

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

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA MUSCULATURA
ESTRIADA ESQUELÉTICA EM CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Ana Amélia Domingues Gomes

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2009

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

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA MUSCULATURA
ESTRIADA ESQUELÉTICA EM CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Ana Amélia Domingues Gomes

Orientadora: Profa. Dra. Mary Marcondes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2009

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA AMÉLIA DOMINGUES GOMES – Nascida na cidade de São Paulo - SP, em 21 de janeiro de 1980, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *campus* de Araçatuba, em fevereiro de 2000, concluindo-o em dezembro de 2004. Nos anos de 2005 a 2007 fez Residência Médico-Veterinária em Clínica Médica, Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Pequenos Animais na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *campus* de Araçatuba, com ênfase em Clínica Médica de Pequenos Animais. Em março de 2007, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, *campus* de Jaboticabal.

Dedico este trabalho...

...aos meus pais, Antônio Wilson e Cecília,
pelo amor, carinho e por terem acreditado nos meus ideais,
me incentivado e guiado para que eu jamais desistisse.
Vocês são exemplos de persistência e honestidade.

... ao meu noivo Alexandre Redson,
pelo amor, cumplicidade e confiança.

Amo vocês !!!

Em especial,

À minha querida orientadora e amiga Profa. Dra. Mary Marcondes
pelo incentivo, confiança, carinho e amizade oferecida durante todos esses anos.

Por inúmeras vezes ter deixado de lado suas coisas para me ajudar e me guiar,

por acreditar nos meus sonhos, nos meus ideais, nas minhas “loucuras”,

por ser um exemplo profissional, de coragem, persistência e fé,

por estar ao meu lado nos momentos difíceis e de alegria,

Tenho certeza que nada acontece por acaso...

Você é muito especial na minha vida.

Não tenho palavras para te agradecer.

Muito obrigada !!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder a vida e a oportunidade de reparar meus erros.

À Pós-graduação do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV / UNESP, *campus* de Jaboticabal, pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Mestrado.

Ao Laboratório de Investigações Médicas – LIM-50, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade oferecida para a realização de grande parte deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo de pós-graduação, no período de 2007 a 2009.

À Profa. Dra. Silvia Helena Venturoli Perri pela ajuda essencial na elaboração da análise estatística.

À Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado, pelo auxílio nas análises imunoistoquímicas.

Ao Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes do Departamento de Clínica Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita

Filho”- UNESP - *Campus* Botucatu – SP e à Dra. Vera Lúcia de Camargo-Neves, pelas importantes considerações realizadas na Defesa.

Aos Prof. Dr. Antônio Aparecido Camacho e o Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV / UNESP, *campus* de Jaboticabal, pelas sugestões no Exame Geral de Qualificação, que muito contribuíram para melhorar a apresentação final deste projeto.

À Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurentti, pela orientação na realização da reação de imunoistoquímica, pelas inúmeras explicações, paciência e confiança nesses meses de convivência. Sua ajuda foi fundamental para a elaboração deste projeto e para meu aprendizado profissional.

À funcionária Thayse Yumie do Laboratório de Moléstias Infecciosas, LIM-50, pelo suporte técnico durante o processamento do material e à Sra. Lia Negrão pelo auxílio diário.

Aos novos companheiros e amigos Thayse, Bruna, Tadeu, Juliano, Laurinha, Malu, Felipe, Mussya e Sílvia, do Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50) pela excelente recepção, apoio, incentivo e risadas, durante o tempo que convivemos. Jamais esquecerei a ajuda de vocês e dos nossos “planejamentos profissionais”.

Aos colegas de Pós-graduação Gisela Cristina Ferraro e Mauro Henrique Bueno de Camargo, pelo material cedido para a realização deste projeto.

À colega de pós-graduação e amiga Ludmila da Silva Vicente Sobrinho, pela agradável convivência, pelos incansáveis ensinamentos, quase diários, de Estatística e pelo incentivo constante durante esta etapa.

Ao amigo e ex-companheiro de república Claudio Nazaretian Rossi, pelo convívio diário e por me ensinar e incentivar durante todo período de residência e mestrado. Lembro do seu apoio quanto à escolha do Programa de Pós Graduação e das infinitas correções da ficha clínica...

Ao querido amigo Rafael Felipe da Costa Vieira, pelo apoio profissional e pessoal, pelo carinho, amizade sincera e momentos de alegria durante esses anos.

À companheira de república Monally Aquino, pela amizade e companhia.

À querida amiga e irmã Thaís Rabelo dos Santos pela amizade sincera e companherismo desde a época da graduação. Sem seu apoio não teria chegado à essa conquista... Jamais poderia esquecer seus conselhos, paciência e devoção.

Aos meus irmãos André e Ana Cecília e às primas-irmãs Fabiana e Adriana pelo carinho, amor e amizade.

Aos meus tios Luíz e Regina pelo amor, conversas e apoio durante todos esses anos.

À minha querida avó Ivone, iluminada, que me ensinou o que é o amor, a bondade e a humildade. Sua presença é muito importante na minha vida...

Ao cão Pitty (*in memoriam*) e à “gata” Tutu pelos momentos de alegria, companheirismo e por me incentivarem quanto à escolha da profissão.

Aos cães que involuntariamente participaram desta e de tantas outras pesquisas.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE QUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
III. OBJETIVOS.....	13
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. Animais.....	14
2. Delineamento experimental.....	14
3. Eletromiografia.....	16
4. Biopsia muscular.....	16
5. Citologia aspirativa por agulha fina de linfonodos, baço e fígado.....	16
6. Histopatologia.....	17
7. Reação de imunistoquímica.....	17
7.1. Produção de soro hiperimune anti - <i>Leishmania</i> sp.....	18
7.2. Reação de imunoistoquímica para pesquisa de <i>Leishmania</i> sp., linfócitos T (CD3 +), macrófagos e IgG.....	18
8. Análise estatística.....	19
V. RESULTADOS.....	20
VI. DISCUSSÃO.....	31
VII. CONCLUSÕES.....	36
VIII. REFERÊNCIAS.....	37
IX. ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de <i>Leishmania</i> sp., linfócitos T (CD3+), macrófagos e IgG nos músculos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio, de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral sem (n=32) e com (n=60) evidências eletromiográficas de polimiopatia. Número e percentagem de músculos com resultados positivos e negativos, escore da quantidade de células observadas e estatística calculada. (Jaboticabal-SP, 2009).....	27

ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Principais sinais clínicos observados em 23 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. (Jaboticabal – SP, 2009).....	20
Quadro 2. Interpretação dos resultados obtidos nas avaliações eletromiográficas e histopatológicas dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de 23 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, quanto à ocorrência de polimiopatia e cronicidade das lesões. (Jaboticabal – SP, 2009).....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fotomicrografias de fragmentos de baço de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral usado como controle positivo (A) e controle negativo (B) da reação de imunistoquímica para linfócitos T. LSAB, obj. 40x. (Jaboticabal-SP, 2009).....	24
Figura 2. Fotomicrografias de fragmentos de linfonodo de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral usado como controle positivo (A) e controle negativo (B) da reação de imunistoquímica para <i>Leishmania</i> sp. LSAB, obj. 40x. (Jaboticabal-SP, 2009).....	24
Figura 3. Fotomicrografias de fragmentos de linfonodo de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral usado como controle positivo (A) e controle negativo (B) da reação de imunistoquímica para macrófagos. LSAB, obj. 40x. (Jaboticabal-SP, 2009).....	25
Figura 4. Fotomicrografias de fragmentos de linfonodo de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral usado como controle positivo (A) e controle negativo (B) da reação de imunistoquímica para IgG. LSAB, obj. 40x. (Jaboticabal-SP, 2009).....	25

