA et al. (2000a) e PINTO (2006), no presente estudo ela não foi capaz de detectá-la.

As durações dos potenciais de ação não diferiram estatisticamente entre os grupos, e foram superiores aos demonstrados por FEITOSA et al. (2000a, 2000b), porém semelhantes àqueles relatados por SIMS & REDDING (1979), WALKER et al. (1979) e TAKAKURA & INADA (1983). A duração reflete as velocidades de condução de fibras lentas, isto é, com menor bainha de mielina, sugerindo, deste modo, que essas fibras foram menos afetadas pelo processo de desmielinização.

Ao se observar os valores médios das durações dos potenciais de ação verifica-se que apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos, para o nervo peroneal, a duração do potencial de ação do animal com velocidade de condução nervosa motora normal foi muito menor que a obtida nos animais dos outros grupos. Isto se deve provavelmente a uma variação individual, uma vez que as alterações devidas a neurocondução diminuída das fibras lentas reflete-se por aumento e não diminuição da duração.

Muitos cães com leishmaniose visceral apresentavam velocidade de condução nervosa motora normal, apesar de apresentarem discreta desmielinização de fibras nervosas, evidenciada por avaliação histopatológica. Esse fato confirma os relatos de DUNCAN (1980) e NIEDERHAUSER & HOLLIDAY (1989), de que a velocidade de condução nervosa pode permanecer normal até que as fibras de grande diâmetro sejam afetadas.

A diferença estatisticamente significativa encontrada nas velocidades de condução nervosa motora, entre os cães com leishmaniose visceral e velocidade de condução nervosa diminuída e os outros dois, que apresentaram velocidade de condução nervosa motora normal, reflete a intensidade da desmielinização observada em três animais deste grupo, observações concordantes às colocações de NIEDERHAUSER & HOLLIDAY (1989) e PINTO (2006).

No decorrer da realização deste trabalho, as maiores dificuldades foram observadas quando da estimulação dos nervos tibial e peroneal em sua região proximal (trocanter maior do fêmur), o que, por diversas vezes, tornou necessária a aplicação de vários estímulos até que se registrasse o potencial de ação destes nervos. Esta dificuldade deve ser decorrente da posição anatômica do nervo, situado mais profundamente neste sítio de estimulação, uma vez que nos animais com menor massa muscular na região de estimulação, o resultado foi obtido com maior facilidade, fato que não foi mencionado por CHRISMAN & CLEMMONS (1993) e FEITOSA et al. (2000a).

Verificam-se, mediante os resultados dos exames histopatológicos deste estudo, maior frequência de alterações no grupo de cães com leishmaniose visceral com alteração na velocidade de condução nervosa, principalmente no que diz respeito à presença de degeneração axonal e variação no diâmetro das fibras nervosas, o que corrobora os relatos médicos de MUSTAFÁ (1965) e HASHIN et al. (1995) que associaram estas alterações à leishmaniose visceral em humanos com diminuição da velocidade de condução nervosa, acompanhados de desmielinização moderada a severa e de degeneração axonal. Nos animais com leishmaniose visceral e velocidade de condução nervosa diminuída os valores médios obtidos para o nervo tibial foram inferiores aos verificados por VAMVAKIDIS et al. (2000), quando da avaliação do mesmo nervo em cães com leishmaniose visceral. Entretanto, o autor não realizou exame histopatológico dos nervos, que pudesse confirmar uma ausência de desmielinização. O aumento de tecido conjuntivo no endoneuro e no perineuro também foi marcadamente presente, confirmando as descrições de PRINZ et al. (2003).

Apesar da frequência de ocorrência de desmielinização ter sido relativamente menor nos cães com velocidade de condução nervosa diminuída em comparação aos

animais com neurocondução normal, a intensidade da desmielinização foi maior no primeiro grupo, confirmando os relatos de BRAUND et al. (1996), KOESTNER & JONES (2000); MUELLER et al. (2001), SALVADORI et al. (2005) e PINTO, 2006, ao afirmarem que a desmielinização de fibras nervosas motoras é um dos fatores que diminuem a neurocondução.

Nos cães do primeiro grupo (LVC VCN-d) verificou-se tanto degeneração axonal quanto desmielinização, tal qual as descrições de NIEDERHAUSER e HOLLIDAY (1989), MUELLER et al. (2001) e PINTO (2006), ao relatarem que nas neuropatias periféricas os dois processos costumam estar presentes.

Nos fragmentos de nervos em que foram observadas degenerações axonais, muitas vezes identificou-se pequenos compartimentos ovóides de mielina, confirmando os achados de KOESTNER & JONES (2000) e MUELLER et al. (2001).

Em nenhuma das amostras analisadas verificou-se a presença de múltiplos axônios de pequeno calibre agregados e pouco mielinizados, indicativos de um processo de regeneração, conforme citado por MUELLER et al. (2001).

