

Agueda Aparecida Lima da Silva

**ESTUDO CLÍNICO-LABORATORIAL DAS
ARTICULAÇÕES DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL E
EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM *Leishmania*
chagasi POR VIA INTRA-ARTICULAR**

**Araçatuba
2007**

Agueda aparecida lima da silva

**Estudo clínico-laboratorial das articulações de cães
naturalmente infectados com leishmaniose visceral e
experimentalmente inoculados com *leishmania chagasi* por via
intra-articular**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia –
Curso de Medicina Veterinária para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Clínica e
Cirúrgica)

Orientador: Prof. Ass. Dra. Flávia de Resende Eugênio

**Araçatuba
2007**

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma antroponose causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, que se divide em dois grupos capazes de produzir manifestações cutâneas, mucocutâneas e viscerais (FEITOSA et al., 2000). Atualmente, são consideradas como doenças re-emergentes, ressurgindo com grande impacto e, muitas vezes, com perfis de morbi-mortalidade diferentes daqueles já conhecidos (BEVILACQUA et al., 2001), o que as incluem entre as seis mais importantes endemias do mundo (FEITOSA et al., 2000).

No Brasil, somente no século XX a enfermidade foi identificada (CAMARGO et al., 2003). No Estado de São Paulo, a doença foi relatada em 1998, na cidade de Araçatuba (BEVILACQUA, 2004), quando foram registrados os primeiros casos autóctones de leishmaniose visceral canina, evidenciando o surgimento de novos focos, com casos clínicos provenientes de municípios da região.

É uma doença de caráter infeccioso, de evolução aguda ou crônica, sendo a *Leishmania chagasi* responsável pela enfermidade no Brasil (CORREIA; CORREIA, 1992).

Os vetores implicados na transmissão são denominados flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, dentre os quais a *Lutzomyia longipalpis*, inseto hematófago que tem por seu *habitat* o domicílio e peri-domicílio humanos (CORREIA; CORREIA, 1992).

Os reservatórios mais importantes na área urbana são o cão (*Canis familiaris* – Lineus, 1758), a raposa e o homem, em casos de epidemias (CORREIA; CORREIA , 1992; FONSECA; SANTUCCI, 2001).

Na patogênese da doença, o protozoário, uma vez inoculado na pele, parasita os fagócitos mononucleares do baço, fígado, nódulos linfáticos, medula óssea e, eventualmente, de outros órgãos (CAMARGO; BARCINSKI, 2003).

No cão, a leishmaniose pode ser classificada como assintomática, oligossintomática e sintomática segundo Genaro (1993); Feitosa et al., (2000), cujas manifestações mais frequentes são onicogrifose, alterações urinárias, hepáticas, dermatológica, gastrintestinais, neurológicas, pulmonares, coagulopatias, perda de peso, anorexia e distúrbios locomotores (CORREIA; CORREIA, 1992; FEITOSA et al., 2000; NOLI, 1999).

Em muitos animais, verifica-se atrofia muscular, diminuição da atividade física, associada a distúrbios de locomoção (FEITOSA et al., 2000; LONGSTAFFE et al., 1983).

Em 1997, Buracco et al., observaram *Leishmania donovani* no líquido sinovial de um cão acometido por leishmaniose visceral. Mais recentemente, foi descrita a presença de *Leishmania sp.* no líquido sinovial de cães com distúrbios locomotores, no município de Araçatuba, São Paulo (BEVILACQUA et al., 2002).

A incidência de problemas locomotores pode chegar a 30%, sendo a claudicação e dor na parte distal dos membros as principais queixas (BURACCO et al., 1997; FEITOSA et al., 2000; NOLLI, 1999; WOLSCHRIJN et al., 1996). Estes problemas podem advir de poliartrites, sinovites, polimiosite, osteoartrite, periostite proliferativa, lesões osteolíticas, úlceras interdigitais, lesões de coxim plantar e neuralgia (BEVILACQUA et al., 2002; FEITOSA et al., 2000; MCCONKEY, et al., 2002; NOLLI, 1999). Nas avaliações radiográficas das alterações locomotoras, foram observadas imagens compatíveis com osteoartrite erosiva, às vezes, acompanhada por destruição completa das articulações (BLAVIER, et al., 2001; BURACCO et al., 1997; WOLSCHRIJN et al., 1996).

As artrites podem estar associadas a depósito de imunocomplexos ou à presença do parasita no interior das articulações, confirmando a identificação de formas amastigotas de *Leishmania sp.* no líquido sinovial de cães (AGUT et al., 2003; FEITOSA et al., 2000; NOLLI, 1999). Embora estes mesmos autores tenham se baseado em relatos de casos, não há estudos sobre a evolução das artrites no curso da leishmaniose visceral canina, mesmo havendo vasta literatura sobre o quadro clínico da enfermidade, poucos autores, até o momento, descreveram, de forma mais detalhada, como ocorrem as alterações articulares relacionadas à presença do parasita intra-articular, bem como as lesões morfológicas locais conseqüentes a esta enfermidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da enfermidade

Em 1900, Leishman e Donovan (1903) citado por Correia; Correia, (1992) relataram que a doença conhecida como Kala-azar que ocorria na Índia era causada por um protozoário, e Ross, (1903), em homenagem aos dois pesquisadores, denominou como *Leishmania donovani*.

Na bacia do Mediterrâneo verificou-se uma enfermidade similar ao kalasar e, em 1980, foi relatado por Nicolle e Compte, que a doença afetava cães na Tunísia, seguida de vários relatos na Espanha, Itália, Sicília, Grécia, Malta, França, Argélia e em outros países da região, além de Índia e China (CORREIA; CORREIA, 1992; NOLI, 1999).

Paralelamente, descrevia-se outra enfermidade que causava doença cutânea, com aspecto nódulo-ulceroso que foi denominada “botão do oriente”, “ferida de Delli” e leishmaniose cutânea.

Sob as formas visceral ou cutânea, as leishmanioses apresentavam diferentes padrões, porém, em alguns locais como Nigéria, Quênia e Índia, os cães não eram afetados, tendo como reservatórios roedores silvestres. Já no mediterrâneo e na China, os cães eram reservatórios e eram sintomáticos. Frente a essas diferenças, propôs-se a existência de duas espécies do agente: *L. donovani* e *L. tropica*.

Em 1911, o pesquisador Gaspar Vianna citado por Correia; Correia (1992), descobriu a espécie *L. braziliensis*, responsável pela leishmaniose muco-cutânea que afetava o homem e, eventualmente, era vista em cães e gatos, fato confirmado em 1912 e 1913 por Pedroso que descreveu dois casos caninos com lesões nas narinas, nos municípios de Itapura e Velha, SP.

A leishmaniose visceral humana no Brasil data-se de 1913 quando Migone, (Paraguai), descreveu o primeiro caso em necropsia, oriundo do estado do Mato Grosso (FEITOSA; SANTUCCI, 2000; FONSECA et al., 2001).

Em 1936, Evandro Chagas citado por Feitosa et al. (2000), aponta o vetor *P. longipalpis*, hoje denominado *Lutzomyia longipalpis*, responsável pela disseminação da

leishmaniose visceral e, em 1937, Castro e Ferreira identificaram o cão como reservatório da mesma (FEITOSA et al., 2000).

O primeiro caso de leishmaniose em cães no município de Araçatuba, estado de São Paulo foi relatado em 1998, (FEITOSA, 2000; FONSECA; SANTUCCI, 2001).

2.2 Aspectos Epidemiológicos e ciclo biológico

O complexo *Leishmania donovani* compreende a *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (FEITOSA et al., 2000; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). São protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastidae*, família *Trypanosomatidae*, que requerem hospedeiros diferentes para completar seu ciclo de vida, sendo um vertebrado que abriga a forma amastigota, e um invertebrado com a forma promastigota (NOLI, 1999; SLAPPENDEL; FERRER, 1990).

Dos vertebrados, o cão assume maior importância como reservatório doméstico, sendo que felinos, roedores e o homem também participam deste ciclo (FEITOSA et al., 2000; NOLI, 1999; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

O vetor invertebrado é um inseto hematófago, flebotomíneo, denominado *Lutzomia longipalpis*, conhecido popularmente como “mosquito palha”, “birigüi” ou “tatuquiras”. Possui pequeno tamanho, cor palha, grandes asas pilosas dirigidas para trás e para cima, com 2 a 3 mm de tamanho, de hábito alimentar noturno (ALENCAR et al., 1991; FEITOSA et al., 2000; FONSECA; SANTUCCI, 2001).

O ciclo biológico da *Leishmania* tem início quando o flebotomíneo infectante com a forma promastigota realiza seu repasto sangüíneo liberando-as na epiderme. Estas formas infectantes são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. Uma vez dentro de macrófagos, elas se diferenciam em amastigotas, geralmente ovais ou redondas variando de 2 a 5 µm com um cinetoplasto, multiplicando-se de forma binária com ruptura do macrófago. Os macrófagos, por sua vez, rompem-se, liberando novas formas amastigotas para reiniciarem o mesmo ciclo ou serem ingeridas por vetores em seu repasto sangüíneo. Uma vez dentro do vetor, sofrem divisão binária e se diferenciam em promastigotas flageladas que também sofrem divisão binária, multiplicação e se transformam em paramastigotas, colonizando o esôfago e faringe do vetor, sofrendo nova diferenciação para

forma promastigota metacíclica infectante (CASTRO, 1996; CORREIA; CORREIA, 1992; FEITOSA et al., 2000; NOLI, 1999).

2.3 Patogenia

O cão é considerado o principal reservatório fora do ambiente silvestre, pelo fato de apresentar maior número de parasitas na pele, e os casos caninos da leishmaniose visceral antecedem os casos humanos (FEITOSA, et al., 2000; FONSECA; SANTUCCI, 2001; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Uma vez infectadas, as células do sistema mononuclear fagocitário do cão atuam como células apresentadoras de antígenos, estimulando os linfócitos (CD4+) T auxiliares do tipo T1 (Ta1) ou T auxiliares do tipo2 (Ta2). Se forem ativadas as células Ta1, estas produzem citocinas (Interferon gama – fator de necrose tumoral) e a (Interleucina 2 – ativam macrófagos). Estes, por sua vez, estimulam a imunidade celular e, desta forma, podem eliminar a infecção. Quando a infecção induz os linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Ta2), ocorre a proliferação de células B e a produção de anticorpos, com resultado deletério e não protetor, desenvolvendo-se a infecção (FEITOSA et al., 2000; LOPEZ et al., 1996; NOLI, 1999; SLAPPENDEL; FERRER, 1990).

Com a regulação dos linfócitos T prejudicada e a grande atividade de linfócitos B, há a geração de inúmeros imunocomplexos circulantes que se depositam nas paredes de vasos sanguíneos, podendo causar vasculite, uveíte, poliartrite e glomerulonefrite (LOPEZ et al., 1996; NOLI, 1999; SLAPPENDEL; FERRER, 1990).

Vários órgãos podem ser afetados e o parasita pode ser encontrado em quase todos os tecidos e líquidos corpóreos. Por esta razão, a leishmaniose pode adquirir características clínicas diferentes.

O período de incubação compreende de um mês a sete anos e neste intervalo de tempo o parasita se dissemina amplamente, com predileção pela medula óssea, gânglios linfáticos, pele, baço e fígado.

Os sinais clínicos mais comuns são: diminuição da atividade física, onicogrifose, enfermidades da pele e perda de peso (NOLLI, 1999).

As principais alterações dermatológicas são queda de pêlos, lesões ulcerativas, geralmente presentes em saliências ósseas, plano nasal e espaços interdigitais, além de

prurido, dermatite seborréica, infecções secundárias bacterianas, fúngicas, e outras enfermidades associadas, como: linfossarcoma de Sticker, demodicose, malassezíase e escabioses (NOLI, 1999; FEITOSA e cols., 2000).

Alterações urinárias são comuns e se caracterizam por poliúria, polidipsia, proteinúria, hematúria, geralmente provenientes de glomerulonefrite proliferativa, nefrite intersticial, por deposição de imunocomplexos circulantes; podendo culminar em insuficiência renal (FEITOSA et al., 2000; NOLLI, 1999).

As leishmanias também se multiplicam nos macrófagos do fígado, causando hepatite crônica ativa, vômitos, ascite e icterícia. As alterações do sistema gastrointestinal geralmente estão correlacionadas aos problemas hepáticos e renais, apresentando colites ulcerativas crônicas, com diarreia e melena. Podem também ocorrer enterites agudas fatais, como resultado de danos parasitários diretos.

Os cães podem apresentar distúrbios de coagulação como tempo de sangramento prolongado, diátese hemorrágica, presença de petéquias, hematúria, epistaxe, hiperglobulinemia, interferindo na polimerização da fibrina, uremia, inibindo a função plaquetária, seqüestro esplênico de plaquetas, trombocitopenia por aplasia ou hipoplasia medular. O quadro pode se agravar com infecções associadas à erlichiose, babesiose e dirofilariose, em regiões endêmicas.