Figura 5.	Fotomicrografias de fragmentos do músculo tríceps braquial de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral submetido à técnica de imunistoquímica para detecção de <i>Leishmania</i> sp.. (A) LSAB, obj. 40x; (B) LSAB, obj. 100x. (Jaboticabal-SP, 2009).....	28
Figura 6.	Fotomicrografia de fragmento do músculo gastrocnêmio de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral submetido à técnica de imunistoquímica para detecção de linfócitos T (CD3+). LSAB, obj. 40x. (Jaboticabal-SP, 2009).....	28
Figura 7.	Fotomicrografia de fragmento do músculo tríceps braquial de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, submetido à técnica de imunistoquímica para detecção de macrófagos. LSAB, obj. 40x (Jaboticabal-SP, 2009).....	29
Figura 8.	Fotomicrografia de fragmento do músculo extensor carpo radial de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, submetido à técnica de imunistoquímica para detecção de IgG. LSAB, obj. 40x (Jaboticabal-SP, 2009).....	30

AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA MUSCULATURA ESTRIADA ESQUELÉTICA EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – A leishmaniose visceral pode ser incluída como uma das causas de miopatia inflamatória em cães, entretanto, pouco se sabe sobre a patogênese da doença no sistema muscular, sendo incriminada muitas vezes apenas à natureza catabólica da enfermidade. O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de imunistoquímica, a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp, linfócitos T (CD3+), macrófagos e IgG nos músculos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de 23 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. Dentre os 92 músculos avaliados, 11 (12%) apresentaram marcação antigênica para formas amastigotas de *Leishmania* sp, 35 (38,1%) para linfócitos T (CD3+), 29 (31,5%) para macrófagos e 14 (12%) para IgG. Os resultados obtidos permitiram concluir que em cães com leishmaniose visceral apresentam imunomarcção para formas amastigotas de *Leishmania* sp., linfócitos T CD3+, macrófagos e IgG, sugerindo a participação direta do parasito e de uma resposta imune celular e humoral na fisiopatogenia da lesão muscular.

Palavras-Chave: imunoperoxidase, *Leishmania* sp., miopatia, resposta imune celular, resposta imune humoral.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY EVALUATION OF SKELETAL MUSCULATURE IN DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY – Visceral leishmaniasis may be included as a cause of inflammatory myopathy in dogs, however, little is known about the pathogenesis of the disease in the muscular system, which is frequently associated with the catabolic nature of the illness. The purpose of this study was investigate, through immunohistochemistry, the presence of amastigote forms of *Leishmania* sp, T lymphocytes (CD3+), macrophages and IgG in the muscle triceps brachial, extensor carpi radialis, biceps femoris and gastrocnemius of 23 dogs with visceral leishmaniasis. Among 92 evaluated muscles, 11 (12%) presented antigenic marking for amastigote forms of *Leishmania* sp., 35 (38,1%) for T lymphocytes (CD3+), 29 (31,5%) for macrophages and 14 (12%) for IgG. The results of the present experiment led to the conclusion that in dogs with visceral leishmaniasis there may be a straight participation of the parasite and of cellular and humoral immune response in the etiopatogeny of the muscular injury.

Keywords: immunoperoxidase, *Leishmania* sp., myopathy, cellular immune response, humoral immune response.

I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma zoonose que atinge populações dos cinco continentes, sendo conhecida, na América Latina, como Leishmaniose Visceral Americana ou Calazar Neotropical. De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS) a leishmaniose é uma das seis endemias mundiais que afetam cerca de dois milhões de pessoas a cada ano. Estima-se que a prevalência das diferentes formas clínicas da enfermidade no mundo ultrapassa 12 milhões de casos, e que cerca de 360 milhões de pessoas vivem em área de risco.

O Brasil é responsável por 90% dos casos de leishmaniose visceral humana no continente americano, sendo que, dos 27 estados brasileiros, 20 já notificaram a doença. O primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina no estado de São Paulo foi diagnosticado em maio de 1998, em Araçatuba. A partir de então, o número de animais acometidos pela doença na região vem aumentando consideravelmente, difundindo-se para outras regiões do Estado, inclusive com casos autóctones identificados na Região metropolitana de São Paulo desde o ano de 2005.

As manifestações clínicas da doença variam de acordo com a patogenicidade do parasita, que difere entre as espécies, e com as respostas imunológicas celulares do hospedeiro. Apesar da leishmaniose visceral ser incluída como uma das causas de miopatia inflamatória em cães, pouco se sabe sobre a patogênese da doença no sistema muscular, sendo incriminada muitas vezes apenas à natureza catabólica da enfermidade.

Considerado que as alterações histopatológicas e imunoistoquímicas observadas na musculatura estriada esquelética de cães, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, não sejam decorrentes apenas de um processo catabólico da doença e que, a resposta imunológica contra o parasita pode apresentar-se de forma compartimentalizada em diferentes tecidos, tem-se como objetivo avaliar por meio da

técnica de imunistoquímica, a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp., a resposta imune celular e humoral, em músculos de cães infectados, na tentativa de elucidar a fisiopatogenia da doença no tecido muscular.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose visceral é causada por um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). Os parasitas responsáveis pela enfermidade pertencem ao complexo *donovani*, compreendendo três espécies, que variam de acordo com a região geográfica, sendo a *Leishmania donovani* observada na Ásia e África; *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África e *Leishmania chagasi* nas Américas (LAVERAN & MESNIL, 1903; ROSS, 1903; NICOLE, 1908; CUNHA & CHAGAS, 1937; LAINSON & SHAW, 1987).

Alguns pesquisadores afirmam que semelhanças estruturais verificadas por meio de estudos moleculares indicam que a *L. chagasi* e a *L. infantum* são a mesma espécie, permitindo a denominação de *L. infantum/chagasi* para o agente etiológico desta enfermidade no continente americano (MAURÍCIO et al., 1999; JERONIMO et al., 2005).

A primeira observação dos parasitas foi descrita na Índia em 1855 por Cunningham. Em 1903 o agente etiológico da leishmaniose foi identificado quase que simultaneamente por Willian Leishman e Charles Donovan (DONOVAN, 1903; MICHALICK & GENARO, 2007). No entanto, LAVERAN & MESNIL (1903) consideraram que o parasita associado ao Calazar indiano fosse um piroplasma, nomeando-o de *Piroplasma donovani*. Ross, nesse mesmo ano, criou o gênero *Leishmania*, denominando *Leishmania donovani* o agente etiológico da leishmaniose visceral (ROSS, 1903).

Nas Américas, a primodescrição da doença data de 1913, quando Migone, em Assunção (Paraguai), descreve o primeiro caso humano em autópsia de um indivíduo proveniente do município de Boa Esperança no Mato Grosso do Sul. Em 1934 Penna, examinando 47.000 lâminas de viscerotomias realizadas para o estudo da distribuição geográfica da febre amarela no Brasil, encontrou 41 casos positivos de leishmaniose

visceral americana (BRASIL, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007). Em 1936 Evandro Chagas realizou, por meio de punção esplênica, o primeiro diagnóstico *in vivo* da doença e também apontou a *Lutzomyia longipalpis* como provável vetor da leishmaniose visceral no Brasil (CUNHA & CHAGAS, 1937).

A leishmaniose visceral canina, do ponto de vista epidemiológico, é considerada mais importante que a doença humana pois, além de ser mais prevalente, apresenta um grande contingente de animais infectados, que mesmo assintomáticos servem como fonte de infecção para os vetores (DE ANDRADE et al., 2007; LARANGEIRA, 2009). Enquanto a prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas pode chegar a mais de 50%, a prevalência da doença varia entre três e 10% (FERRER, 2002).

A doença era, até recentemente, considerada como rural, típica de ambientes silvestres, mas hoje pode ser também contraída em zonas suburbanas e urbanas. Atualmente surtos e epidemias de leishmaniose visceral canina têm sido observados em grandes centros urbanos do Brasil, como Recife (PE), Natal (RN), Brasília (DF), Belo Horizonte (MG), Rio de Janeiro (RJ), Três Lagoas (MS), Bauru (SP) e Araçatuba (SP) (SILVA et al., 2001; FRANÇA-SILVA et al., 2003; SÃO PAULO, 2003; BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES, 2006; RIBEIRO, 2007).