Em cães dos três grupos foi visualizado um aumento de tecido conjuntivo tanto no endoneuro como no perineuro, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O mesmo foi observado em relação à fibrose do endoneuro, presente nos grupos 1 (LVC VCN-d) e Controle. Apesar de BRAUND et al. (1996), MUELLER et al. (2001) e PRINZ et al. (2003) afirmarem que tais alterações ocorrem em focos inflamatórios nos nervos periféricos, no presente estudo não se observou tal fato, uma vez que apenas um animal do grupo com leishmaniose visceral e neurocondução diminuída (LVC VCN-d) possuía infiltrado inflamatório no endoneuro.

Os cães com leishmaniose visceral e velocidade de condução nervosa motora normal apresentaram maior frequência de ocorrência de infiltrado inflamatório no perineuro e no tecido adiposo, evidenciando uma lesão decorrente da doença mesmo sem alteração evidente na velocidade de condução nervosa. Esta observação sugere diferentes fases da doença, com o infiltrado inflamatório aparecendo numa fase anterior à degeneração axonal e à desmielinização, que diminuem a velocidade de condução

nervosa, como sugerido por BRAUND et al. (1996), MUELLER et al. (2001) e PRINZ et al. (2003).

A presença de infiltrados inflamatórios nos fragmentos dos nervos avaliados são características de neuropatias inflamatórias, entretanto não foram descritos nos relatos de neuropatias parasitárias realizados por HASS et al. (1989), WOLF et al. (1991) e BRAUND et al. (1996), ou por não terem sido identificados ou pelos autores não terem dado especial atenção a este achado.

A variação no diâmetro das fibras nervosas foi mais evidente no grupo 1 (LVC VCN-d), confirmando as afirmações de BRAUND et al. (1996), KOESTNER & JONES (2000) e MUELLER et al. (2001), de que em lesões desmielinizantes e em casos de degeneração axonal, evidenciam-se fibras de vários tamanhos.

Os resultados das análise histopatológicas dos nervos de cães com leishmaniose visceral confirmaram a ocorrência de uma neuropatia periférica, como descrito por HASS et al. (1989), WOLF et al. (1991) e BRAUND et al. (1996) em casos de toxoplasmose e neosporose, entretanto não puderam identificar a exata causa da lesão, uma vez que não foram observadas formas amastigotas do parasita em nenhum nervo avaliado.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições do presente experimento permitiram concluir que:

- Cães com leishmaniose visceral podem apresentar velocidade de condução nervosa motora diminuída, caracterizando um quadro de neuropatia periférica;
- Cães com leishmaniose visceral podem apresentar alterações histopatológicas indicativas de uma neuropatia periférica.
- As principais alterações nos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães com leishmaniose visceral foram aumento de tecido conjuntivo no endoneuro, variação no diâmetro de fibras nervosas, degeneração axonal, infiltrado inflamatório no perineuro e no tecido adiposo, desmielinização e aumento de tecido conjuntivo no perineuro, confirmando um quadro de neuropatia periférica.

VII. REFERÊNCIAS

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006. p. 685-698.

BORGES, A.S.; MACHADO, A.A.; FERREIRA, M.S.; FIGUEIREDO, J.F.C.; SILVA, G.F.; CIMERMAN, S.; BACHA, H.A.; TEIXEIRA, M.C.L. Concomitância de leishmanioses e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.6, p.713-719, 1999.

BRAUND, K.G. **Clinical syndromes in veterinary neurology**. 2.ed. St. Louis: Mosby, 1994. 477p.

BRAUND, K.G.; VALLAT, J.M.; STEISS, J.E.; PANANGALA, V.S.; ZIMMER, P.L. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in dogs and cats. **Journal of Peripheral Nervous System**, v.1, n.2, p.149-155, 1996.

BROWN, N.O.; ZAKI, F.A. Electrodiagnostic testing for evaluation of neuromuscular disorders in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.174, n.1, p.86-90, 1979.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; SANTUCCI, S.G. **Leishmaniose visceral americana**. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.html>>. Acesso em: 21 fev. 2005.

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar)**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 88p.

CFMV. Resolução n. 714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21/06/2002. Seção 1, p.201.

CHRISMAN, C.L. **Problems in small animal neurology**. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 526p.

CHRISMAN, C.L.; CLEMMONS, R.M. Electrodiagnostic testing. In: BOJRAB, M.J. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.1183-1201.

CHUNGE, C.N.; GACHIHI, G.; MUIGAI, R. Is neurological involvement possible in visceral leishmaniasis in Kenya? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, n.6, 1985. p.872.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, p.358-368, 2003.

DUMITRU, D.; ZWARTS, M.J.; AMATO, A.A. **Electrodiagnostic medicine**. 2.ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, 2002. 1524p.