O sistema respiratório pode ser afetado, com ocorrências de epistaxe, geralmente unilateral; que se acredita ocorrer como resultado de lesões ulcerativas da mucosa nasal ou por alterações de coagulação. Alguns animais desenvolvem pneumonia intersticial (FEITOSA et al., 2000; NOLI, 1999).

Em alguns cães ocorre blefarite, ceratoconjuntivite, uveíte bilateral, edema de córnea e sinéquia, por deposição de imunocomplexos ou pela presença da própria leishmania.

Das alterações neurológicas observadas com maior frequência, destacam-se paresia de membros, ataxia, andar em círculos, tremores e convulsões. (FEITOSA et al., 2000).

Atrofia muscular é verificada, inicialmente, nas fossas temporais seguida de perda generalizada da massa muscular. Como consequência, ocorre diminuição da atividade física, associada a distúrbios locomotores. Esta debilidade muscular e a diminuição da atividade física podem decorrer da anemia, atrofia muscular, da poliartropatia e insuficiência renal crônica (FEITOSA et al., 2000; NOLLI, 1999).

Problemas locomotores são decorrentes de poliartrites, sinovites, polimiosite, osteoartrite, periostite proliferativa, lesões osteolíticas, úlceras interdigitais, lesões de coxim plantar e neuralgia (BEVILACQUA et al., 2002; FEITOSA et al., 2000; NOLLI, 1999).

2.4 Enfermidade articular inflamatória e infecciosa

A doença articular inflamatória caracteriza-se pelo aumento da quantidade de neutrófilo no líquido sinovial (LS). A contagem absoluta de neutrófilo segmentado evidencia, tipicamente, aumento moderado a intenso, e a causa pode envolver agentes infecciosos e não-infecciosos (FISHER, 2003).

Algumas doenças articulares são causadas por bactérias, fungos, micoplasma, espiroquetas (*Borrelia burgdorferi*), protozoários (*Leishmania donovani*), vírus (calicivírus, coronavírus) e bactérias (*Ehrlichia canis*, *Anaplasma fagocitum*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*) e riquéticias (*Rickettsia rickettsii*). Os microrganismos podem alcançar as articulações por via hematogena ou pela inoculação direta (DANLER, 2001; FISHER, 2003; NELSON; COUTO, 1994).

Em 2002, McConkey relatou um caso em que um cão apresentava claudicação e dor nas articulações com evolução de dois anos, diagnosticado como poliartrite erosiva, subluxação e colapso dos espaços articulares dos carpos, afetando também a articulação do cotovelo, apresentando moderado aumento de celularidade no LS que consistiam de 23% de neutrófilos, 16% células mononucleares, e 61% pequenos linfócitos. Muitos macrófagos e neutrófilos continham numerosos microrganismos, com cinetoplasto, compatíveis com *Leishmania sp.*

Nas artrites sépticas, o pH pode se apresentar abaixo do valor normal (SAWYER, 1963), o número de leucócitos aumenta acentuadamente, o coágulo da mucina é ruim e há aumento na concentração de proteína total (BIASE et al., 2001; FERNANDEZ et al., 1983; VAN PELT, 1974).

O LS é um dialisado do plasma sangüíneo e contém proteínas, às quais o ácido hialurônico (AH) se adere, secretado pelas células sinoviais quando o plasma se difunde pelas paredes dos capilares (VAN PELT, 1962 e 1967). Além da secreção de AH, o LS é

acrescido de glicoproteínas e outras macromoléculas (MAHAFFEY, 1992 e 2002). É um fluido viscoso, amarelo claro, límpido, livre de partículas e que não coagula (BARNABÉ, 2001 e 2004; BIASE et al., 2001; FERNANDES et al., 1983; VAN PELT, 1967 e 1974) desprovido de fibrinogênio e outros fatores de coagulação, com pH entre 7 e 7,8 (SAWYER, 1963), e concentração de proteína de 2 a 2,5g/dl (PERMAN, 1980).

A primeira barreira seletiva que o plasma deve ultrapassar é formada pelos capilares próximos à superfície da camada sinovial interna, em contato direto com a substância basal entre os sinoviócitos e poros endoteliais. O tecido conjuntivo da substância basal, juntamente com a camada de AH-proteína secretada pelos sinoviócitos formam a “membrana” pela qual o plasma é dialisado (BARNABÉ et al., 2004).

Pequenas moléculas, glicose e eletrólitos encontram-se em concentrações similares no LS, entretanto, em condições normais, as proteínas plasmáticas devem cruzar a “barreira sangue-sinóvia”, fazendo-o de forma limitada (MAHAFFEY, 1992 e 2002). Essa permeabilidade seletiva é mantida pelos estreitos espaços entre os sinoviócitos e pela composição da matriz extracelular, bem como pelo AH (TODHUNTER, 1996).

O AH origina-se da membrana sinovial, sendo considerado o composto de maior importância do LS, conferindo-lhe várias propriedades exclusivas, como a alta viscosidade e capacidade de lubrificação e influência a composição do mesmo.

O LS pode ser considerado um fluido tecidual especializado que reflete alterações no tecido sinovial, isto é, líquido e membrana sinoviais (BARNABÉ et al., 2004; McILWRAITH, 1980 e 1987; VAN PELT, 1962;) e no metabolismo intra-articular (VAN PELT, 1962, 1974).

Segundo Barnabé, (2004), para que tais mudanças ocorram são necessárias duas alterações fundamentais, uma anormalidade na troca de várias substâncias através da barreira sangue-líquido sinovial e um distúrbio no metabolismo intra-articular. O grau de permeabilidade desta barreira varia com a severidade e tipo de inflamação (VAN PELT, 1967).

A quantidade de células nucleadas encontrada no LS normal de cães, pode variar de 250 a 3000, com 94% a 100% de células mononucleares e 0 a 6% de neutrófilos (BIASE et al., 2001; BRINKER et al., 1986).

3 OBJETIVOS

Considerando o crescente número de casos de leishmaniose visceral com comprometimento articular, despertou-se a necessidade de estudar a artrite experimental em cães positivos.

Desta forma este trabalho teve por objetivos: descrever as alterações articulares da leishmaniose experimental através de

- a) Avaliações clínica e radiográfica;
- b) Análises citológica, parasitológica e físico-química do líquido sinovial, das articulações inoculadas e controles.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizados 20 cães adultos, de raças variadas, sendo dez machos e dez fêmeas, de um a quatro anos de idade, pesando entre 10 e 35 kg, respectivamente. Todos os animais, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Andradina-SP, eram sorologicamente positivos para leishmaniose visceral pelos testes de Imunofluorescência Indireta e ELISA.

O critério de escolha dos animais para inclusão no procedimento experimental constou de exame físico completo e radiográfico, que definiu ausência de lesões articulares.

Antes do período experimental os animais foram vermifugados com Endal plus®¹ (5 mg/kg/dose única) e receberam tratamento com Doxiciclina®² (5 mg/kg/12h por 21 dias), para eliminar a possibilidade de ocorrência de erlichiose.

Durante o experimento, os animais utilizaram coleira inseticida Scalibur®³ e foram alojados em canis telados, recebendo água e ração comercial "ad libidum".

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina \veterinária Veterinária de Araçatuba (SP) da UNESP – Campos Araçatuba.

4.2 Inoculação intra-articular de *Leishmania chagasi* e momentos das avaliações

O período experimental constou de três momentos, a saber:

-Momento 0 (zero): os animais foram submetidos a exames radiográficos das articulações fêmoro-tibial (FT) e escapuloumeral (EU) direita e esquerda em duas projeções, médio-lateral e antero-posterior para exclusão de outras doenças articulares degenerativas e posterior comparação.

¹ Praziquantel, 50mg, palmoato de pirantel 144 mg, febantel 150mg, laboratório Schering-Plough S.A.

² Doxiciclina 100 mg, laboratório Pfizer

³ deltrametrina -,laboratório Intervet

-Momento 1: Colheita de uma amostra do líquido sinovial 500 µl, com agulha 40x10 ou 40x12, em todos os animais, para realização dos exames laboratoriais. Após anestesia geral, por meio de tricotomia e anti-sepsia com iodo povidine sobre a pele, foi realizada a artrocentese das articulações fêmoro-tibial e escapuloumeral, de forma bilateral, em seguida, inoculações intra-articulares com 1×10^6 (CERQUEIRA et al., 2003. LIMA et al. 2003) de formas amastigotas de *Leishmania chagasi*¹ diluídas em 500 µl de solução salina nas articulações escapuloumeral esquerda e fêmoro-tibial direita. Como controle nas articulações EU direita e FT esquerda, foi inoculado 500 µl de solução isotônica salina.

A escolha dos membros inoculados em diagonal foi proposital para diminuir uma possível exacerbação da claudicação ipsilateral, o que dificultaria a avaliação clínica desse sintoma.

- Momento 2: trinta dias após M1, foram realizados exames radiográficos das quatro articulações em todos os animais, e colheita do líquido sinovial para realização de exame citopatológico e posterior eutanásia por anestesia geral intravenosa com barbitúrico e administração de cloreto de potássio.

Propositalmente, não foi utilizado um grupo controle compreendendo animais sadios inoculados por *Leishmania chagasi*, uma vez que este procedimento não é permitido pelos órgãos de Saúde pública, OMS e pela comissão de ética local.

4.3 Avaliação clínica das articulações

Um protocolo de avaliação do sistema locomotor foi elaborado contendo informações da avaliação diária de cada animal durante o período experimental.

¹ cepa MHOM/BR00/MERO 02 - FIOCRUZ-Bahia

Os parâmetros avaliados diariamente foram: temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$), temperatura local articular (diminuída, normal e aumentada), através de mensuração com a região dorsal da mão do examinador sobre a área; dor, aumento de volume articular, crepitação articular, restrição ou exacerbação de movimentos, assimetria, atrofia muscular, claudicação, impotência funcional.

4.4 Avaliação Radiográfica

Os exames radiográficos ¹ (Filmes 24 x 30 cm e 30 x 40 cm) foram realizados no momento 0 (zero) e no momento 2 (após 30 dias), totalizando oito projeções por animal (ântero-posterior e médio-lateral), com objetivo de verificar, por método comparativo, imagens radiográficas compatíveis com: efusão articular, irregularidade nas superfícies articulares, esclerose óssea e osteófitos .

4.5 Análise do líquido sinovial (LS)

A avaliação do LS foi realizada nos momentos M1 e M2, e constataram de:

4.5.1 Exames físico e químico

À inspeção de tubos de ensaio foram avaliados cor e aspecto. Utilizando-se fitas reagentes², foram avaliados: pH, proteínas, leucócitos (negativo, traços, baixo, moderado e alto), sangue (negativo, hemolisado e não hemolisado). E a densidade, por refratometria.

¹ Fotobras Fotossensíveis do Brasil Ind. Com. Ltda.

² Combur 10 teste UX Roche Diagnostic GmbH e Uridiag Baydiag Ltda

4.5.2 Viscosidade

A determinação da viscosidade foi realizada no momento da transferência do LS da seringa de colheita para lâmina de vidro, estimando-se o comprimento, em centímetros, do filamento formado pela gota antes do seu desprendimento da extremidade da seringa. Considerou-se ausente: sem formação de filamento; diminuída: comprimento do filamento inferior a 5 cm, normal: ultrapassar a 5 cm (BARNABÉ et al., 2005).

4.5.3 Teste de Qualidade de precipitação da mucina (TQPM)

Foi realizado o teste de coágulo de mucina segundo Fisher (2003) no M2, devido à colheita do LS ser superior a 1ml. O procedimento constou da adição de uma ou duas gotas de líquido sinovial em 8 gotas de ácido acético 2% ¹. Este teste baseia-se na precipitação do sal protéico do ácido hialurônico após a acidificação do líquido sinovial, formando um coágulo que reflete o grau de polimerização do ácido hialurônico (ALTMAN e GRAY, 1984). Segundo Parry (1996) e Barnabé et al., (2005), pode ser graduado em: bom (formação de coágulo compacto e grande em solução límpida), regular (formação de coágulo amolecido em solução discretamente turva), ruim (coágulo friável em solução turva) ou péssimo (não formação de coágulo, mas alguns flocos em solução turva).

4.5.4 Análise citológica

O exame da citologia realizado no M2 compreendeu a contagem diferencial e morfológica das células do líquido sinovial, bem como a pesquisa direta das formas amastigotas do parasito.

Para a contagem das células nucleadas foram utilizados um ou mais esfregaços do LS em cada momento, para todas as articulações, corado com corante panótico rápido².

¹ Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda

² Instant-Prov - Newprov produtos para laboratório

O exame citológico constou da contagem de 100 células nucleadas em cada esfregaço, utilizando microscópio de luz com objetiva de imersão (100X). Utilizou-se um trajeto em forma de “zigue-zague” na lâmina, de uma extremidade lateral à outra, registrando-se as células nucleadas em seu trajeto.

As células nucleadas foram classificadas como neutrófilos, linfócitos, e mononucleares fagocitários e os resultados foram expressos em percentuais.