A leishmaniose visceral canina foi registrada em 57 municípios do Estado de São Paulo, abrangendo todas as regiões em que o vetor foi detectado, exceto a Região Metropolitana de São Paulo, em que o mecanismo de transmissão ainda não foi elucidado. Verifica-se que a expansão ocorreu no sentido Oeste-Leste e, mais recentemente, no sentido Norte-Sul, na região Leste do Estado de São Paulo, a partir do Estado de Minas Gerais (CAMARGO NEVES, 2007).

O principal mecanismo de transmissão ocorre quando as fêmeas de flebotomíneos, infectadas com formas promastigotas, alimentam-se em hospedeiros susceptíveis. Durante o repasto sangüíneo estas formas são inoculadas na pele, gerando uma resposta inflamatória local, com subsequente fagocitose por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente os macrófagos. No interior dos

macrófagos as promastigotas perdem o flagelo diferenciando-se em amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias. As células densamente parasitadas rompem-se liberando estas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos. Ocorre, então, a disseminação hematogênica e linfática para tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. O ciclo continua quando fêmeas da *Lutzomyia* sp., ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* sp. Após cerca de 72 horas as formas amastigotas transformam-se em promastigotas no trato digestivo do inseto, sendo eliminadas pela saliva durante o repasto sanguíneo (FERRER, 2002; BANETH, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007).

Estudos em camundongos demonstraram que os macrófagos, as células dendríticas e as células de Langerhans infectadas por parasitas atuam como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T do tipo CD4+. Em resposta aos antígenos protéicos dos parasitas, os linfócitos T CD4+ auxiliares são estimulados a produzir interleucinas e, dependendo do perfil estimulado, diferenciam-se em sub-populações de células efectoras Ta1 ou Ta2 (NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000, MACHADO et al., 2007).

As células T auxiliares CD4 do tipo Ta1, ativadas pela IL-12, produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina 2 (IL-2) e o interferon gama (IFN- γ), que aumentam a eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos. O IFN- γ é um potente indutor da formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos, favorecendo o controle do parasitismo com a eliminação da infecção (PINELLI et al, 1994; FERRER, 2002; CIARAMELLA & CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006; MACHADO et al., 2007).

Inversamente, quando são ativadas as células Ta2 ocorre produção de citocinas antiinflamatórias, como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13). Estas levam à proliferação de linfócitos B e conseqüente produção de imunoglobulinas, principalmente a IgG, desencadeando a formação de

uma grande quantidade de imunocomplexos circulantes, os quais causam danos em vários órgãos (KONTOS & KOUTINAS, 1993; NOLI, 1999; CIARAMELLA & CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006).

A partir dessas considerações observa-se que a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção está associada à resposta Ta1, e a progressão da doença à resposta Ta2.

A indução preferencial de linfócitos Ta1 ou Ta2 depende de alguns fatores, como a dose infectante, o mecanismo de apresentação do antígeno, a via de inoculação e o padrão genético do hospedeiro (FERRER, 2002; CIARAMELLA & CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006; KRAMER et al., 2006).

Outras células também desempenham importante papel na infecção causada pela *Leishmania* sp. As células de Langerhans são essenciais na indução da resposta imune específica por serem responsáveis pelo transporte de parasitas aos linfonodos regionais, local onde esta resposta se inicia. Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) participam da fagocitose dos parasitas e, em conjunto com imunoglobulinas e sistema complemento, possuem ação leishmanicida (LAURENTI et al., 1996).

Os macrófagos, além de realizarem fagocitose, reparo e cicatrização tecidual, agem como células apresentadoras de antígenos no início da resposta imune e afetam o curso da doença secretando interleucina 1 (IL-1), 6 (IL-6), 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF), os quais aumentam a eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos (ROITT et al., 1993; ENGWERDA et al., 2004; BARBIÉRI, 2006).

PACIELLO et al. (2009) observaram que os miócitos de cães com leishmaniose visceral agem como células apresentadoras de antígenos, expressando moléculas de histocompatibilidade (MHC) do tipo I e II, além de secretam citocinas como IL6 e fator de necrose tumoral. Essas observações indicam a importância do mioblasto no controle direto do parasita, além de desencadear uma resposta inflamatória local. Alguns

autores sugerem que esta função ocorra apenas em miopatias de origem inflamatória (ENGLUND et al., 2001; WIENDL et al., 2005; PACIELLO et al., 2007).

Embora o fator de necrose tumoral tenha uma importante função no controle da *Leishmania* sp., estudos em humanos e camundongos infectados sugerem que esta citocina, em doses constantes, desencadeie sinais clínicos como febre prolongada, fraqueza, hiporexia e caquexia (BARRAL-NETO et al., 1991; KAYE et al., 2004). O fator de necrose tumoral causa proteólise e inibição da lipase lipoproteica no tecido muscular, levando à redução no diâmetro da miofibrila, além de alterar a função metabólica da célula, podendo induzi-la a apoptose (PEARSON et al., 1992).

Outras interleucinas, como a IL1 e IL6 também participam do processo catabólico observado em doenças crônicas como a leishmaniose visceral (HARRISON et al., 1986).

Em relação às manifestações clínicas, assim como os seres humanos, os cães com leishmaniose visceral podem apresentar sintomas inespecíficos, tais como febre irregular por longos períodos, perda progressiva de peso e caquexia em seu estágio final (GENARO, 1993; FEITOSA et al., 2000). Podem apresentar, ainda, alterações digestórias, renais, hepáticas, cardio-respiratórias, locomotoras, neurológicas e oculares (NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000; SCOTT et al., 2001; FERRER, 2002; ALVAR et al., 2004; BANETH, 2006; MARCONDES, 2007; SILVA et al., 2007; SONODA, 2007; BANETH et al., 2009; MARCONDES, 2009).

Problemas no sistema locomotor levam à claudicação, impotência funcional ou paresia, em decorrência de quadros de poliartrite, polimiosite e até osteomielite. Eventualmente ulcerações interdigitais e edema de membros também podem causar dificuldade locomotora (WOLSKCHRIJN et al., 1996; BURACCO et al., 1997; FEITOSA et al., 2000; MCCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; BANETH, 2006; SILVA et al., 2007; FERRARO, 2009). Muitos autores relatam que cães com leishmaniose visceral possuem mioatrofia, inicialmente nos músculos das fossas temporais, seguida,

sucessivamente, pelo resto da musculatura do corpo (KONTOS & KOUTINAS, 1993; KOUTINAS et al., 1999; FEITOSA, et al., 2000).

O método de diagnóstico de eleição para a leishmaniose visceral é o parasitológico, fundamentando-se na demonstração de formas amastigotas do parasita em esfregaços obtidos por meio de citologia aspirativa por agulha fina de linfonodos, medula óssea, baço e fígado e, menos freqüentemente, em esfregaços sangüíneos, nódulos cutâneos ou outros tecidos corados com corantes de rotina, tais como Giemsa, Wright e Panótico (FERRER, 1999; ALVAR et al., 2004; BRASIL, 2006; IKEDA-GARCIA & FEITOSA, 2006). Trata-se de um método simples, com especificidade de 100% e sensibilidade dependente do grau de parasitemia e do tipo de material biológico colhido.

As formas amastigotas são reconhecidas pela sua forma esférica a ovóide, medindo entre 2-5 μm e contendo um núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado (KONTOS & KOUTINAS, 1993; BRASIL, 2006).

Se os parasitas são numerosos a identificação não é difícil, contudo, em muitos casos, especialmente em animais assintomáticos ou em tecidos pouco parasitados, poucas formas amastigotas são observadas, tornando o diagnóstico incerto e muitas vezes inconclusível. Este problema pode ser solucionado com a utilização da técnica de imunoistoquímica, que é um meio de diagnóstico mais sensível (BOURDOISEAU et al., 1997; BEENA et al., 2003; TAFURI et al., 2004; MELO, 2005; MOREIRA et al., 2007; SONODA, 2007; GIUNCHETTI et al., 2009).