DUNCAN, I. D. Peripheral nerve disease in the dog and cat. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.10, n.1, p.177-211, 1980.

FEITOSA, M.M.; USHIKOSHI, W.S. Utilização de eletroneuromiografia em Medicina Veterinária. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v.4, n.3, p.48-62, 2001.

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.

FEITOSA, M.M.; LARSSON, M.H.M.A.; USHIKOSHI, W.S.; PERRI, S.H.V. Determinação da velocidade de condução nervosa motora dos nervos tibial e peroneal de cães clinicamente sadios. **Ars Veterinária**, v.16, n.2, p.83-91, 2000a.

FEITOSA, M.M.; LARSSON, M.H.M.A.; USHIKOSHI, W.S.; PERRI, S.H.V. Determinação da velocidade de condução nervosa motora dos nervos radial e ulnar de cães clinicamente sadios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.3, 2000b.

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

FERRER, L. Canine Leishmaniasis: Evaluation of the Immunocompromised Patient. In: WSAVA CONGRESS CHOOSES, 8, 2002, GRANADA. **Proceedings....** Disponível em: <[http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx ?CID=WSAVA2002&PID=PR02653](http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=PR02653)>. Acesso em 15 de mar. 2007.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Barcelona, Spain. **Canine Leishmaniasis: an update.** Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, p.6-10, 1999.

GARCÍA-ALONSO, M.; NIETO, A.G.; BLANCO, A.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during Leishmania infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunology**, v.18, n.11, p.539-546, 1996.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizonte.** 1993. 202p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** 10. ed. São Paulo: Atheneu. 2002. p.36-72.

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

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Sevilla, Spain. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution.** Salamanca: Intervet International bv, 2002. p.7-14.

HASS, J. A.; SHELL, L.; SAUNDERS, G. Neurological manifestations of toxoplasmosis: a literature review and case summary. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 25, p. 253-260, 1989.

HASHIN, F.A.; AHMED, A.E.; EL-HASSAN, M.; EL-MUBARAK, M.H.; YAGI, H.; IBRAHIM, E.N.; ALI, M.S. Neurologic changes in visceral leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.52, n.2, p.149-154, 1995.

HOERLEIN, B.F. **Canine neurology: diagnosis and treatment**. 3.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1978. 791p.

IKEDA, F.A.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; FEITOSA, M.M.; MACHADO, G.F.; PERRI, S.H.V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.1, p.5-11, 2007.

KOESTNER, A.; JONES, T.C. Sistema nervoso. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6.ed. São Paulo:Manole, 2000. p.1281-1320.

KUBBA, R.; EL-HASSAN, A.M.; AL-GINDAN, Y.; OMER, A.H.S.; BUSHRA, M.; KUTTY, M.K. Peripheral nerve involvement in cutaneous leishmaniasis (old world). **International Journal of Dermatology**, v.26, n.8, p.527-531, 1987.

LEE, A.F.; BOWEN, J.M. Evaluation of motor nerve conduction velocity in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, n.8, p.1361-6, 1970.

LEISHMANIOSE visceral americana canina: distribuição do percentual de positividade de cães nos municípios com transmissão de LVA no estado. 1998 a 2004. Disponível

em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvac_9804.htm>. Acesso em: 21 fev. 2005a.

LEISHMANIOSE visceral americana humana: número de casos por município. Disponível em : <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_auto9904.htm>. Acesso em: 21 fev. 2005b.

MALLA, N.; MAHAJAN, R.C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis – some recent concepts. **Indian Journal of Medical Research**, v.123, p.267-274, 2006.

MALIK, R.; HO, S.; CHURCH, D.B. A new method for recording and analysing evoked motor potentials from dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.30, p.13-9, 1989.

MARCONDES, M. Leishmaniose, uma zoonose. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 7, 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Anclivepa, 2007.

MUELLER, M.; WACKER K.; RINGELSTEIN E.B.; HICKEY W.F.; IMAI Y.; KIEFER R. Rapid desmont of identified resident endoneurial macrophages. **American Journal of Pathology**, v. 159, p.2187-2197, 2001.

MUSTAFA, D. Neurological disturbances in visceral leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.10, p.248-250, 1965.

NIEDERHAUSER, U.B.; HOLLIDAY, T.A. Electrodiagnostic studies in diseases of muscles and neuromuscular junctions. Review. **Seminars in Veterinary Medical Surgery. Small Animal**, v.4, n.2, p.116-125, 1989.

NIETO, C.G.; VIÑUELAS, J.; BLANCO, A.; GARCÍA-ALONSO, M.; VERDUGO, S.G.; NAVARRETE, I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Veterinary Record**, v.139, n.14, p.346-347, 1996.