4.5.5 Análise parasitológica

A pesquisa foi realizada nos momentos M1 e M2, observando, no LS, a presença de parasitas fora e dentro de células mono e polimorfonucleares, avaliando-se a contagem de 100 células.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística constituiu-se de:

- 1) Teste de McNemar: para comparar a proporção de alterações clínicas nas diferentes articulações.
- 2) Teste de Wilcoxon: para comparar a temperatura local das articulações escapuloumeral (EU) e fêmoro-tibial (FT), as variáveis físico-químicas do grupo inoculado nos M1 e M2 para cada uma das articulações e a precipitação da mucina (TQPM) dos grupos controle e inoculado para cada uma das articulações.
- 3) Coeficiente de correlação de Spearman: para comparar as variáveis viscosidade e TQPM para cada articulação e grupo.

As estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. A análise estatística foi efetuada empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System) (ZAR, 1998).

5 RESULTADO

Dentre os 20 animais selecionados, quatro morreram devido ao rápido avanço da doença que ocorreu principalmente após a inoculação intra-articular, com piora dos sintomas digestórios e urinários. Um animal apresentou contaminação bacteriana no líquido sinovial e em outro, foi identificado mórula de *Ehrlichia sp.* no interior de macrófago, sendo excluídos do experimento.

5.1 Avaliação clínica das articulações inoculadas

Nos 14 animais avaliados foi identificado dor articular, claudicação, restrições de movimentos e atrofia muscular, nas articulações avaliadas não foram observadas alterações de volume articular, crepitação articular, exacerbação de movimentos, assimetria ou impotência funcional parcial ou total do membro durante o período de 30 dias.

Os resultados obtidos no exame clínico das articulações EU e FT inoculadas entre o M1 e M2. estão contidos na TABELA 1.

Com referência à variável restrição de movimento, pode-se observar que esta ocorreu na articulação EU em 50% dos animais e em 71,4% na articulação FT, não apresentando diferença significativa entre as articulações inoculadas.

Atrofia muscular do membro, cuja articulação recebeu inoculo, persistiu durante todo o período experimental sendo que 71,4% dos animais a apresentaram no membro torácico esquerdo e 78,6% no membro pélvico direito, não ocorrendo diferença significativa entre as articulações inoculadas. Na maioria dos casos a atrofia muscular ocorreu de forma generalizada, com discreta diferença entre as articulações controle e inoculadas.

Todos os animais apresentaram claudicação e relutância em andar, observando-se uma diferença significativa ($p=0,0040$) entre as articulações EU e FT inoculadas, ainda 37,5% manifestaram na articulação EU e 100,0% na articulação FT, durante todo período experimental. Os 14 animais apresentaram dor local, observada após a inoculação, bem como no decorrer do período experimental, não diferindo significativamente ($p=0,2500$) quanto às articulações EU e FT inoculadas onde esse sintoma clínico foi evidente, 75,0% apresentaram na articulação EU e 100,0% na articulação FP.

Todos os sinais clínicos avaliados foi mais evidente na articulação FT.

Tabela 1 - Restrição de movimento, atrofia muscular, claudicação e dor, observados nas articulações escapuloumeral (EU) e fêmoro-tibial (FT) nos 14 cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* e experimentalmente inoculados intra-articular por *Leishmania chagasi* (Araçatuba – SP, 2006).

Sinais clínicos	Articulação EU		Articulação FT		P ⁽¹⁾
	n	%	n	%	
Restrição de movimentos	7	50,0	10	71,4	0,2500
Atrofia muscular	10	71,4	11	78,6	1,0000
Claudicação	5	35,7	14	100,0	0,0040
Dor	11	78,6	14	100,0	0,2500

⁽¹⁾ teste de McNemar

Em relação à temperatura local, as articulações controle não apresentaram alterações. Nas articulações inoculadas, houve um aumento inicial que foi atribuído à inflamação pós-inoculação que manteve-se dentro dos padrões de normalidade após o 7º dia. Este parâmetro não apresentou diferença estatística significativa entre as articulações estudadas em todos os momentos avaliados.

A temperatura corporal avaliada ao longo de trinta dias, oscilou entre 37°C a 40,7 °C, com uma média de 38,8 °C.

5.2 Avaliação Radiográfica

Não foram encontradas quaisquer alterações ósseas e articulares nos 14 animais em nenhum dos momentos avaliados conforme pode-se na FIGURA 1.

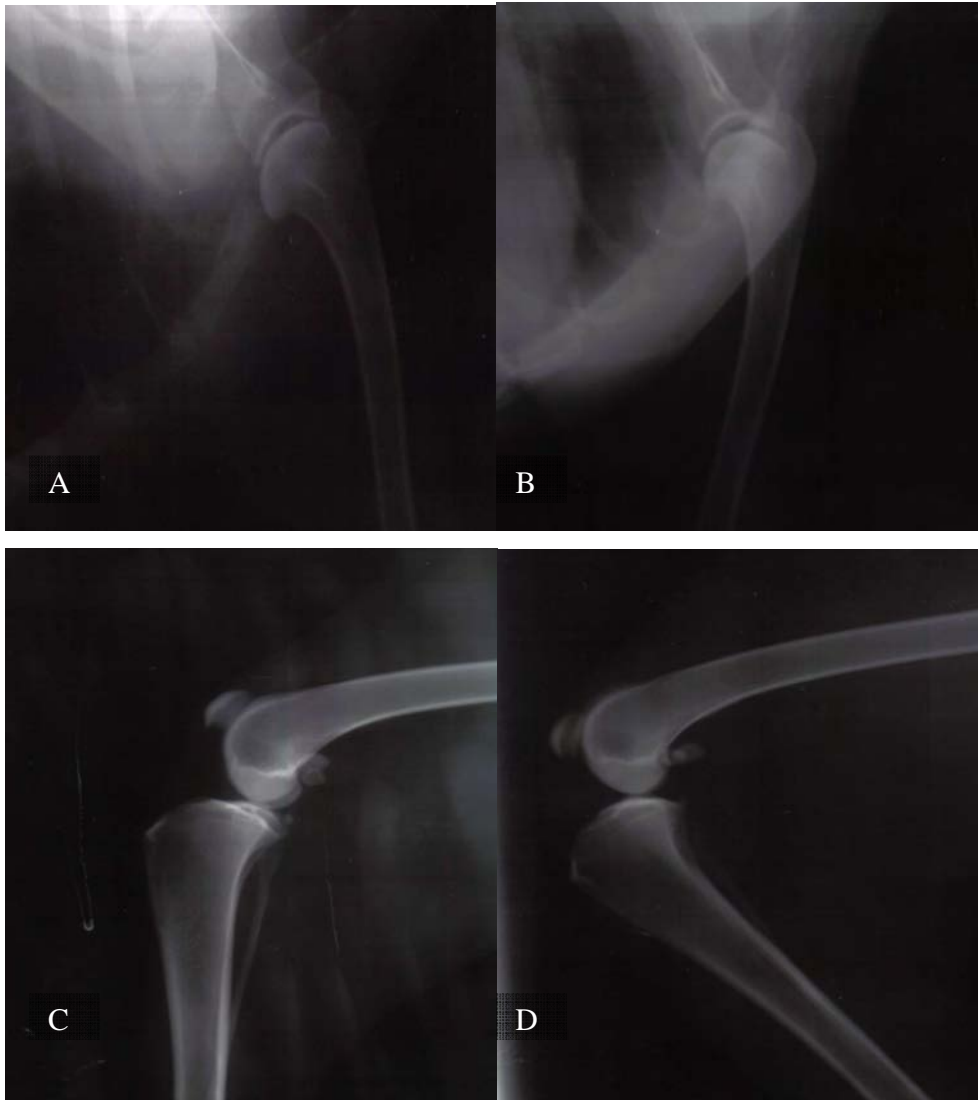


Figura 1 – Imagens radiográficas das articulações EU esquerda e FT direita de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral e experimentalmente inoculados com formas amastigotas de *Leishmania chagasi*. A: articulação EU esquerda no M0; B: articulação EU esquerda no M2; C: articulação FT direita no M0 e D: articulação FT direita no M2. Superfícies articulares normais, sem áreas de proliferação ou lise.

5.3 Análise do líquido sinovial (LS)

5.3.1 Exames Físico e Químico

Obteve-se LS em 100% das punções realizadas e o volume obtido na articulação FT, em M1, não ultrapassou 0,4 ml. No M2, variou de 1,2 ml a 1,5 ml na articulação FT e na articulação EU de 1,0 ml a 2,0 ml. Das 56 punções realizadas, o LS apresentou-se com aspecto amarelo palha, límpido e com ausência de partículas. Na punção, onze amostras foram contaminadas com sangue, devido à ruptura de capilares subsinoviais.

As TABELAS 4 e 5 contemplam os resultados dos parâmetros avaliados (leucócitos, proteína, pH e viscosidade) do líquido sinovial das articulações EU e FT nos momentos M1 e M2.

No líquido sinovial das articulações EU e FT controles, não foi identificado à presença de leucócitos no M1 em todos os animais. No M2, após a inoculação de solução fisiológica, foi detectado através do método utilizado, a presença de leucócitos em intensidade moderada em 57,1% e 71,4% para EU e FT, respectivamente.

Para articulações EU e FT a serem inoculadas, também não foram detectados leucócitos em M1. No M2, 30 dias após o inoculo de (1×10^6) promastigotas foi verificado aumento moderado de leucócitos em 78,6% na EU e, em 85,7% na FT, respectivamente.

A concentração de proteína no LS na articulação EU controle no M1 foi variável, não tendo sido detectada em 35,7% dos animais. Apresentou nível de normalidade em 7,1% e foi considerada moderada em 57,2%. No M2, observo-se valores normais em 35,7% e 64,3% moderada.

Na articulação EU a ser inoculada, M1, a concentração de proteína não foi detectada em 28,6%, esteve normal em 14,3% e intensidade moderada em 57,1%. No M2, a proteína apresentou-se com intensidade moderada em 92,9% e elevada em 7,1%.

Na articulação FT controle, no M1 a concentração de proteínas não foi detectada em 42,9% e de forma moderada em 57,1%. Em M2, esteve moderada em 85,7% e elevada em 14,3%.

Na articulação FT inoculada, no M1 não foi detectado presença de proteínas em 35,7%, ocorrendo de forma moderada em 64,3%. Em M2, 28,6% dos animais apresentaram

nível moderado da mesma e esteve elevada em 71,4%. Houve diferença estatística significativa nas articulações EU e FT inoculadas no M2 ($p < 0,0010$).

O pH do LS no grupo controle manteve-se alcalino na articulação EU e FT em todos os momentos. Em três animais, observou-se pH ácido na articulação FT controle. O grupo inoculado apresentou valores inferiores ao limite nas articulações EU e FT, de forma mais acentuada em M2 indicando pH ácido. Esta alteração foi detectada nas articulações FT de sete animais no M2.

Houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0266$) entre as articulações EU e FT inoculadas, em M2.

Tabela 2 - Valores bioquímicos de pH do líquido sinovial (média e desvio-padrão) obtidos das articulações escapuloumeral (EU) e fêmoro-tibial (FT), dos grupos inoculado e controle, em diferentes momentos (M1 e M2) nos 14 cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* e experimentalmente inoculados intra-articular por *Leishmania chagasi* (Araçatuba – SP, 2006)

Variável	Grupo	Articulação EU		Articulação FT	
		M1	M2	M1	M2
pH	Controle	8,21 ± 0,26	7,82 ± 0,32	8,14 ± 0,23	7,57 ± 0,78
	Inoculado	8,21 ± 0,26	7,25 ± 0,80	8,18 ± 0,25	6,68 ± 1,19

Viscosidade

A viscosidade do LS da articulação EU controle apresentou-se dentro dos valores normais em 100% dos casos no M1, enquanto no M2, diminuída em 57,1%. Na articulação EU inoculada, este parâmetro esteve em 100% dos casos normais no M1, e diminuída em 100% dos casos no M2.

A articulação FT controle manteve um padrão idêntico à EU controle no M1 e diminuída em 42,9% dos casos no M2. Na articulação FT inoculada, em 71,4% dos animais

a viscosidade esteve normal e diminuída em 28,6%, no M1. No M2, ausente em 35,7% e diminuída em 64,3%.

Esta variável esteve diretamente correlacionada ao coágulo de mucina, apresentando coeficientes de correlação de Spearman, a saber: articulações EU controle ($r_s = 0,603$; $p=0,0224$), FT controle ($r_s=0,835$; $p<0,0002$), FT tratado ($r_s=0,913$; $p<0,0001$).

Na articulação EU inoculada, não foi possível calcular o coeficiente de correlação, pois todos os cães apresentaram viscosidade diminuída.

5.3.2 Precipitação da Mucina

Os resultados obtidos no Teste qualidade precipitação da mucina (TQPM) do líquido sinovial obtido das articulações escapuloumeral (EU) e fêmoro-tibial (FT), inoculadas e controle, no 30º dia de avaliação encontram-se na Tabela 3.