A imunoistoquímica combina técnicas anatomopatológicas, imunológicas e bioquímicas, localizando componentes tissulares pelo uso de anticorpos específicos e moléculas marcadas em cortes histológicos parafinados, congelados ou previamente mantidos em formol. Trata-se de um instrumento muito utilizado em pesquisas e na esfera diagnóstica (TAFURI et al., 2004; BARRA, 2006). Diversos tecidos têm sido avaliados por meio desta técnica na tentativa de minimizar resultados inconclusivos observados em outros métodos laboratoriais (FERRER et al., 1988; BOURDOISEAU et al., 1997; XAVIER et al., 2006; MOREIRA et al., 2007). De acordo com BOURDOISEAU

et al. (1997), TAFURI et al. (2004) e MELO (2005), estudos realizados para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em tecidos de cães infectados apresentam um aumento de até 50% de positividade quando da utilização da técnica de imunoistoquímica em comparação à histopatologia com Hematoxilina-Eosina (HE).

MOREIRA et al. (2007), pesquisando a presença do parasita em tecidos linfóides de cães com leishmaniose visceral, observaram que a imunoistoquímica apresentou resultados mais sensíveis e específicos que os métodos de ELISA, citologia aspirativa por agulha fina e histopatologia (HE), obtendo resultados que variaram entre 92,7% a 100% de sensibilidade, na dependência dos sinais clínicos encontrados.

A imunomarcção de linfócitos, imunoglobulinas e macrófagos também tem sido avaliada em alguns estudos realizados em cães portadores de leishmaniose visceral (VAMVAKIDIS et al., 2000; MARCONDES 2009; TORRES-NETO et al., 2009).

Os linfócitos expressam um grande número de imunomarcadores em suas membranas, os quais podem ser utilizados para distinguir várias subpopulações celulares. O sistema CD (*cluster of differentiation*) refere-se a grupos ou agrupamentos de anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a um determinado marcador celular (ROITT et al., 1993). O CD3+ é uma importante molécula do complexo receptor antigênico (TCR) presente na membrana de linfócitos T, que transmite sinais à célula quando o receptor TCR se conjuga com o antígeno (ROITT et al., 1993).

Enquanto as moléculas CD3+ encontram-se presentes em todas as subespécies de linfócitos T, o CD4+ pode ser observado em receptores de células T auxiliares, neutrófilos e macrófagos, e o CD8+ em receptores de linfócitos T citotóxicos (ROITT et al., 1993). Algumas moléculas, como o CD5+, encontram-se em receptores de membrana tanto de linfócitos T como em subespécies de linfócitos B (ROITT & DELVES, 2004), dificultando a classificação da célula.

O receptor de linfócitos B consiste de imunoglobulinas de superfície ligadas a moléculas, como o CD79+. No entanto, a expressão de superfície para receptores de

IgG ou do complemento também podem auxiliar na identificação destas células (ROITT & DELVES, 2004). Desta forma, a detecção de algumas moléculas em tecidos de animais infectados permite determinar se a resposta imunológica desenvolvida pelo cão é do tipo celular ou humoral (TORRES-NETO et al., 2009).

TORRES-NETO et al. (2009), avaliando lesões de pele de 30 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral por meio de imunomarcadores de moléculas CD3+ e CD79+, verificaram uma maior positividade de células CD3+ em 29 animais. Segundo os autores, os resultados demonstraram um predomínio de uma resposta imune celular sobre a humoral.

Em um estudo realizado por LARANGEIRA (2009) com 120 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, foram utilizados imunomarcadores anti-CD3+, anti-macrófagos e anti-*Leishmania* sp. em cortes histológicos de baço, linfonodos e pele. A autora verificou que 100% dos tecidos linfóides eram positivos para as três marcações. No entanto, a maior quantidade de células CD3+ estava associada a tecidos com menor carga parasitária, sugerindo a ocorrência de uma resposta imune celular adequada. Embora 90% dos animais apresentassem macrófagos na pele, somente 39% possuíam marcação para CD3+. Neste tecido observou-se associação direta entre o menor número de células CD3+ e uma maior carga parasitária, demonstrando que a resposta imune celular pode ser compartimentalizada na leishmaniose visceral canina. Diferente do que ocorreu com linfócitos T, não foi observada uma correlação entre o número de macrófagos e a carga parasitária tecidual.

MARCONDES (2009), avaliando por meio de imunoistoquímica o sistema nervoso central de 39 cães com leishmaniose visceral, não verificou marcação antigênica para formas amastigotas de *Leishmania* sp. Entretanto, em todos os cães foram observados CD3+ e macrófagos no sistema nervoso central, variando em intensidade de acordo com o fragmento de tecido analisado. A autora observou uma diferença estatisticamente significativa entre as imunomarcações de cães

assintomáticos e daqueles com quadro neurológico, sugerindo que os sintomas neurológicos associados à leishmaniose visceral, numa fase mais avançada da doença, são decorrentes de uma reação do sistema imune e não da presença do parasita no tecido nervoso.

Para o estudo de doenças neuromusculares se faz necessário, muitas vezes, além de uma avaliação clínica, a realização de estudos eletromiográficos e de biopsia muscular (TORRES & NORONHA, 2006).

Em pacientes com suspeita de doença muscular devem ser examinados, preferencialmente, os músculos proximais e distais dos membros (CARNEIRO-FILHO et al., 2001; CRUZ et al., 2001). Sempre que possível o exame eletromiográfico deve ficar restrito a um dos lados do corpo. Desta forma, os músculos contralaterais são preservados no caso de ser necessária a obtenção de biopsias. Para complementar a avaliação muscular, diversos autores ressaltam a importância do uso da histopatologia e da imunoistoquímica no diagnóstico e prognóstico de miopatias inflamatórias e degenerativas em cães (PANCIERA et al., 2001; MORITA et al., 2002; PUMAROLA et al., 2004).

Apesar de a leishmaniose visceral canina causar uma doença sistêmica crônica e de haver relatos de uma ampla variedade de sintomas e lesões envolvendo todos os sistemas orgânicos, o comprometimento muscular ainda é pobremente investigado (MACRI & GUARDA, 1987; FEITOSA et al., 2000; EUGÊNIO et al., 2002; BANETH, 2006). A patogenia da mioatrofia, que comumente afeta cães com leishmaniose visceral, é muitas vezes atribuída somente à natureza catabólica da doença (DEDET & BELLAZZOUNG, 1985; KONTOS & KOUTINAS, 1993). Contudo, alguns estudos afirmam que as alterações histopatológicas observadas no músculo de animais infectados, como degeneração e necrose, presença de infiltrado inflamatório mononuclear, tecido adiposo, fibrose e variação no tamanho da fibra muscular são decorrentes de uma resposta inflamatória à ação parasitária e não por um processo catabólico (VAMVAKIDIS et al., 2000; FERRARO et al., 2009; PACIELLO et al., 2009).

Existem, na literatura, alguns relatos de casos de miosite em animais portadores de leishmaniose, sendo esta enfermidade incluída como uma das causas de miopatias inflamatórias em carnívoros domésticos (BLOT & FUHRER, 1996; PODELL, 2002; PACIELLO et al., 2009). MACRI & GUARDA (1987) descreveram um caso de dermatomiosite em um cão com leishmaniose. KOUTINAS et al. (1999) em um estudo realizado com 158 cães portadores de leishmaniose visceral, encontraram 24,7% dos animais com atrofia muscular mastigatória, indicando que a enfermidade pode levar a um quadro de miosite em cães.