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

PINTO, L.C. **Neurofisiologia Clínica: Princípios Básicos e Aplicações**. São Paulo: Atheneu, 2006. 645p.

POCAI, E.A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Leishmaniose visceral (Calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.501-505, 1998.

PRINZ, R.A.D.; NAKAMURA-PEREIRA, M.; DE-ARY-PIRES, B.; FERNANDES, D.S.; FABIÃO-GOMES, B.D.S.V.; BUNN, P.S.; MARTINEZ, A.M.B.; PIRES-NETO, M.A.; ARY-PIRES, R. Experimental chronic entrapment of the sciatic nerve in adult hamsters: an ultrastructural and morphometric study. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 36, p.1241- 1245, 2003.

RIET-CORREA, G.; FERNANDES, C.G.; PEREIRA, L.A.V.; GRAÇA, D.L. Ethidium bromide-induced demyelination of the sciatic nerve of adult Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n.1, p.99-104, 2002.

SALVADORI, C.; TARTARELLI, C.L.; BARONI, M.; MIZISIN, A.; CANTILE, C. Peripheral Nerve Pathology in Two Rottweilers with Neuronal Vacuolation and Spinocerebellar Degeneration. **Veterinary Pathology**, v.42, p.852-855, 2005.

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

SATTI, M.B.; EL-HASSAN, A.M.; AL-GINDAN, Y.; OSMAN, M.A.; AL-SOHAIBANI, M.O. Peripheral neural involvement in cutaneous leishmaniasis. A pathologic study of human and experimental animal lesions. **International Journal of Dermatology**, v.28, n.4, p.243-247, 1989.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Viral, rickettsial, and protozoal skin diseases. In: _____ **Small animal dermatology**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 517- 542.

SIMS, M.H. Electrodiagnostic techniques in the evaluation of diseases affecting skeletal muscle. Review. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.13, n.1, p.145-162, 1983.

SIMS, M.H.; REDDING, R.W. Failure of neuromuscular transmission after complete nerve section in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.7, p.931-5, 1979.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2.ed. São Paulo:Manole. 2002. 655p.

SWALLOW, J.S.; GRIFFITHS, I.R. Age related changes in the motor nerve conduction velocity in dogs. **Research in Veterinary Science**, v.23, p.29-32, 1977.

TAKAKURA, Y.; INADA, S. Motor nerve conduction velocity of the ulnar and tibial nerves and characteristics of M wave of the interosseous muscles in the adult dog. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.45, n.3, p.413-6, 1983.

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

VAN NES, J.J. An introduction to clinical neuromuscular electrophysiology. Review. **Veterinary Quarterly**, v.8, n.3, p.233-239, 1986.

WALKER, T.L.; REDDING, R.N.; BRAUND, K.G. Motor nerve conduction velocity and latency in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.10, p.1433-9, 1979.

WOLF, M.; CACHIN, M.; VANDEVELDE, M.; TIPOLD, A.; DUBEY, J.P. The clinical diagnosis of protozoal myositis syndrome (*Neospora caninum*) of puppies. **Tierarztl Praxis**, v.19, n 3, p.302-306, 1991.

APÊNDICES

Apêndice A: Técnica de ELISA para leishmaniose visceral, como descrita por LIMA et al. (2005), para determinar a presença de IgG anti-*Leishmania sp* no soro dos animais.

As microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, numa concentração de 20µg/ml em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6, e incubadas “overnight” a 4°C. Após a lavagem com PBS-tween por três vezes, as placas foram bloqueadas com 20µl de BSF 10% em PBS e incubadas à temperatura ambiente durante duas horas. Após nova lavagem com PBS-tween por três vezes, 100µl do soro controle positivo, do soro controle negativo e das amostras de soros dos animais, diluídas 1:400 em PBS contendo 0,05% de tween 20 e 10% de BSF, foram adicionadas a cada poço e incubadas por três horas à temperatura ambiente. Após quatro lavagens com PBS-tween 20, adicionou-se à placa 100µl de anticorpo anti-IgG de cão, marcado com peroxidase, previamente titulado. Após a incubação por uma hora em temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada quatro vezes com PBS-tween 20 e foram adicionados 100µl de uma solução contendo substrato OPD (0,4mg/ml) em diluente apropriado. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço 50µl de H₂SO₄ 1M e, a densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 492nm, utilizando-se um leitor de ELISA. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em triplicata. Para a determinação do ponto de corte foi realizado o teste de ELISA no soro de 20 cães sadios de área não endêmica para leishmaniose visceral. O ponto foi estipulado a partir da média acrescida de três desvios-padrões da leitura da densidade óptica, o qual foi considerado 0,270.