A formação de coágulo de mucina não foi avaliada no M1 devido a quantidade de LS ser insuficiente para o teste. Ao se compararem os grupos controle e inoculado, observou-se que, na articulação EU controle, três animais apresentaram coágulo categorizado como bom, e onze animais, como regular, na articulação EU inoculada, em seis animais, a qualidade do coágulo foi considerado regular e em oito deles, o coágulo apresentou-se ruim. Houve diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos ($p=0,0039$).

Na articulação FT controle, quatro animais apresentaram coágulo categorizado como bom, cinco, regular e em outros cinco, coágulo ruim. Na articulação FT inoculada, dois animais com coágulo regular, sete com coágulo ruim e cinco, coágulo péssimo. Observando-se uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0010$) entre as articulações FT controle e inoculada.

Foi observado também que a articulação FT inoculada mostrou-se mais susceptível à infecção, apresentando diferença significativa ($p=0,0469$) quando comparada à articulação EU inoculada.

Tabela 3 - Teste qualidade precipitação da mucina (TQPM) do líquido sinovial obtido das articulações escapuloumeral (EU) e fêmoro-tibial (FT), inoculadas e controle, no 30º dia de avaliação, nos 14 cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* e experimentalmente inoculados intra-articular por *Leishmania chagasi* (Araçatuba – SP, 2006).

TQPM	EU				FT			
	Controle		Inoculado		Controle		Inoculado	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Péssimo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	35,7
Ruim	0	0,0	8	57,1	5	35,7	7	50,0
Regular	11	78,6	6	42,9	5	35,7	2	14,3
Bom	3	21,4	0	0,0	4	28,6	0	0,0
P ⁽¹⁾	0,0039				0,0010			

⁽¹⁾ teste de Wilcoxon

TQPM - EU Inoculado x FT Inoculado : p = 0,0469

Tabela 4 - Valores de leucócitos, proteína, viscosidade e pH, obtidos do líquido sinovial das articulações escapuloumeral (EU) inoculada e controle, em diferentes momentos (M1 e M2) nos 14 cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* e experimentalmente inoculados intra-articular por *Leishmania chagasi* (Araçatuba – SP, 2006).

Variável	Categoria	Articulação EU				Articulação EU				P ⁽¹⁾
		Controle				Inoculada				
		M1		M2		M1		M2		
N	%	N	%	n	%	n	%			
Leucócitos	Ausente	14	100,0	6	42,9	14	100,0	3	21,4	—
	Moderado	0	0,0	8	57,1	0	0,0	11	78,6	
Proteína	Ausente	5	35,7	0	0,0	4	28,6	0	0,0	0,0156
	Normal	1	7,1	5	35,7	2	14,3	0	0,0	
	Moderada	8	57,2	9	64,3	8	57,1	13	92,9	
	Elevada	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,1	
Viscosidade	Diminuída	0	0,0	8	57,1	0	0,0	14	100,0	—
	Normal	14	100,0	6	42,9	14	100,0	0	0,0	
pH	Ácido	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	14,3	0,0005
	Normal	0	0,0	4	28,6	0	0,0	8	57,1	
	Alcalino	14	100,0	10	71,4	14	100,0	4	28,6	

⁽¹⁾ teste de Wilcoxon para o grupo inoculado

Tabela 5 - Valores de leucócitos, proteína, viscosidade e pH, obtidos do líquido sinovial das articulações fêmoro-tibial (FT) inoculada e controle, em diferentes momentos (M1 e M2) nos 14 cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* e experimentalmente inoculados intra-articular por *Leishmania chagasi* (Araçatuba – SP, 2006).

Variável	Categoria	Articulação FT				Articulação FT				P ⁽¹⁾
		Controle				Inoculada				
		M1		M2		M1		M2		
n	%	n	%	N	%	n	%			
Leucócitos	Ausente	14	100,0	4	28,6	14	100,0	2	14,3	—
	Moderado	0	0,0	10	71,4	0	0,0	12	85,7	
Proteína	Ausente	6	42,9	0	0,0	5	35,7	0	0,0	0,0010
	Normal	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	Moderada	8	57,1	12	85,7	9	64,3	4	28,6	
Viscosidade	Elevada	0	0,0	2	14,3	0	0,0	10	71,4	0,0020
	Ausente	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	35,7	
	Diminuída	0	0,0	6	42,9	4	28,6	9	64,3	
pH	Normal	14	100,0	8	57,1	10	71,4	0	0,0	0,0007
	Ácido	0	0,0	3	21,4	0	0,0	7	50,0	
	Alcalino	0	0,0	1	7,1	0	0,0	3	21,4	
		14	100,0	10	71,5	14	100,0	4	28,6	

⁽¹⁾ teste de Wilcoxon para o grupo inoculado

5.3.4 Densidade

A densidade do líquido sinovial obtida das articulações EU e FT variaram de 1010 a 1030 dos Grupos controle e inoculado, e os valores estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de densidade do líquido sinovial (média e desvio-padrão) obtidos das articulações escapuloumeral (EU) e fêmoro-tibial (FT), inoculada e controle, em diferentes momentos (M1 e M2) nos 14 cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* e experimentalmente inoculados intra-articular por *Leishmania chagasi* (Araçatuba – SP, 2006)

Variável	Grupo	EU		FT	
		M1	M2	M1	M2
Densidade	Controle	1012,5 ± 7,3	1016,1 ± 6,8	1015,4 ± 6,0	1019,3 ± 7,3
	Inoculado	1014,3 ± 5,5	1018,2 ± 8,0	1015,0 ± 5,5	1024,6 ± 7,5

5.3.5 Citologia

A observação de eritrócitos nos esfregaços do LS em M1 e M2 foi rara, excetuando-se quando houve contaminação com sangue durante a colheita.

No M1, observaram-se células sinoviais em 100% das amostras (FIGURA 2A); em 90% das articulações, houve predomínio de células mononucleares, principalmente de linfócitos e monócitos. Apenas em um dos animais houve predomínio de neutrófilos no M1, em três articulações, excetuando a articulação EU controle em que se pode observar a mucina (FIGURA 2B). Nesse mesmo animal, observou-se *Leishmania sp.* no interior de macrófagos e neutrófilos, nos momentos M1 e M2. A observação de neutrófilos nos esfregaços ocorreu em 8% das articulações avaliadas em M1.

No M2, em relação aos tipos celulares identificados, a alteração mais marcante foi a elevação do percentual de neutrófilos, que ocorreu em 59% dos cães avaliados. A

freqüência de neutrófilos foi acima de 70% na maioria dos casos, havendo dois casos em que atingiram mais de 90% das células nucleadas totais contadas.

Houve inversão da celularidade em M1 e M2, caracterizado pela substituição de mononucleares por polimorfonucleares, especificamente neutrófilos (FIGURA 2C).

Nas articulações EU inoculadas não ocorreram alterações significantes nos momentos M1 e M2, havendo predomínio de células mononucleares (FIGURA 2D). Apenas em um animal houve inversão de celularidade na articulação EU inculada, com valores de neutrófilos acima de 70% e presença de *Leishmania sp.* no interior de macrófagos e de neutrófilos. Por outro lado, foram constatadas mudanças na celularidade das articulações FT, comparando-se M1 com M2, já que em 56% dos animais, a articulação FT inoculada apresentou predomínio de neutrófilos, com valores que variaram de 55 a 86% da celularidade em M2 (FIGURA 2E).

No M2, em 64% dos animais foi observado formas amastigotas de *Leishmania sp.* no LS. Em todos esses cães, o protozoário foi identificado no citoplasma de macrófagos (Figura 2F), e em dois cães as formas amastigotas do parasita localizavam-se no interior do citoplasma de neutrófilos.

Em relação às articulações onde o parasita foi identificado, ocorreu em dois cães na articulação EU, enquanto na articulação FT, foi detectado em sete cães. Destes sete, as formas amastigotas foram verificadas no M1 em três animais, correspondendo três articulações a serem inoculadas e uma controle.

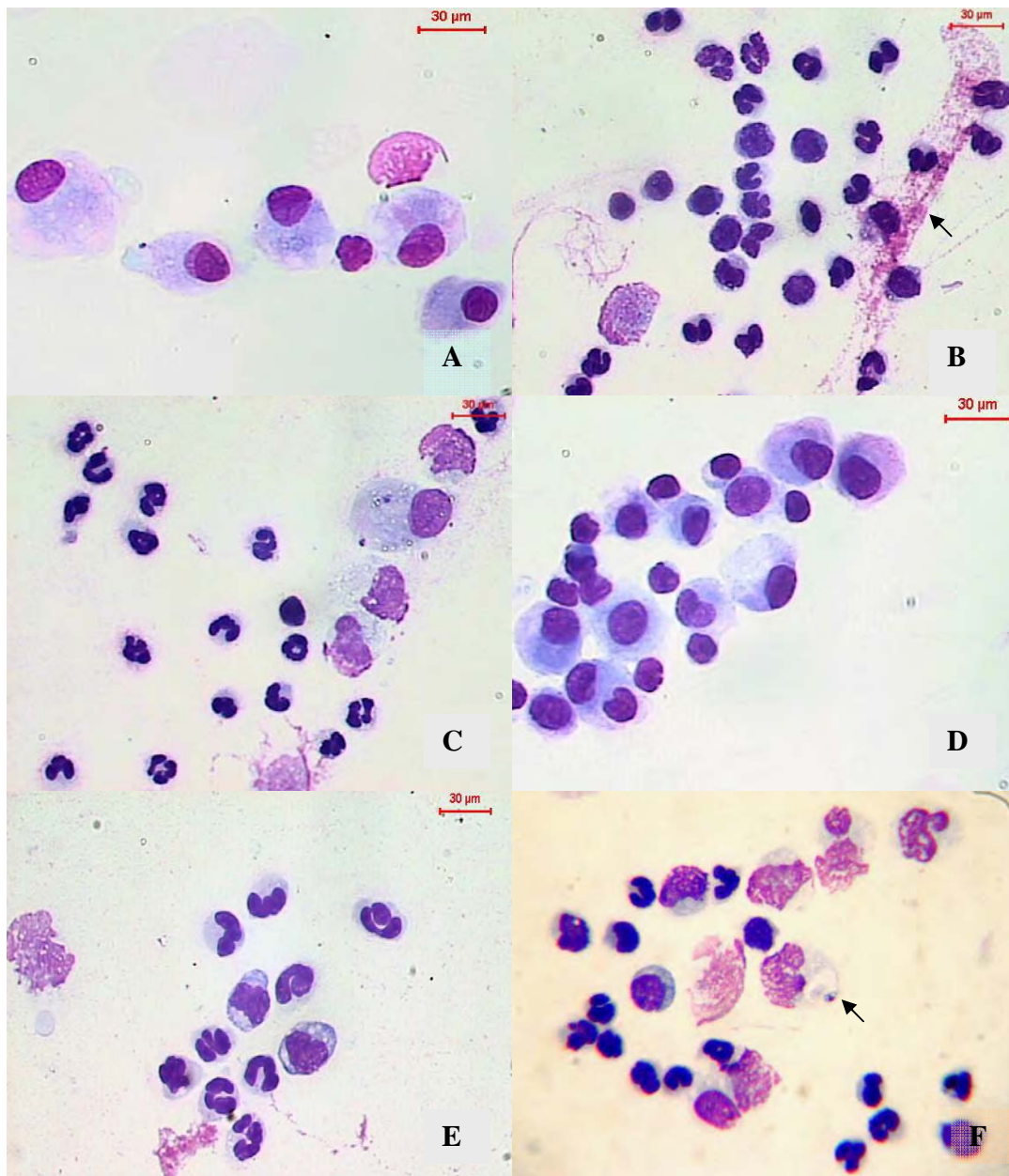


Figura 2 - Fotomicrografia do líquido sinovial das articulações EU esquerda e FT direita, de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* e experimentalmente inoculadas com formas amastigotas de *Leishmania chagasi*. A: Células sinoviais em M1; B: mucina (seta), neutrófilos e linfócitos em M2; C: neutrófilo em M2; D: Células sinoviais e mononucleares em M2; E: Predomínio de neutrófilos em M2; F: Macrófago com *Leishmania sp.* (seta) em M2 (Araçatuba – SP, 2006).

6 DISCUSSÃO

Restrições de movimento ocorrem em grande parte dos animais com infecção natural por *Leishmania sp.* (FEITOSA et al., 2000; LONGSTAFFE et al., 1983; NOLLI, 1999). Neste trabalho, a relutância à marcha, claudicação e atrofia muscular foram observadas com maior intensidade nos primeiros dias após a inoculação do agente nas articulações EU e FT.

A incidência de claudicação em cães com infecção natural compreende de 30% a 37,5% dos casos (BEVILACQUA et al., 2002; BURACCO et al., 1997; FEITOSA et al., 2000; MCCONKEY et al., 2002; NOLLI, 1999; WOLSCHRIJN et al., 1996), porém como consequência da inoculação experimental de promastigotas esta alteração esteve presente na totalidade dos animais, sendo mais evidente na articulação FT quando comparada a EU. A dor é um sinal clínico local está sempre presente nas artrites sépticas segundo Nelson e Couto (1994). Alguns animais deste trabalho apresentaram dor, após inoculação e outros, no decorrer do período experimental.