VAMVAKIDIS et al. (2000), realizando eletromiografia nos músculos mastigatórios e no músculo tibial cranial de 24 cães com leishmaniose visceral, verificaram a ocorrência de miopatia tanto em cães com, quanto sem atrofia muscular. Por meio de análise histopatológica, observaram quadros de atrofia muscular, com variáveis graus de necrose das fibras musculares, infiltrado inflamatório mononuclear e vasculite neutrofílica em 16 cães com presença de atrofia muscular e em seis animais sem evidências clínicas de mioatrofia. Dezesesseis (67%) dos 24 cães apresentavam formas amastigotas de *Leishmania* sp. na musculatura. Desta forma, sugeriram que as lesões musculares em casos de leishmaniose visceral são decorrentes tanto da presença do parasita como de uma resposta imunomediada. Os autores verificaram ainda, que a presença de anticorpos séricos anti-miócitos em diversas fibras musculares pode preceder as alterações microscópicas e eletrofisiológicas, já que em alguns animais sem alterações histopatológicas ou eletromiográficas eram identificados anticorpos anti-miofibrilas.

EUGÊNIO et al. (2002), avaliando um cão com miosite de músculos da face, proveniente de área endêmica para leishmaniose visceral, identificaram formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos músculos zigomático, bucinador e masseter.

FERRARO (2009) avaliou músculos dos membros torácicos e pélvicos de 25 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral por meio de eletromiografia e exame histopatológico. Os resultados eletromiográficos demonstraram que 76% dos

animais (19 cães) apresentavam um quadro de polimiosite. As avaliações histopatológicas, por sua vez, identificaram quadros de miosite em 24 animais (96%). As principais alterações observadas no tecido muscular esquelético foram: variados graus de degeneração e necrose de miofibras; presença de resposta inflamatória por células mononucleares; fibrose e presença de células adiposas no endomísio. Essas alterações excluem a possibilidade de atrofia muscular por emagrecimento e estado catabólico.

PACIELLO et al. (2009), ao avaliar músculos esqueléticos de 15 cães portadores de leishmaniose visceral com sinais de atrofia muscular e emagrecimento, detectaram marcações antigênicas para *Leishmania* sp., linfócitos T CD3+, linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD8+, sugerindo que as lesões musculares observadas por meio da histopatologia são causadas por uma resposta imunomediada local, desencadeada pela presença do parasita.

III. OBJETIVOS

Partindo-se da hipótese de que cães com leishmaniose visceral apresentam mioatrofias devido a um quadro de polimiosite e não exclusivamente pela natureza catabólica da enfermidade, é que se concebeu o presente estudo com o objetivo de pesquisar, por meio de imunistoquímica, a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp, linfócitos T (CD3+), macrófagos e IgG na musculatura estriada esquelética de cães, na tentativa de obter uma melhor compreensão da fisiopatogenia da doença no sistema muscular.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Para a realização do presente estudo foram inicialmente utilizados 65 cães adultos, machos ou fêmeas, sem raça definida, encaminhados para eutanásia ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba – SP. Esses animais eram domiciliados e provenientes de diversos bairros do município e foram recolhidos por apresentarem sorologia positiva para leishmaniose visceral, quando do inquérito epidemiológico. Todos os cães foram submetidos ao exame físico e à avaliação eletromiográfica, mesmo antes da confirmação do diagnóstico de leishmaniose visceral.

Dos 65 animais inicialmente investigados, somente 23 apresentaram formas amastigotas de *Leishmania* sp. em esfregaços de linfonodos, baço e/ou fígado por meio da citologia aspirativa por agulha fina (CAAF).

Baseando-se no resultado da eletromiografia de dois músculos do membro torácico e dois músculos do membro pélvico, os cães foram subdivididos em dois grupos. O primeiro, constituído por oito cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral sem evidências eletromiográficas de polimiopatia, e o segundo formado por 15 cães com alterações eletromiográficas indicativas de um quadro de polimiopatia.

2. Delineamento Experimental

Após o exame físico foi realizada a eletromiografia em dois músculos dos membros torácicos (tríceps braquial e extensor carpo radial) e dois músculos dos membros pélvicos (bíceps femoral e gastrocnêmio), com o objetivo de pesquisar a ocorrência de um quadro de miopatia. Para a realização do exame eletromiográfico os

membros foram escolhidos aleatoriamente, de modo que em alguns cães realizou-se a avaliação do membro torácico esquerdo e em outros do membro torácico direito, o mesmo ocorrendo com os membros pélvicos.

Os cães que revelaram alterações eletromiográficas em um único membro, em dois músculos do mesmo membro, ou que tiveram resultados dentro dos parâmetros de normalidade, formaram o grupo 1 (grupo sem polimiopatia). Os animais que apresentaram alterações eletromiográficas compatíveis com miopatia em pelo menos um músculo do membro torácico e um músculo do membro pélvico, configurando assim um quadro de polimiopatia, passaram a constituir o grupo 2 (grupo com polimiopatia).

Após a realização da eletromiografia os animais foram tranquilizados com Acepromazina¹ na dose de 0,055 mg/kg, por via intravenosa. Decorridos 15 minutos os cães foram anestesiados com Pentobarbital sódico² na dose de 15 mg/kg, por via intravenosa, e submetidos à eutanásia com uma ampola de 10mL de cloreto de potássio³, de acordo com o Decreto nº. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser submetidos à eutanásia. O método empregado seguiu as recomendações da Resolução nº. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Em seguida, realizou-se biópsias dos músculos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio, contralaterais aos avaliados na eletromiografia. Os fragmentos musculares foram fixados em formalina tamponada para posterior procedimento de rotina histopatológica e imunoistoquímica. Os exames eletromiográficos e histopatológicos fizeram parte de um estudo realizado por FERRARO (2009), cujas interpretações dos resultados encontram-se apresentados nos anexos A a Z e AA a ZZ, respectivamente.

¹ Acepran®0,2% - UNIVET – São Paulo, SP, Brasil

² Hypnol® 3% - Fontoveter – Itapira, SP, Brasil

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

3. Eletromiografia

Para a realização dos testes eletromiográficos foi utilizado um equipamento da marca VIASYS⁴ - modelo Viking Quest, de dois canais, portátil. Os sítios para aplicação dos eletrodos exploratórios foram mapeados por THOMSON & BOWEN (1971). Foram avaliadas, em cada músculo, a atividade elétrica insersional (AEI), a atividade elétrica de repouso (AER) e as atividades elétricas voluntárias (AEV) mínima e máxima.

4. Biopsia muscular

Após a colheita do fragmento muscular, este era levemente estirado e fixado a uma tira de madeira, para evitar contração e formação de artefatos, conforme sugerido por VALENTINE & MCGAVIN (2007). Os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% (pH 7,4), por 24 horas, armazenados em álcool 70° e processados pelas técnicas histotécnicas habituais para inclusão do tecido em parafina.

De cada fragmento muscular foram feitos três cortes transversais seriados, de três a cinco micrômetros de espessura, para a realização de técnicas histológicas coradas com hematoxilina-eosina (HE) e imunoistoquímica.

5. Citologia aspirativa por agulha fina de linfonodo, baço e fígado

Os exames citológicos dos linfonodos poplíteos ou pré-escapulares, do baço e do fígado, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp., foram realizados após a colheita do material por meio de citologia aspirativa por agulha fina, com uma agulha hipodérmica 25x7mm acoplada a uma seringa de 10mL. Os esfregaços dos materiais obtidos foram realizados imediatamente após a colheita, secos ao ar e corados com corante hematológico⁵, para posterior observação ao microscópio de luz, com objetiva de 100x, em imersão.

⁴ Nicolet Compass Meridian – Nicolet Biomedical Inc. – EUA

⁵ Panótico Rápido - Laborclin – Curitiba, PR

6. Histopatologia

Os cortes histológicos dos músculos foram corados com hematoxilina-eosina e avaliados quanto aos aspectos morfológicos genéricos, formas das fibras, presença de fibras degeneradas, infiltrado inflamatório, alterações estruturais e fibrose endomisial.

A avaliação histopatológica teve como finalidade confirmar a presença de lesões musculares bem como definir suas características, no sentido de fornecer informações quanto à cronicidade da lesão. As interpretações dos exames histopatológicos de cada músculo avaliado encontram-se nos anexos AA a ZZ.