Apêndice B: Resultados individuais dos exames sorológico e parasitológico dos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Tabela B1. Resultados individuais da presença de IgG anti-*Leishmania* sp. no soro dos animais por meio da técnica de ELISA e, da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp. pelo método parasitológico direto nos esfregaços de citologias aspirativas de linfonodo, baço e fígado dos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Grupo LVC). (Jaboticabal – SP, 2008)

EXAME SOROLÓGICO		EXAME PARASITOLÓGICO		
Cão	ELISA	Linfonodo	Baço	Fígado
L1	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L2	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L3	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L4	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L5	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L6	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L7	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L8	negativo	negativo	negativo	positivo
L9	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L10	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L11	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L12	positivo	negativo	positivo	n.e.
L13	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L14	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L15	positivo	negativo	negativo	positivo
L16	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L17	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L18	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L19	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L20	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L21	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L22	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L23	positivo	negativo	positivo	n.e.
L24	positivo	positivo	n.e.	n.e.

Continua...

continuação...

L25	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L26	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L27	negativo	negativo	positivo	n.e.
L28	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L29	negativo	negativo	positivo	n.e.
L30	positivo	positivo	n.e.	n.e.
L31	negativo	positivo	n.e.	n.e.
L32	negativo	negativo	positivo	n.e.
L33	negativo	positivo	n.e.	n.e.

n.e. – não examinado

Apêndice C: Resultados individuais do exame físico geral dos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Tabela C1. Resultados individuais do exame físico geral dos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Grupo LVC). (Jaboticabal – SP, 2008)

CÃO	SINTOMAS
L01	NDN
L02	caquexia / lesões de pele difusas
L03	magro / atrofia muscular moderada / disqueratinização cutânea / hiperqueratose em regiões de saliências ósseas
L04	magro / secreção ocular purulenta bilateral / disqueratinização cutânea / hiperqueratose em regiões de saliências ósseas / onicogribose
L05	magro / secreção ocular purulenta bilateral
L06	magro / atrofia muscular moderada / dispnéico
L07	magro / atrofia muscular moderada / lesões de pele difusas pelo corpo / disqueratinização cutânea / hiperqueratose em regiões de saliências ósseas
L08	NDN
L09	magro / disqueratinização cutânea / hematoquesia
L10	caquexia / pododermatite / lesões difusas pelo corpo
L11	NDN
L12	NDN
L13	caquexia / pododermatite / lesões peribucal e periocular
L14	NDN
L15	NDN
L16	NDN
L17	magro / secreção nasal sero-sanguinolenta / tosse produtiva / lesões difusas pelo corpo
L18	magro / atrofia muscular intensa / paresia dos membros pélvicos
L19	caquexia
L20	NDN
L21	caquexia
L22	magro / secreção ocular purulenta bilateral
L23	NDN
L24	caquexia / lesões de pele difusas
L25	NDN

continua...

L26	magro / lesões de pele / disqueratinização cutânea / hiperqueratose em regiões de saliências ósseas
L27	NDN
L28	NDN
L29	caquexia / lesões de pele difusas
L30	magro / secreção ocular purulenta bilateral
L31	NDN
L32	caquexia / pododermatite / lesões perioculares
L33	Magro / secreção nasal purulenta

Continuação...

NDN – nada digno de nota

APÊNDICE D: Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico, duração e velocidade de condução nervosa obtidas por meio de estimulação proximal e distal dos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e de cães negativos para a doença. (Jaboticabal, 2008)

Tabela D1. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo radial de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora diminuída (LVC VCN-d). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
L2	2,60	2,00	4,30
L7	2,20	1,80	7,60
L9	2,70	6,20	3,30
L14	2,20	2,40	3,50
L15	1,70	4,00	5,00
L19	2,80	3,30	6,10
L22	2,80	1,10	4,60
L23	2,30	3,80	5,00
L28	2,70	2,00	3,90
L29	2,40	1,40	3,60
L32	2,30	3,90	8,30
L33	1,90	4,80	5,90

Tabela D2. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo radial de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora diminuída (LVC VCN-d). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
L2	1,90	2,80	4,40	57,14
L7	1,40	1,30	5,50	62,50
L9	1,40	8,30	3,10	30,77
L14	1,70	2,40	3,20	56,00
L15	1,40	4,80	4,60	66,67
L19	1,60	1,70	2,40	68,00
L22	1,70	1,30	3,80	55,00
L23	1,60	3,90	4,80	47,00
L28	1,50	2,10	3,70	49,00
L29	1,40	1,60	3,70	64,00
L32	1,30	4,30	8,10	68,00
L33	1,30	5,10	5,20	63,00

Tabela D3. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo radial de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora normal (LVC VCN-n). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
L3	3,10	1,90	6,30
L4	2,60	1,50	3,00
L5	2,80	2,90	1,80
L6	2,70	1,60	5,70
L11	2,10	5,50	8,20
L12	2,00	4,30	6,70
L17	2,90	3,60	5,10
L20	2,30	2,80	5,10
L25	2,30	2,80	5,20
L27	1,30	4,30	4,20