A articulação FT mostrou-se mais sensível e de grande importância no diagnóstico de enfermidades articulares apresentando sintomas de forma precoce e com maiores alterações. Estes achados provavelmente se devam ao menor espaço articular, maior vascularização local pelo fato de ser uma articulação submetida a menor estresse mecânico, quando comparada à articulação escapuloumeral.

Na análise radiográfica das articulações do M0 e M2, não foram identificadas quaisquer alterações articular e óssea, o que está de acordo com os relatos de Agut et al., (2003), Feitosa (2006) que identificaram *Leishmania sp* no LS de cães, na ausência de alterações radiográficas evidentes. Padrões de poliartrite erosiva e não erosiva são descritos em animais acometidos pela leishmaniose visceral segundo Agut et al. (2003), Blavier et al. (2001), Buracco et al. (1997); Mcconkey et al. (2002), e Wolschrijn et al. (1996). Cães portadores da doença apresentaram quadro de claudicação com evolução lenta de um a dois anos antes dos sinais radiográficos de osteoartrite estarem evidente. (Mcconkey et al., 2002; Wolschrijn et al., 1996).

Alterações radiográficas das articulações envolvidas nas artrites sépticas, inicialmente, são inespecíficas e se limitam a espessamento da membrana sinovial e cápsula articular e, em infecções crônicas, é possível observar, radiograficamente, degeneração de

cartilagem, formação osteófitos periarticulares, reação periosteal e lise óssea subcondral (NELSON; COUTO, 1994). Desta forma, para se detectarem alterações radiográficas ósseas em cães com leishmaniose, talvez seja necessário um período de observação superior ao proposto neste trabalho, que foi de trinta dias.

Segundo Lozier e Menard (1998) e Borges et al. (1999), o volume médio de LS na articulação fêmoro-patelar normal do cão é de 0,24 ml. Embora a média encontrada neste experimento, em M1, tenha sido de 0,4 ml e, portanto, maior do que a de cães saudáveis, este volume é ainda escasso para realização de toda análise proposta neste estudo. Porém, após 30 dias (M2), maior volume de LS foi obtido nas articulações inoculadas, sendo que na articulação FT e EU os volumes não excederam a 1,5 ml, e 2 ml respectivamente. Esta observação reforça a idéia de que, nas artrites sépticas, ocorre aumento significativo do LS intra-articular (NELSON; COUTO, 1994).

Das 56 amostras colhidas, onze foram contaminadas com sangue que, segundo Van Pelt (1974) e Boon (1997), este fato é freqüente, devido à ruptura de capilares subsinoviais.

Van Pelt (1974) relatou também um aumento acentuado no número de leucócitos nas artrites infecciosas; o mesmo achado foi observado no decorrer do experimento nas articulações EU e FT inoculadas, em grau moderado no M2.

A concentração de proteína no LS normal varia de 2 a 2,5 g/dl (BIASE et al., 2001; LIPOWITZ, 1985; PERMAN, 1980). Valores aumentados foram detectados nas articulações EU e FT inoculadas no M2, sendo que na articulação FT o aumento foi significativo. Segundo Van Pelt (1974), ocorre um aumento acentuado nos casos de artrites infecciosas.

O pH do LS no grupo controle manteve-se alcalino, nas articulações EU e FT, no M1. Segundo os relatos de Biase et al. (2001) e Sawyer (1963), o pH do LS normal de cão varia de 7,0 a 7,8. Na articulação EU inoculada, houve pequena mudança para o pH ácido no M2, na articulação FT inoculada, houve alteração mais acentuada de alcalino para ácido, observada em sete animais no M2. Segundo Sawyer (1963) o pH pode-se apresentar abaixo dos valores normais nas artrites sépticas.

Foi verificada uma correlação entre a viscosidade do LS e o teste do coágulo de mucina também observada por Barnabé et al., (2005), que apresentaram qualidade inferior no M2 em ambas as articulações, como referido por Biase et al. (2001) e Fernandes et al.

(1983). Nos processos inflamatórios articulares, o LS frequentemente apresenta um péssimo coágulo de mucina; fato atribuído à influência exercida pela quantidade e qualidade do ácido hialurônico presentes na amostra (BARNABÉ et al., 2005; VAN PELT, 1967). Este mecanismo indica alterações na composição do líquido sinovial que, segundo Nelson e Couto (1994), resultará em coágulo de baixa qualidade, possivelmente decorrente da presença de microrganismos ou de enzimas liberadas pelas células inflamatórias presentes nas articulações.

Houve diferença entre os membros torácicos e pélvicos quanto às características observadas no LS nas articulações inoculadas, que foi não foi observado por Barnabè et al. 2005, no estudo do mesmo fluido da bainha tendínea de equinos sadios.

Em relação à análise citológica do LS no M1, houve predomínio de células mononucleares, principalmente as fagocitárias, e em menor número, os linfócitos. Segundo Luvizotto (2006), o LS apresenta uma reação inflamatória mononuclear em cães infectados naturalmente por *Leishmania sp.* Os valores para as células mononucleares superaram 90% em quase todos os casos, referidos Biase et al. (2001) como valores de normalidade a ocorrência de 94 a 100% de mononucleares. Segundo Hans (1984), células mononucleares constituem-se de linfócitos, monócitos, macrófagos e células da membrana sinovial e podem variar de 90 a 100%, tanto no líquido sinovial normal como nas artropatias. Neste estudo, percentual de neutrófilos do M1 (0 a 8%), situa-se nos limites para o LS normal onde os valores para polimorfonucleares são inferiores ou iguais a 10%. (BIASE et al., 2001; COLES, 1984; FISHER, 2003).

Em relação aos tipos celulares observados no M2, a alteração evidente foi a elevação do percentual de neutrófilos, que ocorreu em 59% dos cães cujos valores de polimorfonucleares superaram os 70% da celularidade observada, atingindo em alguns animais, mais de 90% das células nucleadas totais. Ocorreu uma inversão da celularidade, já que o predomínio de mononucleares foi substituído pelo de polimorfonucleares, especificamente neutrófilos. De fato, na maioria das artrites sépticas, há prevalência de neutrófilos segmentados (FISHER, 2003; NELSON; COUTO, 1994).

No que se refere à articulação EU, não ocorreram alterações significantes nos constituintes celulares do LS quando comparados os M1 e M2. Ou seja, permaneceu em quase todos os momentos, o predomínio de mononucleares. Por outro lado, foram

constatadas mudanças na celularidade das articulações FT, comparando-se M1 com M2, onde em 56% dos animais, a articulação FT inoculada apresentou inversão de celularidade no M2, com predomínio de neutrófilos sobre mononucleares, com valores que variaram de 55 a 86% o pode ser confirmado no trabalho de Mcconkey et al. (2002), que encontraram esta inversão no LS de um cão acometido pela Leishmaniose. Esses mesmos autores observaram *Leishmania sp.* no interior de células mononucleares e em neutrófilos, coincidindo com o que fora observado nesse estudo, onde as formas amastigotas de *Leishmania sp.* foram identificadas no LS de 64% dos animais no M2. Elas foram observadas no interior de células mononucleares pequenas ou grandes, e em poucos neutrófilos.

Em relação à análise citológica do LS para a pesquisa do parasito, a articulação FT superou a EU quanto ao numero de células parasitadas. Segundo Parry (1999), *Leishmania sp.* tem sido demonstrada no interior de macrófagos no liquido sinovial de um número pequeno de cães com leishmaniose visceral canina.

Embora tenha sido realizado o tratamento prévio de todos os cães deste experimento com doxiciclina, um animal apresentou mórula de *Ehrlichia sp.* no interior de macrófago, no M1 e, desta forma, foi excluído do experimento.

A diferença entre o encontro ou não do parasita nas articulações FT e EU, observada aos trinta dias pós-inoculação, talvez possa ser explicada pela migração do protozoário para tecidos circunvizinhos.

Em futuros trabalhos, é necessária uma avaliação histopatológica da cápsula articular, para que os dados obtidos neste estudo possam ser confrontados com os achados citológicos, a fim de se elucidarem as diferenças observadas entre as articulações FT e EU no tocante à celeridade e gravidade da artrite encontrada em cães com leishmaniose experimental.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, pôde-se concluir que:

- A inoculação de suspensão de promastigota (1×10^6) intrarticular não determinou alterações radiográficas articulares após 30 dias.
- A análise do líquido sinovial foi determinante na identificação de alteração inflamatória , pós-inoculação.
- A análise parasitológica revelou formas amastigotas de *Leishmania sp* em 64 % dos cães no 30° dia.
- A articulação fêmoro-tibial foi a mais adequada para a observação de alterações inflamatórias pela análise físico-química e, principalmente, pela citologia do líquido sinovial;
- Os achados clínicos de claudicação e dor foram mais intensos e ocorreram precocemente, demonstrando que o processo inflamatório ocorre com maior intensidade nos primeiros dias após a inoculação do parasita.

REFERÊNCIAS

AGUT, A.; CORSO, N.; MURCIANO, J.; LAREDO, F. G.; SOLER, M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v. 153, n 21, p. 648– 652, 2003.

ALENCAR, J. E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (calazar). In: --- **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991. p. 706-717.

ALTMAN, R.D.; GRAY, R.G. Laboratory findings in osteoarthritis. In: MOSKOWITZ, R.W.; HOWELL, D.S.; GOLDEBERG, V.M. et al. (Eds.). **Osteoarthritis: diagnosis and management**. Philadelphia: Saunders, 1984. p.185-197.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquérito epidemiológico: o caso da epidemia de Belo horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993 – 1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259 – 265. 2004.

BARNABÉ, P. A. **Estudo de características físico-químicas e citológicas do líquido sinovial da bainha tendínea de eqüinos**. 2001. 96f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Jaboticabal, 2001.

BARNABÉ, P. A.; CATTELAN, J. W; CADIOLI, F. A. Anatomofisiologia da bainha tendínea sinovial digital dos eqüinos. **Cienc. Rural**, v. 34, n.2, p. 619-623, 2004.

BARNABÉ, P. A; CATTELAN, J. W; CADIOLI, F. A. et al. Características físico-químicas e citológicas da bainha tendínea digital de eqüinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, n. 3, p. 288-294, 2005.

BEVILACQUA, L.; MAIA, C.A.A.; ZANETTI, M. F et al. Ocorrência de osteoartrite em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 2., **Anais.**, São Paulo, 2002. p. 10.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M. et al. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Zootec.**, v. 53, n. 1, p.1-8, 2001.

BIASE, F; RAHAL, S. C; LOPES, R. S. et al. Alterações no líquido sinovial do joelho de cães com osteoartrite induzida pelo modelo Pond e Nuki. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 53, n. 5, p. 563-567, 2001.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P. H. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Vet. J.**, v. 162, n. 2, p. 108–120, 2001.

BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. M. F.; ASSIS, C. B., et al. Composição do líquido sinovial de cães com ruptura do ligamento cruzado cranial. **Ciênc. Rural.** v. 29, n. 2, p.285-289, 1999.

BOON, G. D. Synovial fluid analysis: a guide for small-animal practitioners. **Vet. Med.**, v. 92, n. 5, p. 443-451, 1997.

BRINKER, W.O., PIERMATEI, D.L. FLO, GL. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais.** São Paulo: Manole, 1986. p. 463.

BURACCO, P.; ENFRAQUEÇA, O.; GUGLIELMINO, R. et al. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in dog. England. **Small Anim. Pract.**, v. 38, n.1, p. 29-30, 1997.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses; feridas bravas e Kalazar. **Ciênc. Cult.**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar)** normas técnicas. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. p. 86.

CERQUEIRA, E. J. L.; SHERLOCK, I.; GUSMÃO, A. et al. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi*, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, n. 6, p. 695-701, 2003.

COLES, E.H. Fluido sinovial. In: COLES, E.H. (Ed.). **Patologia clínica veterinária**, 3 ed. São Paulo; Manole, 1984, p. 352-357.

CORREIA, W. M.; CORREIA, C. N. M. **Enfermidade infecciosa dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1992. p. 718-720.

FEITOSA, M. M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados por *Leishmania*. In: **Anais...** Fórum sobre leishmaniose visceral canina 1. Jaboticabal, 2006.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no Município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Rev. Clín. Vet.**,v.5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERNANDES, R. D.; GRINDEM, C. B.; LIPOWITZ, A. J. et al. Synovial fluid analysis: preparation of smears for cytologic examination of canine synovial fluid. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 19, n. 5, p. 727-734, 1983.

FISHER, J. D. In: Sistema músculo esquelético. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 12, p 265 a 274.

FONSECA, V. L.; SANTUCCI, S. G. Leishmaniose visceral americana. Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos. **Guia de vigilância epidemiológica específica**, 2001. Cap.5, p. 1-2.

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

HANS, E. H. Citologia veterinária, fluido sinovial e outros. In --- **Patologia veterinária**, 3 Ed São Paulo: Manole, 1984. Cap. 14, p. 352 a 357.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F.A. et al. **Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis**. Braz J Med Biol Res, Apr 2003, vol.36, no.4, p.485-489. ISSN 0100-879X

LIPOWITZ, A J. Synovial fluid. In: NEWTON, C. D.; NUNAMARKER, D. M. (Ed.) **Textbook of small animal orthopaedics**. Philadelphia: Lippincott, 1985. p. 1015-1028.