7. Reação de Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi realizada no Laboratório de Moléstias Infeciosas (LIM-50) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP. As reações foram realizadas em cortes histológicos dos mesmos fragmentos musculares previamente coradas pela hematoxilina-eosina. O método empregado para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp., linfócitos T (CD3+), macrófagos e IgG foi o da Streptavidina-Biotina-Peroxidase ("Labelled Streptavidina-Biotina – LSAB).

As escolhas das diluições dos anticorpos basearam-se naquelas que apresentaram melhor definição das marcações antigênicas, com menor reação de fundo. Para os anticorpos anti-CD3+, anti-*Leishmania* sp. e anti-macrófagos, utilizaram-se as diluições 1:120; 1:1000 e 1:600, respectivamente, de acordo com LARANGEIRA (2009). Para o anticorpo anti-IgG foram testadas as diluições 1:50; 1:100; 1:200; 1:300; 1:400; 1:600; 1:1200; 1: 2400, 1: 4800 optando-se pela diluição 1:2400.

Em cada reação foi realizado um controle positivo e um negativo para as imunomarcações descritas, utilizando-se cortes de baço e linfonodos de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

7.1. Produção de soro hiperimune anti-*Leishmania* sp.

Camundongos BALB/c foram inoculados com 10^6 formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e, após 60 dias, colheu-se o sangue por via intracardíaca. As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm (180g), durante 10 minutos, na temperatura de 4°C e o soro obtido foi glicerinado na proporção de 1:1 e armazenado a -20°C.

7.2. Reação de Imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos T (CD3+), macrófagos e IgG.

Para o processamento da técnica de imunoistoquímica os cortes foram desparafinizados com xilol a frio, por aproximadamente 15 minutos. A hidratação foi realizada em banhos de álcool etílico absoluto, seguidos por banhos em alcoóis em concentrações decrescentes (100%, 92,8%, 70% e 30%) e água destilada. A recuperação antigênica foi feita em solução citrato 10 mM, pH 6,0, aquecido em banho-maria de 96 a 99°C, durante 30 minutos. Após o resfriamento (até 55°C) foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10 volumes, tendo sido realizadas oito trocas de cinco minutos cada. Em seguida fez-se o bloqueio de ligações inespecíficas, utilizando-se leite em pó desnatado⁶ diluído a 6% em solução tampão fosfato (PBS) 0,05% e água destilada, durante uma hora em estufa a 37°C.

Para a incubação utilizou-se, em cada um dos cortes histológicos, o anticorpo primário policlonal anti-*Leishmania* sp., produzido em camundongo, na diluição de 1:1000; o anticorpo policlonal anti-CD3+ humano⁷, produzido em coelhos, na diluição de 1:120; o anticorpo monoclonal anti-macrófago humano⁸, produzido em camundongos, na diluição de 1:600 e o anticorpo policlonal anti-IgG canino⁹, produzido em cabras, conjugado com peroxidase, na diluição de 1: 2400.

⁶ Molico®- Nestlé – São Paulo, Brasil

⁷ Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3 – A0452 - DakoCytomation CA, USA

⁸ Mouse Anti-Human Macrophages – MCA874G - AbD Serotec – Morphosys Co. – Munich, Germany

⁹ Goat anti-Dog IgG (h+l) HRP conjugated – A40-123P - Bethyl Laboratories Inc. – Montgomery, TX, USA.

Os anticorpos primários foram diluídos em solução de albumina bovina (BSA) a 1% e incubados a 4° C durante a noite. Após a incubação os cortes foram lavados três vezes, durante cinco minutos cada lavagem, com PBS-Tween 20 a 0,05% e novamente incubados em estufa (37°C) com anticorpo secundário biotinilado¹⁰, durante 60 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com solução de Streptoavidina-Peroxidase¹⁰, a 37°C, durante 45 minutos.

A reação final foi revelada com o substrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina¹¹, acrescida de um mililitro de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes e interrompida com água destilada após 5 minutos. A contra-coloração do tecido foi feita com Hematoxilina de Harris por dois a três minutos. Após a lavagem em água destilada, as lâminas foram desidratadas em ordem crescente de alcóois e xilol, e montadas com bálsamo da Canadá e lamínula. Os cortes foram observados em microscopia de luz convencional, utilizando-se as objetivas de 40X e 100 X.

As imunomarcações foram analisadas de forma semi-quantitativa e classificadas comparativamente de acordo com sua intensidade. A classificação foi definida em cruzes, da seguinte forma: (-) ausente; (+) raras; (++) leve, (+++) moderada e (++++) intensa. Para a realização da análise estatística as cruzes foram substituídas por números de zero a quatro.

8. Análise Estatística

A comparação entre os grupos para a pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos T (CD3+), macrófagos e IgG foi realizada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando-se o programa "Statistical Analysis System" (1999). As estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

¹⁰ Kit LSAB - K0690 - DakoCytomation CA, USA

¹¹ Liquid DAB + Substrate Chromogen System - K3468 - DakoCytomation CA, USA

V. RESULTADOS

Os principais sinais clínicos observados nos 23 cães acometidos por leishmaniose visceral encontram-se apresentados no Quadro 1. Apenas um cão (N21) possuía sinais sugestivos de alteração neuromuscular, caracterizados por paresia dos membros pélvicos.

Quadro 1. Principais sinais clínicos observados em 23 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. (Jaboticabal – SP, 2009).

Cão	Sinais Clínicos
N1	Emagrecimento, lesões cutâneas ulcerativas difusas, piopododermatite
N2	Caquexia, lesões cutâneas ulcerativas difusas
N3	-
N4	Emagrecimento, lesões cutâneas ulcerativas difusas, descamação cutânea, hiperqueratose em saliências ósseas
N5	Emagrecimento, lesões cutâneas ulcerativas difusas, descamação cutânea, hiperqueratose em saliências ósseas, onicogribose, secreção ocular mucopurulenta bilateral
N6	Emagrecimento
N7	Emagrecimento, lesões cutâneas ulcerativas difusas, intensa descamação cutânea, hiperqueratose em saliências ósseas
N8	-
N9	Emagrecimento, secreção ocular mucopurulenta bilateral
N10	Emagrecimento, secreção ocular mucopurulenta bilateral, dispnéia
N11	Emagrecimento, intensa descamação cutânea, hiperqueratose e ulceração em saliências ósseas
N12	Emagrecimento, lesões cutâneas ulcerativas difusas, pelame untuoso, descamação cutânea, hiperqueratose em saliências ósseas
N13	Caquexia, lesões cutâneas ulcerativas difusas, piopododermatite
N14	-
N15	-
N16	Caquexia, lesões cutâneas ulcerativas difusas, claudicação, úlceras em coxins
N17	-
N18	-
N19	-
N20	Emagrecimento, lesões cutâneas ulcerativas difusas, tosse produtiva
N21	Emagrecimento, paresia dos membros pélvicos
N22	Caquexia, pelame untuoso e descamação cutânea
N23	-

(-): nada digno de nota.

As interpretações dos resultados individuais das avaliações eletromiográficas dos cães, realizadas por FERRARO (2009), encontram-se dispostas de forma simplificada nos anexos A a Z. Optou-se por apresentar a interpretação dos resultados, e não as alterações eletromiográficas em si, uma vez que o objetivo deste estudo não foi avaliar resultados da técnica de eletrodiagnóstico, mas tão somente utilizar os resultados para subdividir os animais em dois grupos.

Dentre os 23 animais avaliados, somente em oito (34,8%) não se caracterizou um quadro de polimiopatia (Grupo 1). No entanto, destes, seis cães (N1 a N6) possuíam alterações eletromiográficas, apenas em um membro. Por outro lado, os animais N7 e N8 tiveram os resultados dos quatro músculos dentro dos parâmetros de normalidade. Quinze (65,2%) cães apresentaram resultados da eletromiografia compatíveis com um quadro de polimiopatia (Grupo 2).