Tabela D4. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo radial de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora normal (LVC VCN-n). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
L3	2,40	2,30	6,20	71,43
L4	1,60	1,30	3,00	70,00
L5	2,10	1,90	2,50	71,43
L6	2,30	1,20	7,00	75,00
L11	1,30	5,50	8,70	73,00
L12	1,50	4,90	6,60	71,00
L17	2,40	1,20	2,60	74,00
L20	1,40	2,60	6,20	71,00
L25	1,50	3,90	4,10	77,00
L27	1,00	6,60	4,10	69,00

Tabela D5. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo radial de cães negativos para leishmaniose visceral (controle). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
C1	2,40	2,30	6,60
C2	5,80	1,00	8,20
C3	3,50	1,10	2,90
C4	3,10	3,30	6,80

Tabela D6. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo radial de cães negativos para leishmaniose visceral (controle). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
C1	1,90	2,40	6,40	80,00
C2	4,80	1,10	9,00	90,00
C3	3,10	1,30	3,60	65,00
C4	1,70	3,30	6,90	81,00

Tabela D7. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo ulnar de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora diminuída (LVC VCN-d). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
L3	4,60	2,40	5,40
L5	4,80	2,80	4,80
L8	4,10	1,80	4,40
L9	3,30	7,10	4,90
L10	7,00	1,60	6,60
L16	4,60	3,20	2,50
L17	4,60	5,70	4,60
L19	4,40	3,50	4,10
L20	3,50	4,90	3,50
L22	5,70	5,50	6,00
L23	3,40	6,70	3,60
L25	4,20	7,00	4,10
L26	2,10	7,30	3,30
L27	2,50	9,30	3,50
L28	5,90	6,20	3,60
L29	3,90	5,90	4,10
L30	2,40	8,20	3,50
L32	5,50	9,60	4,50

Tabela D8. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo ulnar de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora diminuída (LVC VCN-d). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
L3	2,30	2,00	4,70	30,43
L5	2,90	3,20	4,40	57,89
L8	2,80	2,00	4,10	53,85
L9	2,10	7,10	4,70	55,00
L10	4,40	4,50	4,50	57,00
L16	2,80	4,30	2,60	55,56
L17	2,70	6,20	4,00	44,74
L19	2,60	8,50	3,80	55,56
L20	2,20	6,00	3,30	50,00
L22	3,10	5,70	5,80	58,00
L23	2,10	6,90	3,00	45,00
L25	2,20	10,10	4,40	60,00
L26	1,30	11,70	3,10	56,00
L27	1,60	10,60	3,10	56,00
L28	4,00	6,80	3,30	48,00
L29	2,50	6,00	4,20	57,00
L30	1,70	8,70	2,10	57,00
L32	3,20	13,20	4,80	52,00

Tabela D9. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo ulnar de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora normal (LVC VCN-n). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
L4	4,20	4,00	4,80
L11	3,90	7,20	3,80
L12	3,20	4,00	6,40
L13	3,10	7,80	4,40
L15	3,40	13,80	3,50
L18	4,10	6,40	3,90
L21	3,50	10,30	3,50
L33	3,80	14,20	3,60

Tabela D10. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo ulnar de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora normal (LVC VCN-n). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
L4	3,60	4,20	4,00	83,33
L11	2,90	9,70	3,80	80,00
L12	2,00	5,10	6,50	65,00
L13	2,00	3,10	6,20	64,00
L15	2,40	14,40	3,80	64,00
L18	2,90	5,80	4,00	66,67
L21	2,20	12,90	3,10	63,00
L33	2,40	15,10	3,40	64,00

Tabela D11. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo ulnar de cães negativos para leishmaniose visceral (controle). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
C1	4,20	3,20	6,00
C2	5,30	5,40	5,30
C3	5,30	3,10	5,00
C4	2,70	10,10	3,80

Tabela D12. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo ulnar de cães negativos para leishmaniose visceral (controle). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
C1	2,90	3,60	5,40	61,54
C2	3,90	2,60	4,30	64,29
C3	3,10	2,30	4,80	60,00
C4	2,00	6,60	3,40	64,29

Tabela D13. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo tibial de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora diminuída (LVC VCN-d). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
L8	7,00	1,30	3,80
L9	5,80	1,30	7,70
L13	5,30	3,00	5,10
L14	5,60	1,50	3,60
L15	4,90	3,30	3,30
L16	7,30	4,20	5,00
L17	8,70	3,70	5,50
L18	7,10	2,70	4,20
L19	7,40	2,60	4,00
L23	4,10	9,80	4,30
L25	7,50	3,00	4,00
L30	4,10	11,60	3,60
L31	8,80	11,70	6,50
L32	8,90	5,10	4,50
L33	5,90	2,90	4,10