LONGSTAFFE, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F. et al. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potencial human, health hazard. **J. Small Anim. Pract.**, v. 24, n. 1, p. 29-30, 1983.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALES, M. at al. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniosis. **Zentralbl. Veterinarmed. B.**, v. 43, n. 8, p. 469-474, 1996.

LOZIER, A. M.; MENARD, M. Arthrocentesis and synovial fluid analysis. In: BOJRAB, M.J; ELLISON, G.W.; SLOCUM, B.(Ed). **Current techniques in small animal surgery**. 4 th. Baltimore: Williams &Wilkins, 1998. Cap. 56, p.1057-1062.

LUVIZZOTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA 1. **Anais...** Jaboticabal, 2006.

MAHAFFEY, E.A. Synovial fluid. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D. (Eds). **Cytology and hematology of horse**. Goleta: American Veterinary, 1992. p. 153-161.

MAHAFFEY, E.A. Synovial Fluid. In COWELL,R.L **Cytology and hematology of horse**, 2 nd. St Louis: Mosby, 2002. Cap.10, p.163-170.

MCCONKEY, E. S.; LÓPEZ, A.; SHAW, D. et al. Leishmanial polyarthritis in a dog. **Can. Vet. J.**, v.43, n 8, p. 607-609, 2002.

McILWRAITH, C.W. Synovial fluid analysis in the diagnosis of equine joint disease. **Equine Pract.**, v.2, n.2, p.44-48, 1980.

McILWRAITH, C.W. Diseases of joints, tendons, ligaments, and related structures. In: STASHAK, T.S. (Ed.) **Adams' lameness in horses**. Philadelphia : Lea e Febiger, 1987. Cap.7, p.339-485.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Distúrbios das articulações. In: --- **Fundamentos de medicina interna de pequenos animais**. Guanabara Koogan; Rio de Janeiro, 1994. p. 604-610.

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

PARRY, B.W. Miscellaneous laboratory techniques. In: PRATT, P.W. (Ed.). **Laboratory procedures for veterinary technicians**. St. Louis: Mosby, 1996. Cap. 12, p.561-626.

PARRY, B.W. Synovial fluid. In: COWELL, R.L; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**, 2 nd, St. Louis, Mosby, 1999. p. 104-119.

PERMAN, V. Synovial fluid. In: KANEKO, J.J. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animal**. 3 rd. New York: Academic. Press., 1980. p.749-83.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Rev. Clín. Vet.**, v. 2, n. 11, p. 28, 1997.

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B.Saunders., 1990. p.450-8.

SAS Institute Inc. **SAS OnlineDoc®**, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SAWYER, D. C. Synovial fluid analysis of canine joints. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 143, n.6, p. 609-612, 1963.

TODHUNTER, R.J. Anatomy and physiology of synovial joints. In: McILWRAITH, C.W.; TROTTER, G.W. (Ed.). **Joint disease in the horse**. Philadelphia : Saunders, 1996. Cap.1, p.1-28.

VAN PELT, R. W. Properties of equine sinovial fluid finding in the hourse. **J.Am. Med. Assoc.**, v.141, p.1051-1061, 1962.

VAN PELT, R. W. Characteristics of normal equine tarsal sinovial fluid. **Can J. Comp. Med. Vet. Sci.**, v.31, n.12, p.342-347, 1967.

VAN PELT, R.W. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.165, n.1, p. 91-95, 1974.

WOLSCHRIJN, C. F.; MEYER, H. P.; WOLVEKAMP, W. T. Destructive polyarthristis in a dog with leishmaniasis, (England). **J. Small Anim. Pract.**, v. 37, n. 12, p. 601-603, 1996.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. th. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 930 p.

Instruções aos autores

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

- **Artigos científicos**

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, no qual somente a primeira letra de cada palavra deve ser maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, centralizado e em negrito. Digitá-los, separados por vírgulas, com chamadas de rodapé numeradas e em sobrescrito, que indicarão o cargo e o endereço profissional dos autores (inclusive endereço eletrônico), seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen, devem ser tradução fiel do resumo. Se for apresentado em inglês, deve conter também, resumos em português e espanhol; se for em espanhol, resumos em português e inglês.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words, e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a forma de tabelas, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a forma de figuras, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. Fotografias podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de desenhos originais, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade. Se o trabalho for apresentado na língua portuguesa ou espanhola, os enunciados das tabelas e figuras bem como das variáveis apresentadas deverão estar também escritos em inglês.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas da ABNT, e o arranjo deve ser em ordem alfabética por sobrenome do autor (modelos anexos).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para

fotografias, desenhos e mapas, em três vias (uma original e duas cópias) impressas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½” de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas duas cópias deve(m) ser omitido(s) o(s) nome(s) do(s) autor(es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser

Citações no texto Geral: é normalizada segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas.

–ABNT/NBR 10520: <http://biblioteca.inpa.gov.br/NBR10520.htm> ou
<http://www.creupi.br/biblioteca/normas.htm>

Estudo clínico-laboratorial das articulações de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral e experimentalmente inoculados com *leishmania chagasi* por via intra-articular

Clinical-laboratorial study of dog articulations naturally infected by visceral leishmaniasis and experimentally inoculated with *Leishmania chagasi* via intra-articular injection

Estudio Clínico-Laboratorial de las Articulaciones de canes naturalmente infectados con Leishmaniose visceral y experimentalmente inoculados con *Leishmania chagasi* por vía intra-articular

Agueda Aparecida Lima da Silva¹, Flávia de Rezende Eugênio², Maria Cecília Rui Luvizotto³, Silvia Helena Venturolli Perri⁴, Valéria Marçal Félix de Lima⁵, Fabio Luis Bonello⁶.

-
- 1- Médica Veterinária Mestranda na Disciplina de Clínica Cirúrgica pela Unesp Araçatuba/SP. Rua Amazonas nº571, <aguedavet@bol.com.br
 - 2- Professora Assistente Doutora, Curso de Medicina Veterinária, Unesp Araçatuba/SP. Rua Clovis Pestana nº793,<eugeniof@fmva.unesp.br
 - 3- Professora Assistente Doutora, Curso de Medicina Veterinária, Unesp Araçatuba/SP. Rua Clovis Pestana nº793, ruimcl@fmva.unesp.br
 - 4- Professora Assistente Doutora, Curso de Medicina Veterinária, Unesp Araçatuba/SP. Rua Clovis Pestana nº793, shvperri@fmva.unesp.br
 - 5- Professora Assistente Doutora, Curso de Medicina Veterinária, Unesp Araçatuba/SP. Rua Clovis Pestana nº793, vmflima@fmva.unesp.br
 - 6- Fabio Luis Bonello, Médico Veterinário Docente da Faculdade de Medicina Veterinária de Andradina/SP. Rua Amazonas nº571, <bonellofl@yahoo.com.br

RESUMO

Estudo clínico-laboratorial das articulações de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral e experimentalmente inoculados com *leishmania chagasi* por via intra-articular.

Este estudo teve por objetivo descrever a evolução das alterações locomotoras, citológicas e radiográficas, na tentativa de se elucidar o mecanismo pelo qual se desenvolve a artrite na leishmaniose experimental em cães. Formas pro-mastigotas de *L. chagasi* foram inoculadas nas articulações escápulo-umeral e fêmoro-tibial de 14 cães. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas diárias por 30 dias, bem como análises radiográfica, citológica e físico-química do líquido sinovial. As alterações clínicas mais encontradas foram: claudicação, dor, restrição de movimentos e aumento de temperatura local. No líquido sinovial, houve aumento gradativo de leucócitos, predominando mononucleares e, posteriormente, polimorfonucleares. Aumento de proteínas, diminuição do pH (de alcalino tendendo a ácido), bem como da viscosidade, e qualidade do coágulo ruim foram observados ao longo do estudo. Estatisticamente, a articulação fêmoro-tibial apresentou maiores alterações quando comparada à escápulo-umeral. Em 64% dos animais, observou-se a presença do parasita na articulação e não foram encontradas alterações radiográficas ósseas, no período estudado. O confronto dos valores físicos, químicos e achados citológicos do líquido sinovial, permitiu subsídio importante para afirmar que há ocorrência de artrite infecciosa, porém sem caráter proliferativo ou sequer degenerativo, no período estudado.

palavras chave: Cão, líquido sinovial, artrite, leishmaniose visceral.

ABSTRACT

Clinical-laboratorial study of dog articulations naturally infected by visceral leishmaniasis and experimentally inoculated with *Leishmania chagasi* via intra-articular injection.

The aim of this study was to describe the evolution of the locomotor and cytological articular alterations, trying to unveil the mechanism through which the arthritis develops in the experimental leishmaniasis in dogs. Pro-amastigotes forms of *L. chagasi* were inoculated in the humeral-scapular and the femoral-tibial articulations of 14 dogs. The animals were submitted to daily clinical evaluations for a thirty-day period, as well as

cytological and physiochemical analysis of the synovial fluid The most frequent clinical alterations were: limping articular volume increase, pain and local temperature increase. In the synovial fluid, there was a gradual increase of leukocytes, predominating mononuclear cells and, later, polymorphonuclear ones. Protein increase, decrease of the pH (from alkaline towards neutral), as well as viscosity, and coagulation test of bad quality were observed along the study. Statistically, the femoro-tibial articulation presented greater alterations when compared to the humeral-scapular one. In 64% of the animals, the parasite presence was observed in the articulation and no osseous radiographic alterations were found in the period of the study. The comparison of the physical and chemical values and the cytological findings in the synovial fluid supplied important information to state that there are occurrences of septic arthritis, in the initial phase, however without proliferative or degenerative characteristics, in the period of the study

Key words: Dog, synovial liquid, arthritis, visceral leishmaniasis

RESUMEN

Estudio Clínico-Laboratorial de las Articulaciones de canes naturalmente infectados con Leishmaniose visceral y experimentalmente inoculados con *Leishmania chagasi* por vía intra-articular.

Este estudio tuvo por objetivo describir la evolución de las alteraciones locomotoras y citológicas articulares, en el intento de elucidarse el mecanismo por el cual se desenvuelve la artritis en la leishmaniose experimental en canes. Formas pro-amastigotas de *L. chagasi* fueron inoculadas en las articulaciones escapulohumeral (EU) y fémur-tibial (FT) de catorce (14) canes. Los animales fueron sometidos a evaluaciones clínicas diarias por 30 días, bien como a análisis citológico y fisicoquímico del líquido sinovial. Las alteraciones clínicas encontradas fueron: claudicación, aumento del volumen articular, dolor y aumento de la temperatura local. En el líquido sinovial, hubo aumento gradual de leucocitos, predominantemente mononucleares y, posteriormente, polimorfonucleares. Aumento de proteínas, disminución del pH (de alcalino tendiendo a neutro), así como de la viscosidad, y test de coágulo de mala calidad fueron observados a lo largo del estudio. Estadísticamente, la articulación FT presentó mayores alteraciones cuando comparada a la EU. En 64% de los animales, se observó la presencia del parásito en la articulación y no fueron encontradas alteraciones radiográficas óseas en el período estudiado. La confrontación de los valores

físicos, químicos y hallazgos citológicos del líquido sinovial, permitió subsidio importante para afirmar que hay ocurrencia de artritis séptica, en su fase inicial, aunque sin carácter prolífico, ni siquiera degenerativo, en el período estudiado. Palabras llave: Can, líquido sinovial, artritis, leishmaniose visceral.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral é uma doença de caráter infeccioso, de evolução aguda ou crônica, sendo a *Leishmania chagasi* responsável pela enfermidade no Brasil. Em muitos animais verifica-se atrofia muscular, diminuição da atividade física associada a distúrbios de locomoção (FEITOSA et al., 2000; LONGSTAFFE et al., 1983).

A incidência de problemas locomotores pode chegar a 30%, sendo as queixas principais de claudicação e dor na parte distal dos membros (BURACCO et al., 1997; WOLSCHRIJN et al., 1996). Estes problemas podem advir de poliartrites, sinovites, polimiosite, osteoartrite, periostite proliferativa, lesões osteolíticas, úlceras interdigitais, lesões de coxim plantar e neuralgia (BEVILACQUA et al., 2002; FEITOSA et al., 2000; MCCONKEY et al., 2002).

Alguns autores relataram manifestações clínicas locomotoras em que os cães acometidos apresentavam variados graus de claudicação e aumento do volume articular sendo que, após exames radiográficos, as imagens eram compatíveis com osteoartrite erosiva e, às vezes, com destruição completa das articulações (AGUT et al., 2003; BEVILACQUA et al., 2002; BURACCO et al., 1997; WOLSCHRIJN et al., 1996).