Em alguns músculos foi possível verificar alterações sugestivas de processos inflamatórios e também de evolução crônica. Dos oito cães sem polimiopatia, somente um tinha quadro crônico (N 2), enquanto dos 15 animais com polimiopatia 14 tinham evolução crônica da doença.

Os resultados obtidos por FERRARO (2009) quando da avaliação histopatológica dos músculos por hematoxilina-eosina (HE) foram utilizados no sentido de melhor determinar a natureza das lesões. Todos os cães, exceto o N18, apresentaram lesões histopatológicas em pelo menos um músculo avaliado. Os resultados individuais resumidos da avaliação histopatológica por HE encontram-se apresentados nos anexos AA a ZZ.

Utilizou-se como parâmetro para determinar a cronicidade de uma lesão a presença de fibrose e infiltrado de tecido adiposo nas fibras musculares, conforme descrito por VALENTINE & MCGAVIN (2007).

Em relação à evolução do quadro, dos oito cães sem confirmação eletromiográfica de polimiopatia, quatro (50%) tinham lesões sugestivas de processo crônico em pelo

menos um músculo, enquanto 14 (93,3%) cães com polimiopatia apresentaram infiltrado de tecido adiposo e/ou presença de fibrose, sugerindo cronicidade do quadro.

Os resultados das análises histopatológicas identificaram três cães com quadro sugestivo de polimiopatia (com lesões em pelo menos um músculo de cada membro), caracterizados como grupo sem polimiopatia pela eletromiografia. São eles os animais N2, N5 e N6. No grupo 2 (cães com polimiopatia), em três cães (N11, N15 e N18) não se evidenciaram alterações histopatológicas que indicassem um quadro de polimiopatia (Quadro 2), como sugerido pelo exame eletromiográfico.

A avaliação histopatológica dos músculos permitiu confirmar que quase todos os animais com polimiopatia apresentaram lesões musculares de evolução crônica, enquanto o mesmo só ocorreu em parte dos cães sem polimiopatia.

As Figuras 1A, 2A, 3A e 4A evidenciam fotomicrografias de órgãos linfóides de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, utilizados como controle positivo da reação para *Leishmania* sp., linfócitos T, macrófagos e IgG, respectivamente. As Figuras 1B, 2B, 3B e 4B referem-se aos respectivos controles negativos das reações.

Dentre os 92 músculos estriados esqueléticos avaliados, em apenas 11 (12%) observou-se marcação antigênica para formas amastigotas de *Leishmania* sp, sendo que todos pertenciam ao grupo de animais com lesões crônicas e evidências eletromiográficas e histopatológicas de polimiopatias. As imunomarcações para *Leishmania* sp. foram verificadas principalmente em áreas com degeneração, necrose e/ou infiltrado inflamatório mononuclear, na região endomisial, variando quanto à intensidade. No que tange à distribuição, os parasitas foram observados de forma focal e multifocal no tecido muscular (Figura 5). Na região perimisial foram encontradas raras imunomarcações para *Leishmania* sp., ausentes na região perivascular.

Em todos os músculos parasitados foram encontrados linfócitos T (CD3+) e macrófagos. Os linfócitos T (CD3+) foram visualizados em 35 (38,1%) músculos avaliados, dos quais 27 pertenciam ao grupo de animais com sinais eletromiográficos

de polimiopatia (Figura 6). As células marcadas concentravam-se em áreas com infiltrado inflamatório mononuclear e/ou com presença de degeneração e necrose de miofibras, com distribuição focal e multifocal, na região endomisial. Embora os músculos parasitados possuíssem grande quantidade de linfócitos T CD3+, a presença dos últimos não estava ligada diretamente à imunomarcção parasitária.

Quadro 2. Interpretação dos resultados obtidos nas avaliações eletromiográficas e histopatológicas dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de 23 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, quanto à ocorrência de polimiopatia e cronicidade das lesões. (Jaboticabal – SP, 2009).

Cão	Eletromiografia		Histopatologia	
N1	Sem polimiopatia	----	Sem polimiopatia	---
N2	Sem polimiopatia	crônico	Polimiopatia	---
N3	Sem polimiopatia	----	Sem polimiopatia	crônico
N4	Sem polimiopatia	----	Sem polimiopatia	---
N5	Sem polimiopatia	---	Polimiopatia	crônico
N6	Sem polimiopatia	----	Polimiopatia	crônico
N7	Sem polimiopatia	ndn	Sem polimiopatia	---
N8	Sem polimiopatia	ndn	Sem polimiopatia	crônico
N9	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N10	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N11	Polimiopatia	crônico	Sem polimiopatia	crônico
N12	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N13	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N14	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N15	Polimiopatia	crônico	Sem polimiopatia	crônico
N16	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N17	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N18	Polimiopatia	---	Sem polimiopatia	ndn
N19	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N20	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N21	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N22	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico
N23	Polimiopatia	crônico	Polimiopatia	crônico

(----): animais com alterações eletromiográficas ou histopatológicas, sem definição de quadro agudo ou crônico; (ndn): ausência de alterações.

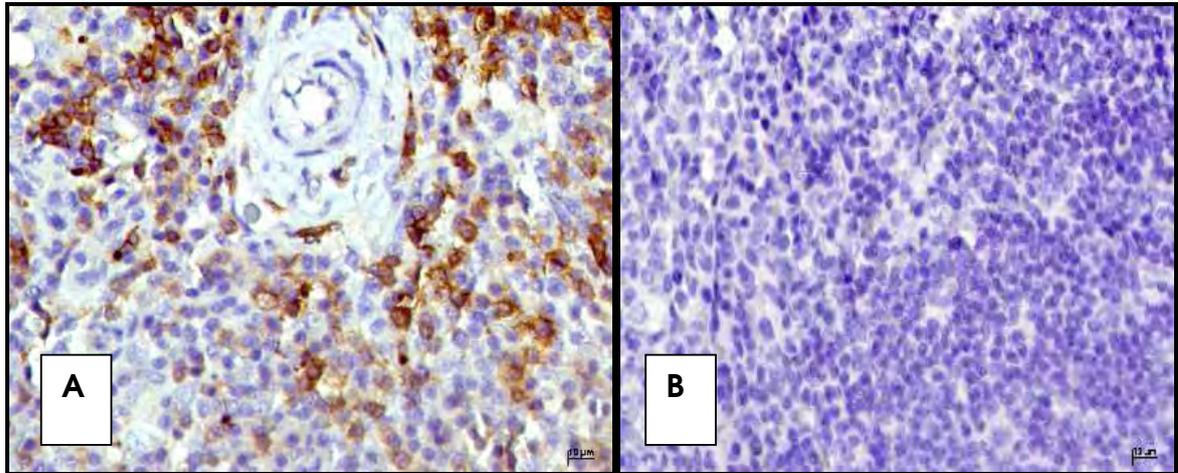


Figura 1. Fotomicrografias de fragmentos de baço de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral usado como controle positivo (A) e controle negativo (B) da reação de imunistoquímica para linfócitos T. LSAB, obj. 40x. (Jaboticabal-SP, 2009).