Tabela D14. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo tibial de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora diminuída (LVC VCN-d). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
L8	4,2	0,80	3,70	60,71
L9	3,0	1,50	2,10	60,71
L13	3,0	3,80	3,10	45,83
L14	2,7	2,30	3,10	41,38
L15	2,7	4,80	3,00	54,55
L16	5,1	2,70	3,60	68,18
L17	4,1	6,10	5,30	48,98
L18	3,8	3,60	4,10	44,12
L19	3,7	5,60	4,30	40,54
L23	2,50	9,70	3,80	57,00
L25	3,50	5,80	3,90	50,00
L30	2,60	17,10	1,50	55,00
L31	6,10	20,30	6,00	54,00
L32	4,10	8,00	4,00	58,00
L33	3,40	7,60	3,30	60,00

Tabela D15. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo tibial de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora normal (LVC VCN-n). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
L1	5,70	2,80	2,40
L5	7,50	1,20	4,30
L11	5,30	3,30	4,30
L12	5,20	4,30	7,90
L21	7,00	4,30	4,00

Tabela D16. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo tibial de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora normal (LVC VCN-n). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
L1	3,3	2,60	2,70	66,67
L5	4,1	1,60	4,10	61,76
L11	3,7	4,40	3,20	66,67
L12	3,0	6,50	4,30	68,18
L21	3,60	6,90	2,90	74,00

Tabela D17. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo tibial de cães negativos para leishmaniose visceral (controle). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
C1	5,90	1,20	3,40
C2	8,30	2,70	3,70
C3	6,20	2,50	5,80
C4	3,50	6,60	5,60

Tabela D18. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo tibial de cães negativos para leishmaniose visceral (controle). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
C1	3,60	2,00	3,20	65,22
C2	5,10	2,60	4,80	65,63
C3	2,30	4,00	4,60	85,00
C4	3,50	5,10	4,40	68,00

Tabela D19. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora diminuída (LVC VCN-d). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
L1	4,70	1,60	3,50
L2	4,30	3,10	5,70
L3	3,90	4,00	7,80
L4	3,60	0,88	6,80
L6	3,70	0,80	4,20
L7	4,50	1,65	8,00
L8	3,30	1,60	6,20
L11	2,40	3,20	9,20
L13	3,20	2,80	4,80
L16	5,80	0,90	5,60
L20	4,50	1,40	4,90
L21	4,70	3,00	7,10
L23	3,50	6,20	6,20
L24	3,80	4,70	7,30
L25	4,70	1,80	8,30
L27	3,10	2,80	3,60
L28	3,90	0,90	9,10
L29	3,60	1,70	11,00
L30	2,40	8,10	6,90
L32	3,60	3,10	7,90
L33	3,00	6,10	6,90

Tabela D20. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora diminuída (LVC VCN-d). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
L1	2,50	1,80	4,70	68,18
L2	2,70	3,80	7,40	68,75
L3	2,00	1,00	7,00	52,63
L4	1,80	0,64	9,80	72,22
L6	2,40	1,00	5,00	53,85
L7	2,10	1,10	7,00	54,17
L8	1,70	2,10	7,10	75,00
L11	1,20	1,70	9,70	67,00
L13	1,90	3,00	6,30	66,67
L16	4,10	1,20	6,20	50,00
L20	2,30	1,40	5,60	59,09
L21	3,50	3,50	6,50	67,00
L23	2,00	10,00	6,10	60,00
L24	2,20	6,30	7,00	69,00
L25	3,00	2,00	8,20	65,00
L27	2,10	3,00	4,30	57,00
L28	2,00	1,00	8,00	53,00
L29	1,80	1,80	10,80	55,00
L30	1,30	9,70	5,80	50,00
L32	2,10	3,30	9,30	67,00
L33	1,60	6,40	6,60	70,00

Tabela D21. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora normal (LVC VCN-n). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
L15	4,50	3,70	3,50

Tabela D22. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora normal (LVC VCN-n). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
L15	3,80	3,50	2,50	92,86

Tabela D23. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação proximal do nervo peroneal de cães negativos para leishmaniose visceral (controle). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>
C1	3,90	1,00	6,30
C2	3,50	2,00	4,70
C3	4,40	1,60	6,90
C4	4,60	7,20	5,10

Tabela D24. Medidas das latências iniciais, amplitudes pico a pico e duração obtidas por meio de estimulação distal do nervo peroneal de cães negativos para leishmaniose visceral (controle). (Jaboticabal, 2008)

<i>Animal</i>	<i>Latência Inicial (ms)</i>	<i>Amplitude pico a pico (mV)</i>	<i>Duração (ms)</i>	<i>Velocidade de condução nervosa (m/s)</i>
C1	2,00	1,00	9,50	73,68
C2	2,00	4,00	5,20	86,67
C3	2,80	2,10	7,90	94,00
C4	3,00	7,50	4,70	88,00

APÊNDICE E: Alterações histopatológicas.