Em 1997, Buracco et al., (1997), relataram o encontro de *Leishmania donovani* no líquido sinovial de um cão acometido por leishmaniose visceral. Mais recentemente, foi descrita a presença de *Leishmania chagasi* no líquido sinovial de cães com distúrbios locomotores no município de Araçatuba, São Paulo (BEVILACQUA et al., 2002).

As artrites podem estar associadas com o depósito de imunocomplexos ou a presença do parasita no interior das articulações. Neste caso, é possível a identificação de formas amastigotas de *Leishmania sp.* no líquido sinovial (AGUT et al., 2003; BEVILACQUA et al., 2002; BURACCO et al., 1997; FEITOSA et al., 2000).

Muito embora estes autores tenham se baseado em relatos de casos, não há estudos sobre a evolução das artrites no curso da leishmaniose visceral canina.

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo descrever a evolução clínica, radiográfica das articulações e análise do líquido sinovial em cães naturalmente infectados por *Leishmania sp* após a inoculação de *Leishmania chagasi* intra-articular.

MATERIAL E METODO

Foram utilizados 20 cães adultos, de raças variadas, machos e fêmeas, de um a quatro anos de idade, pesando entre 10 e 35 kg. Todos os animais, sorologicamente positivos para leishmaniose visceral pelos testes de Reação de Imunofluorescência Indireta, e ELISA, alojados em canil telado e usando coleira ¹Scalibur.

O critério de escolha constou de exame físico completo e radiográfico que definiram ausência de lesões articulares. O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em Experimentação Animal de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – Julio de Mesquita Araçatuba-SP, (protocolo nº 140/05).

Seis animais foram descartados no decorrer do experimento.

O período experimental constou de três momentos, a saber:

-Momento 0 (zero): os animais foram submetidos a exames radiográficos das articulações fêmoro-tibial (FT) e escapuloumeral (EU) direita e esquerda em duas projeções, médio-lateral e antero-posterior, totalizando oito projeções por animal, com objetivo de verificar, por método comparativo, imagens radiográficas compatíveis com: efusão articular, irregularidade nas superfícies articulares, esclerose óssea e osteófitos .

-Momento 1: Colheita de uma amostra do líquido sinovial 500 µl, com agulha 40x10 ou 40x12, em todos os animais, para realização dos exames laboratoriais. Após anti-sepsia sobre a pele foi realizada a artrocentese das articulações fêmoro-tibial e escapuloumeral, bilateralmente, em seguida, foram realizadas inoculações intra-articulares com 1×10^6 (CERQUEIRA et al.; 2003) de formas amastigotas de *Leishmania chagasi*² diluídas em 500 µl de solução salina nas articulações escapuloumeral esquerda e fêmoro-tibial direita. O parasita foi cultivado conforme descrito por Lima et al., 2003. Como controle nas articulações EU direita e FT esquerda, foi inoculado 500 µl de solução isotônica salina.

¹ deltrametrina -,laboratório Intervet

²Cepa MHOM/BR00/MERO 02 - FIOCRUZ-Bahia

A escolha dos membros tratados em diagonal foi proposital para diminuir uma possível exacerbação da claudicação.

Momento 2: trinta dias após M1, foram realizados exames radiográficos das quatro articulações em todos os animais, e colheita do líquido sinovial para realização de exame citopatológico e posterior eutanásia.

Um protocolo de avaliação foi elaborado contendo informações dos parâmetros avaliados diariamente, constando de: temperatura corporal (°C), temperatura local articular (diminuída, normal e aumentada), mensuração com a região dorsal da mão do examinador sobre a área; dor, aumento de volume articular, crepitação articular, restrição ou exacerbação de movimentos, assimetria, atrofia muscular, claudicação, impotência funcional.

A avaliação do LS foi realizada nos momentos M1 e M2, e constataram de:

Na inspeção em tubo de ensaio foram avaliados cor e aspecto. Utilizando-se fitas reagentes¹, foram avaliados: pH, proteínas, leucócitos (negativo, traços, baixo, moderado e alto), sangue (negativo, hemolisado e não hemolisado). E a densidade, por refratometria.

A determinação da viscosidade foi realizada no momento da transferência do LS da seringa de colheita para lâmina de vidro, estimando-se o comprimento, em centímetros, do filamento formado pela gota antes do seu desprendimento da extremidade da seringa. Considerou-se: ausente, quando não houve formação de filamento; diminuída: quando o comprimento do filamento foi inferior a 5 cm e normal: quando ultrapassou a 5 cm (BARNABÉ et al., 2005).

Foi realizado o teste de coágulo de mucina segundo Fisher, (2003) no M2, devido à colheita do LS ser superior a 1ml. O procedimento constou da adição de uma ou duas gotas de líquido sinovial em 8 gotas de ácido acético 2% ², pode ser graduado segundo Parry (1996) em: bom, regular, ruim ou péssimo.

¹ Combur 10 teste UX Roche Diagnostic GmbH e Uridiag Baydiag Ltda

² Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda

O exame da citologia realizado no M1 e M2 compreendeu a contagem diferencial e morfológica das células do líquido sinovial e a pesquisa direta das formas amastigotas do parasito.

Para a contagem das células nucleadas foram utilizadas um ou mais esfregaços do LS em cada momento, para todas as articulações, corado com corante panótico rápido¹, que constou da contagem de 100 células nucleadas em cada esfregaço, utilizando microscópio de luz com objetiva de imersão (100X). Utilizou-se um trajeto em forma de “zigue-zague” na lâmina, de uma extremidade lateral à outra, registrando-se as células nucleadas em seu trajeto.

As células nucleadas foram classificadas como neutrófilos, linfócitos, e mononucleares fagocitários e os resultados foram expressos em percentuais.

A análise estatística foi utilizada para as variáveis classificatórias de distribuição normal e foram consideradas significantes nos testes de Wilcoxon e McNemar quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos 14 animais avaliados foi identificado dor articular, claudicação, restrições de movimentos e atrofia muscular. Com referência à variável restrição de movimento, pode-se observar que esta ocorreu na articulação EU em 50% dos animais e em 71,4% na articulação FT.

Atrofia muscular do membro cuja articulação recebeu inoculo, persistiu durante todo o período experimental sendo que 71,4% dos animais apresentaram no membro torácico esquerdo e 78,6% no membro pélvico direito.

Todos os animais apresentaram claudicação e relutância em andar, observando-se uma diferença significativa ($p=0,0040$) entre as articulações EU e FT inoculadas, onde 37,5% apresentaram na articulação EU e 100,0% na articulação FT.

Restrições de movimento ocorrem em grande parte dos animais com infecção natural por *Leishmania sp.* (FEITOSA et al.; 2000; LONGSTAFFE et al.; 1983), e, neste trabalho, a relutância à marcha, claudicação e atrofia muscular foram observadas com maior

¹ Instant-Prov - Newprov produtos para laboratório

intensidade nos primeiros dias após a inoculação do agente nas articulações EU e FT.

A incidência de claudicação em cães com infecção natural compreende de 30% a 37,5% dos casos (BEVILACQUA et al.; 2002 FEITOSA et al.; 2000).

Os 14 animais apresentaram dor local, observada após a inoculação, bem como no decorrer do período experimental, sendo que 75,0%, apresentaram na articulação EU e 100,0% na articulação FP inoculadas. A dor é um sinal clínico local sempre presente nas artrites sépticas, segundo Nelson e Couto (1994). A articulação FT mostrou-se mais sensível e de grande importância no diagnóstico de enfermidades articulares apresentando sintomas precocemente.

Em relação à temperatura local, houve um aumento inicial que foi atribuído à inflamação pós-inoculação e mantendo-se dentro dos padrões de normalidade. As articulações controle não apresentaram alterações.

A temperatura corporal avaliada ao longo de trinta dias, oscilou entre 37°C a 40,7 °C.

Na análise radiográfica das articulações do M0 e M2, não foram identificadas quaisquer alterações articular e óssea, o que está de acordo com os relatos de Agut et al., (2003), Feitosa (2006) que identificaram *Leishmania sp* no LS de cães, na ausência de alterações radiográficas evidentes. Poliartrite erosiva e não erosiva são descritas em animais acometidos pela leishmaniose visceral segundo Agut et al., (2003); Buracco et al., (1997); Mcconckey et al., (2002); Wolschrijn et al., (1996). Cães portadores da doença apresentaram quadro de claudicação com evolução lenta de um a dois anos antes dos sinais radiográficos de osteoartrite estarem evidentes. (MCCONKEY et al., 2002; WOLSCHRIJN et al., 1996).

Alterações radiográficas das articulações envolvidas nas artrites sépticas, inicialmente, são inespecíficas e se limitam a espessamento da membrana sinovial e cápsula articular e, em infecções crônicas, é possível observar, radiologicamente, degeneração de cartilagem, formação de osteófitos, reação periosteal e lise óssea subcondral (NELSON; COUTO, 1994). Desta forma, para se detectarem alterações radiográficas ósseas em cães com leishmaniose, talvez seja necessário um período de observação superior ao proposto neste trabalho, que foi de trinta dias. Acreditamos ser necessários um período mínimo de seis meses para que ocorram alterações articulares na infecção natural.

No exame físico, o LS apresentou-se com aspecto amarelo palha, límpido e com ausência de partículas. Das 56 amostras colhidas, onze foram contaminadas com sangue, fato que, segundo Boom (1997) e Van Pelt (1974) e, é freqüente, devido à ruptura de capilares subsinoviais.

Segundo Lozier e Menard (1998) e Borges et al., (1999), o volume médio de LS na articulação fêmoro-patelar normal do cão é de 0,24 ml. Embora a média encontrada neste experimento, em M1, tenha sido de 0,4 ml e, portanto, maior do que a de cães saudáveis, este volume é ainda escasso para realização de toda análise proposta neste estudo. Porém, após 30 dias (M2), maior volume de LS foi detectado nas articulações inoculadas, sendo que na articulação FT o volume não excedeu a 1,5 ml, e na EU, 2 ml. Esta observação reforça a idéia de que, nas artrites sépticas, ocorre aumento significativo do LS intra-articular (NELSON; COUTO, 1994).

No líquido sinovial das articulações EU e FT controles, não foi identificada a presença de leucócitos no M1 em todos os animais. No M2, após a inoculação de solução fisiológica, foi detectada, através do método utilizado, a ocorrência de leucócitos em intensidade moderada em 57,1% e 71,4% respectivamente para EU e FT.

Para articulações EU e FT inoculadas, também não foram detectados leucócitos em M1. No M2, 30 dias após o inoculo de (1×10^6) formas promastigotas, foi verificado aumento moderado de leucócitos em 78,6% na EU e, em 85,7% na FT, respectivamente, apresentaram intensidade moderada, segundo Van Pelt (1974) há aumento acentuado no número de leucócitos nas artrites infecciosas.

A concentração de proteína no LS na articulação EU controle no M1 foi variável, não tendo sido detectada em 35,7% dos animais. Apresentou nível de normalidade em 7,1% e foi moderada em 57,2%. No M2, esteve normal em 35,7% e moderada em 64,3%.

Na articulação EU inoculada, em M1, a concentração de proteína não foi detectada em 28,6%, esteve normal em 14,3% e foi de intensidade moderada em 57,1%. No M2, a proteína apresentou-se com intensidade moderada em 92,9% e elevada em 7,1%.

Na articulação FT controle, no M1 a concentração de proteínas não foi detectada em 42,9% e moderada em 57,1%. Em M2, esteve moderada em 85,7% e elevada em 14,3%.

Na articulação FT inoculada, no M1 não foram detectadas proteínas em 35,7%, ocorrendo em concentração moderada em 64,3%. Em M2, 28,6% dos animais apresentaram nível moderado e elevado, em 71,4%. Houve diferença estatisticamente significativa nas articulações EU e FT inoculadas no M2, ($p < 0,0010$).

A concentração de proteína no LS normal varia de 2 a 2,5 g/dl (BIASE et al., 2001; LIPOWITZ, 1985; PERMAN, 1980). Valores aumentados foram detectados nas articulações EU e FT inoculadas no M2, sendo que na FT o aumento foi significativo. Segundo Van Pelt (1974), ocorre um aumento acentuado nos casos de artrite infecciosa.

O pH do LS no grupo controle manteve-se alcalino, nas articulações EU e FT, no M1. Segundo os relatos de Biase et al., (2001) e Sawyer (1963), o pH do LS normal de cão varia de 7,0 a 7,8. Na articulação EU inoculada, houve pequena mudança para o pH ácido no M2, na articulação FT inoculada, houve alteração mais acentuada de alcalino para ácido, observada em sete animais no M2. Segundo Sawyer (1963), o pH pode-se apresentar abaixo dos valores normais nas artrites sépticas.

Houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0266$) entre as articulações EU e FT inoculadas, em M2.

A viscosidade do LS da articulação EU controle apresentou-se 100% normal no M1, enquanto no M2, diminuída em 57,1% dos casos. Na articulação EU inoculada, esteve 100% normal no M1, e 100% diminuída no M2.

A articulação FT controle manteve um padrão idêntico à EU controle no M1 e diminuída em 42,9% dos casos no M2. Na articulação FT inoculada, em 71,4% dos animais a viscosidade esteve normal e diminuída em 28,6%, no M1. No M2, ausente em 35,7% e diminuída em 64,3%.

A formação de coágulo de mucina não foi avaliada no M1 devido à quantidade de LS ser insuficiente para o teste. No M2, ao se compararem os grupos controle e inoculado, observou-se diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos ($p = 0,0039$).

Houve também diferença ($p < 0,0010$) entre as articulações FT controle e inoculada, onde a articulação FT inoculada apresentou coágulo ruim e de péssima qualidade respondendo rapidamente à infecção, apresentando diferença significativa ($p = 0,0469$) quando comparada à articulação EU inoculada.

Houve diferença entre os membros torácicos e pélvicos quanto às características observadas no LS, fato que não foi observado por Barnabé et al (2005), no LS normal da bainha tendínea de eqüinos

Foi verificada correlação entre a viscosidade do LS e o teste do coágulo de mucina, o que coincide com os relatos de Barnabé et al., (2005), apresentando coeficientes de correlação de Spearman, a saber: articulações EU controle ($r_s = 0,603$; $p=0,0224$), FT controle ($r_s=0,835$; $p<0,0002$), FT tratado ($r_s=0,913$; $p<0,0001$), que apresentaram qualidade inferior no M2 em ambas as articulações. Nos processos inflamatórios articulares, o LS freqüentemente apresenta péssimo coágulo de mucina; fato atribuído à influência exercida pela quantidade e qualidade do ácido hialurônico presentes na amostra (BARNABÉ at al., 2005; VAN PELT, 1967). Este mecanismo indica alterações na composição do líquido sinovial que, segundo Nelson e Couto, (1994), resultará em coágulo de baixa qualidade, possivelmente decorrente da presença de microrganismos ou de enzimas liberadas pelas células inflamatórias presentes nas articulações.

A densidade do líquido sinovial obtida das articulações EU e FT variou de 1,010 a 1,030 nos grupos controle e inoculado nos M1 e M2.

Em relação à análise citológica do LS no M1, houve predomínio de células mononucleares, principalmente as fagocitárias, e em menor número, os linfócitos. Segundo Luvizotto (2006), o LS apresenta uma reação inflamatória mononuclear em cães infectados naturalmente por *Leishmania*. Os valores para as células mononucleares superaram 90% em quase todos os casos, referidos Biase et al., (2001) como valores de normalidade a ocorrência de 94 a 100% de mononucleares. Segundo Hans (1984), células mononucleares constituem-se de linfócitos, monócitos, macrófagos e células da membrana sinovial e podem variar de 90 a 100%, tanto no líquido sinovial normal como nas artropatias. O percentual de neutrófilos do M1 de 0 a 8%, situa-se nos limites para o LS normal onde os valores para polimorfonucleares são inferiores ou iguais a 10%. (BIASE at al., 2001; COLES, 1984; FISHER, 2003).

Em relação aos tipos celulares observados no M2, a alteração evidente foi a elevação do percentual de neutrófilos, que ocorreu em 59% dos cães cujos valores de polimorfonucleares superaram os 70% de celularidade, atingindo em alguns animais, mais de 90% das células nucleadas totais. Ocorreu uma inversão da celularidade, já que o

predomínio de mononucleares foi substituído pelo de polimorfonucleares, especificamente neutrófilos. De fato, na maioria das artrites sépticas, há prevalência de neutrófilos segmentados (FISHER, 2003; NELSON; COUTO, 1994).

No que se refere à articulação EU, não ocorreram alterações significativas nos constituintes celulares do LS quando comparados os M1 e M2. Ou seja, o predomínio de mononucleares permaneceu em quase todos os momentos. Por outro lado, foram constatadas mudanças na celularidade das articulações FT, comparando-se M1 com M2, onde em 56% dos animais, a articulação FT inoculada apresentou inversão de celularidade no M2, com predomínio de neutrófilos sobre mononucleares, com valores que variaram de 55 a 86% o que pode ser confirmado no trabalho de Mcconkey et al., (2002), que encontraram esta inversão no LS de um cão acometido pela Leishmaniose. Estes mesmos autores observaram *Leishmania sp.* no interior de células mononucleares e em neutrófilos, coincidindo com este trabalho, onde as formas amastigotas deste parasita foram identificadas no LS de 64% dos animais no M2, sendo observadas no interior de células mononucleares pequenas ou grandes, e em poucos neutrófilos.

Em relação à análise citológica do LS para a pesquisa do parasita, a articulação FT superou a EU quanto ao número de células parasitadas. Segundo Parry (1999), *Leishmania sp.* tem sido demonstrada no interior de macrófagos no líquido sinovial de um pequeno número de cães com leishmaniose visceral.

A diferença observada entre o encontro ou não do parasita nas articulações FT e EU, observada aos trinta dias pós-inoculação, talvez possa ser explicada pela migração do protozoário para tecidos circunvizinhos.

Em futuros trabalhos, é necessária uma avaliação histopatológica da cápsula articular, para que os dados obtidos neste estudo possam ser confrontados com os achados citológicos, a fim de se elucidarem as diferenças observadas entre as articulações FT e EU no tocante à celeridade e gravidade da artrite encontrada.

REFERÊNCIAS

AGUT, A.; CORSO, N.; MURCIANO, J.; LAREDO, F. G.; SOLER, M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v. 153, n 21, p. 648– 652, 2003.

BARNABÉ, P. A.; CATTELAN, J. W.; CADIOLI, F. A. et al. Características físico-químicas e citológicas da bainha tendínea digital de eqüinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, n. 3, p. 288-294, 2005.

BEVILACQUA, L.; MAIA, C.A.A.; ZANETTI, M. F et al. Ocorrência de osteoartrite em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 2., **Anais.**, São Paulo, 2002. p. 10.

BIASE, F; RAHAL, S. C; LOPES, R. S. et al. Alterações no líquido sinovial do joelho de cães com osteoartrite induzida pelo modelo Pond e Nuki. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 53, n. 5, p. 563-567, 2001.

BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. M. F.; ASSIS, C. B., et al. Composição do líquido sinovial de cães com ruptura do ligamento cruzado cranial. **Ciênc. Rural.** v. 29, n. 2, p.285-289, 1999.

BOON, G. D. Synovial fluid analysis: a guide for small-animal practitioners. **Vet. Med.**, v. 92, n. 5, p. 443-451, 1997.

BURACCO, P.; ENFRAQUEÇA, O.; GUGLIELMINO, R. et al. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in dog. England. **Small Anim. Pract.**, v. 38, n.1, p. 29-30, 1997.

CERQUEIRA, E. J. L.; SHERLOCK, I.; GUSMÃO, A. et al. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi*, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, n. 6, p. 695-701, 2003.

COLES, E.H. Fluido sinovial. In: COLES, E.H. **Patologia clínica veterinária**, 3 ed. São Paulo; Manole, 1984, p. 352-357.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no Município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Rev. Clín. Vet.**,v.5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FISHER, J. D. In: Sistema músculo esquelético. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 12, p 265 a 274.

HANS, E. H. Citologia veterinária, fluido sinovial e outros. In --- **Patologia veterinária**, Editora Manole, 1984. 3 Ed., Cap. 14, p. 352 a 357.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F.A. et al. **Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis**. Braz J Med Biol Res, Apr 2003, vol.36, no.4, p.485-489. ISSN 0100-879X

LIPOWITZ, A J. Synovial fluid. In: NEWTON, C. D.; NUNAMARKER, D. M. (Ed.) **Textbook of small animal orthopaedics**. Philadelphia: Lippincott, 1985. p. 1015-1028.

LONGSTAFFE, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F. et al. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potencial human, health hazard. **J. Small Anim. Pract.**, v. 24, n. 1, p. 29-30, 1983.

LOZIER, A. M.; MENARD, M. Arthrocentesis and sinovial fluid analysis. In: BOJRAB, M.J; ELLISON, G.W.; SLOCUM, B.(Ed). **Current techniques in small animal surgery**. 4 ed. Baltimore: Williams &Wilkins, 1998. Cap. 56, p.1057-1062.

LUVIZZOTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA 1. **Anais** Jaboticabal, 2006.

MCCONKEY, E. S.; LÓPEZ, A.; SHAW, D. et al. Leishmanial polyarthritis in a dog. **Can. Vet. J.**, v.43, n 8, p. 607-609, 2002.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Distúrbios das articulações. In: --- **Fundamentos de medicina interna de pequenos animais**. Guanabara Koogan; Rio de Janeiro, 1994. p. 604-610.

PARRY, B.W. Miscellaneous laboratory techniques. In: PRATT, P.W. (Ed.). **Laboratory procedures for veterinary technicians**. St. Louis: Mosby, 1996. Cap. 12, p.561-626.

PARRY, B.W. Synovial fluid. In: COWELL, R.L; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H. **Diagnostic cytology and ematology of the dog and cat**, 2 nd, St. Louis, Mosby, 1999. p. 104-119.

PERMAN, V. Synovial fluid. In --- KANEKO, J.J. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animal**. 3 nd. New York: Academic. Press., 1980. p.749-83.

SAS Institute Inc. **SAS OnlineDoc®**, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SAWYER, D. C. Synovial fluid analysis of canine joints. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 143, n.6, p. 609-612, 1963.

VAN PELT, R. W. Characteristics of normal equine tarsal sinovial fluid. **Can J. Comp. Med. Vet. Sci.**, v.31, n.12, p.342-347, 1967.

VAN PELT, R.W. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.165, n.1, p. 91-95, 1974.

WOLSCHRIJN, C. F.; MEYER, H. P.; WOLVEKAMP, W. T. Destructive polyarthristis in a dog with leishmaniasis, (England). **J. Small Anim. Pract.**, v. 37, n. 12, p. 601-603, 1996.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. th. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 930 p.

Observações gerais

- 1 _____
- 2 _____
- 3 _____
- 4 _____
- 5 _____
- 6 _____
- 7 _____
- 8 _____
- 9 _____
- 10 _____
- 11 _____
- 12 _____
- 13 _____
- 14 _____
- 15 _____
- 16 _____
- 17 _____
- 18 _____
- 19 _____
- 20 _____
- 21 _____
- 22 _____
- 23 _____
- 24 _____
- 25 _____
- 26 _____
- 27 _____
- 28 _____
- 29 _____
- 30 _____

DATA INÍCIO:

Exame fita EU		Controle	Fita FP		Controle
LEU			LEU		
NIT			NIT		
URO			URO		
PRO			PRO		
PH			PH		
SAN			SAN		
DEN			DEN		
CET			CET		
BIL			BIL		
GLI			GLI		
T. M.			T. M.		

DATA FINAL:

Exame fita EU		Controle	Fita FP		Controle
LEU			LEU		
NIT			NIT		
URO			URO		
PRO			PRO		
PH			PH		
SAN			SAN		
DEN			DEN		
CET			CET		
BIL			BIL		
GLI			GLI		
T. M.			T. M.		

Anexo B – Meio de cultura de manutenção de *leishmania chagasi*.

RPMI – 1640 (Sigma, USA)

10,39 g/l RPMI

2 g/l Bicarbonato de sódio

2,38 g/l Hepes

0,02 g/l Acido fólico

0,01 g/l Hemina

870 ml H₂O MilliQ

20 ml Urina

10ml Antibióticos (100 mg/ml Streptomina, 100 UI/ml Penicilina).

10% Soro bovino fetal

pH 7,2

Filtrar em membrana de 0,2

Estocar a 4° C.

Anexo C

Tabela . Temperatura local observada na pele local da região de inoculação nas articulações escapuloumeral (EU) e fêmoro-tibial (FT) nos 14 cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* e experimentalmente inoculados intra-articular por *Leishmania chagasi* (Araçatuba – SP, 2006)

Dia	Temperatura local	Articulação EU		Articulação FT		P ⁽¹⁾
		n	%	n	%	
7	Normal	11	78,6	10	71,4	0,8125
	Aumentada	3	21,4	4	28,6	
15	Normal	14	100,0	13	92,9	—
	Aumentada	0	0,0	1	7,1	
	Diminuída	1	7,1	0	0,0	
21	Normal	13	92,9	13	92,9	0,5000
	Aumentada	0	0,0	1	7,1	
30	Diminuída	2	14,3	2	14,3	—
	Normal	12	85,7	12	85,7	

⁽¹⁾ teste de Wilcoxon

Anexo D

Tabela Valores de densidade do líquido sinovial (média e desvio-padrão) obtidos das articulações escapuloumeral (EU) e fêmoro-tibial (FT), inoculada e controle, em diferentes momentos (M1 e M2) nos 14 cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* e experimentalmente inoculados intra-articular por *Leishmania chagasi* (Araçatuba – SP, 2006).

Articulação	Grupo	M1	M2
EU	Controle	1012,5 ± 7,3 aB	1016,1 ± 6,8 aA
	Inoculado	1014,3 ± 5,5 aB	1018,2 ± 8,0 aA
FP	Controle	1015,4 ± 6,0 aB	1019,3 ± 7,3 bA
	Inoculado	1015,0 ± 5,5 aB	1024,6 ± 7,5 aA

Para cada membro, médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).