Tabela E1. Alterações histopatológicas encontradas nos nervos radial, ulnar, tibial e peroneal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com velocidade de condução nervosa motora diminuída (LVC VCN-d), com velocidade de condução nervosa motora normal (LVC VCN-n) e de cães negativos para a doença (Controle) . (Jaboticabal, 2008)

ANIMAL	NERVO	GRUPO	Lesão
C1	Radial	Controle	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro
C2	Radial	Controle	Aumento do tecido conjuntivo no perineuro
C3	Tibial	Controle	Aumento do tecido conjuntivo no perineuro
C4	Tibial	Controle	Fibrose no endoneuro
L02	Peroneal	LCV VCN-D	Variação no diâmetro fibras nervosas
L03	Peroneal	LCV VCN-D	Infiltrado inflamatório no perineuro
			Infiltrado inflamatório no tecido adiposo
	Ulnar	LCV VCN-D	Desmielinização
			Fibrose no endoneuro
L04	Ulnar	LCV VCN-N	Aumento do tecido conjuntivo no perineuro
			Degeneração axonal
L05	Ulnar	LCV VCN-D	Fibrose no endoneuro
L06	Peroneal	LCV VCN-D	Infiltrado inflamatório no perineuro
			Infiltrado inflamatório no tecido adiposo
	Radial	LCV VCN-N	Degeneração axonal
L07	Peroneal	LCV VCN-D	Infiltrado inflamatório no perineuro
			Infiltrado inflamatório no tecido adiposo
	Radial	LCV VCN-D	Variação no diâmetro fibras nervosas
L08	Ulnar	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no perineuro
			Variação no diâmetro fibras nervosas
			Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro
			Degeneração axonal

continua...

...continuação

L09	Radial	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no perineuro Degeneração axonal Desmielinização Infiltrado inflamatório no perineuro Infiltrado inflamatório no tecido adiposo Variação no diâmetro fibras nervosas
	Tibial	LCV VCN-D	Infiltrado inflamatório no perineuro
L10	Ulnar	LCV VCN-D	Infiltrado inflamatório no tecido adiposo
	Ulnar	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro Degeneração axonal Fibrose no endoneuro Variação no diâmetro fibras nervosas
L11	Peroneal	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro Degeneração axonal Infiltrado inflamatório no tecido adiposo Variação no diâmetro fibras nervosas
	Radial	LCV VCN-N	Infiltrado inflamatório no perineuro
L12	Tibial	LCV VCN-N	Aumento do tecido conjuntivo no perineuro Infiltrado inflamatório no perineuro Infiltrado inflamatório no tecido adiposo
	Ulnar	LCV VCN-N	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro
L13	Radial	LCV VCN-N	Aumento do tecido conjuntivo no perineuro Desmielinização Infiltrado inflamatório no perineuro Infiltrado inflamatório no tecido adiposo Variação no diâmetro fibras nervosas
	Tibial	LCV VCN-N	Infiltrado inflamatório no perineuro
L14	Ulnar	LCV VCN-N	Infiltrado inflamatório no tecido adiposo
	Tibial	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro Degeneração axonal Variação no diâmetro fibras nervosas
L15	Radial	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no perineuro Infiltrado inflamatório no tecido adiposo Vasculite no tecido adiposo
	Tibial	LCV VCN-D	Infiltrado inflamatório no perineuro

continua...

...continuação

L16	Peroneal	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro Degeneração axonal Infiltrado inflamatório no perineuro Variação no diâmetro fibras nervosas
	Tibial	LCV VCN-D	Infiltrado inflamatório no tecido adiposo
	Ulnar	LCV VCN-D	Infiltrado inflamatório no perineuro
L17	Radial	LCV VCN-N	Infiltrado inflamatório no perineuro
	Tibial	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no perineuro
		LCV VCN-D	Variação no diâmetro fibras nervosas
	Ulnar	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro Variação no diâmetro fibras nervosas
L18	Tibial	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro
L19	Radial	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro Degeneração axonal Variação no diâmetro fibras nervosas
	Tibial	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro Fibrose no endoneuro
	Ulnar	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro Aumento do tecido conjuntivo no perineuro Infiltrado inflamatório no tecido adiposo
L20	Peroneal	LCV VCN-D	Infiltrado inflamatório no tecido adiposo
	Ulnar	LCV VCN-D	Aumento do tecido conjuntivo no endoneuro Degeneração axonal Infiltrado inflamatório no endoneuro