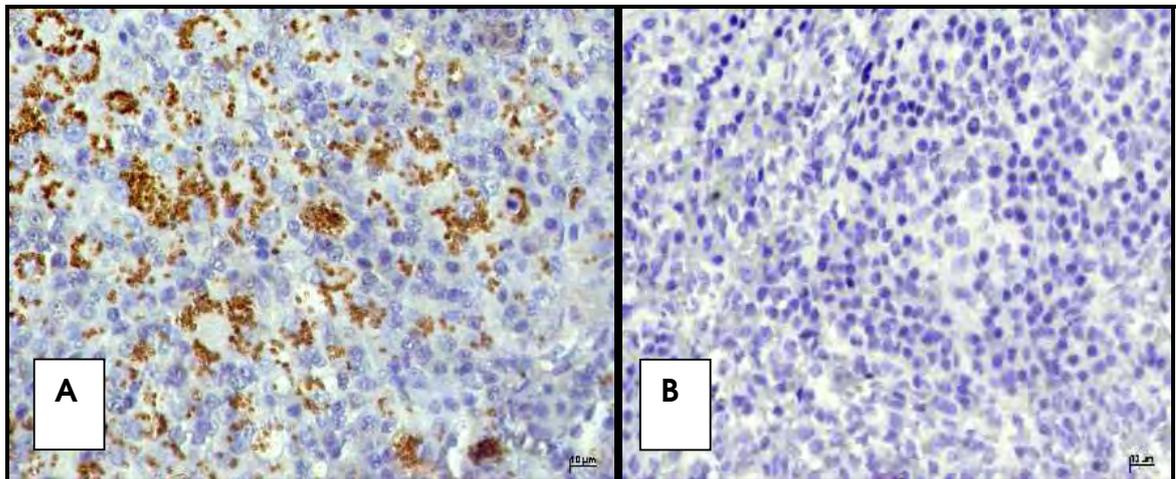


Figura 2. Fotomicrografias de fragmentos de linfonodo de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, usado como controle positivo (A) e controle negativo (B), da reação de imunistoquímica para *Leishmania* sp.. LSAB, obj. 40x. (Jaboticabal-SP, 2009).

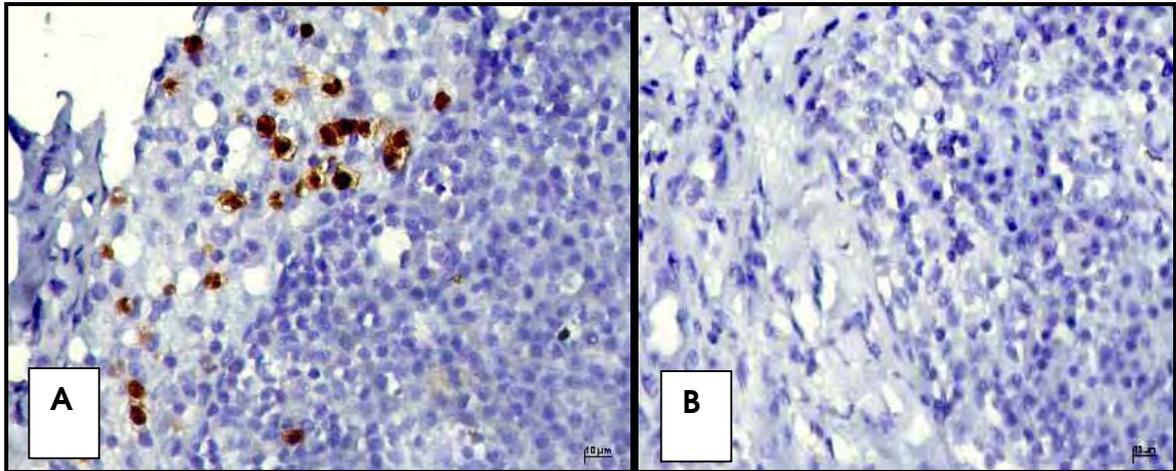


Figura 3. Fotomicrografias de fragmentos de linfonodo de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral usado como controle positivo (A) e controle negativo (B) da reação de imunohistoquímica para macrófagos. LSAB, obj. 40x. (Jaboticabal-SP, 2009).

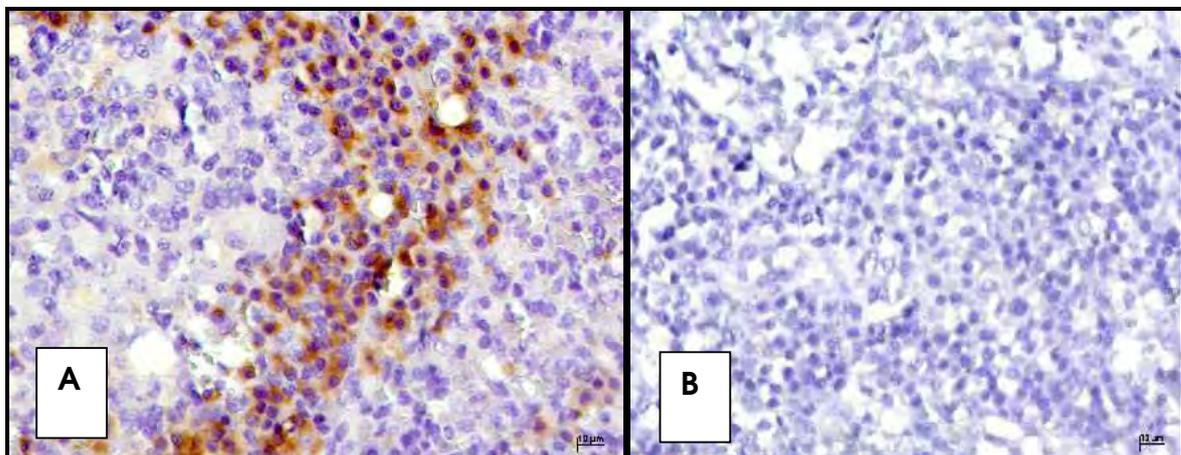


Figura 4. Fotomicrografias de fragmentos de linfonodo de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral usado como controle positivo (A) e controle negativo (B) da reação de imunohistoquímica para IgG. LSAB, obj. 40x. (Jaboticabal-SP, 2009).

A marcação antigênica para macrófagos foi identificada em 29 (31,5%) músculos avaliados (figura 7), dos quais 24 pertenciam ao grupo de animais com polimopatia. Os macrófagos encontravam-se na sua maioria dispersos na região endomisial, em áreas com infiltrado inflamatório e/ou degeneração e necrose; e em menor frequência no perimísio e região perivascular.

Dos 92 músculos avaliados somente 14 (12%) possuíam imunomarcação para IgG, sendo que 13 músculos pertenciam aos cães do grupo com evidências eletromiográficas de polimiopatia e com evolução crônica. As imunoglobulinas G apresentavam-se dispersas na região endomisial, sem uma área de predileção como observado nas outras imunomarcações (Figura 8). Não houve correlação entre as imunomarcações para as formas amastigotas do parasita e a imunoglobulina G.

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os músculos pertencentes ao grupo de cães sem e com polimiopatia no tocante às imunomarcações de *Leishmania* sp., macrófagos e IgG (Tabela 1).

Os resultados da reação de imunoistoquímica para presença de *Leishmania* sp., linfócitos T(CD3+), macrófagos e IgG nos fragmentos musculares, estão dispostos individualmente nos anexos AAA a ZZZ.

Tabela 1. Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos T (CD3+), macrófagos e IgG nos músculos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral sem (n=32) e com (n=60) evidências eletromiográficas de polimiopatia. Número e porcentagem de músculos com resultados positivos e negativos, escore da quantidade de células observadas e estatística calculada. (Jaboticabal-SP, 2009).

Variável	Escore	Sem Polimiopatia		Com Polimiopatia		Total		$p^{(1)}$
		n	%	n	%	n	%	
Leishmania sp.	-	32	100,0	49	81,7	81	88,0	0,0141*
	+	-	-	4	6,7	4	4,3	
	++	-	-	2	3,3	2	2,2	
	+++	-	-	3	5,0	3	3,3	
	++++	-	-	2	3,3	2	2,2	
Linfócitos T (CD3+)	-	24	75,0	33	55,0	57	61,9	0,0633 ns
	+	4	12,5	12	20,0	16	17,4	
	++	3	9,4	12	20,0	15	16,3	
	+++	1	3,1	1	1,7	2	2,2	
	++++	-	-	2	3,3	2	2,2	
Macrófagos	-	27	68,5	36	60,0	63	68,5	0,0098*
	+	4	15,2	10	16,7	14	15,2	
	++	1	13,0	11	18,3	12	13,0	
	+++	-	2,2	2	3,3	2	2,2	
	++++	-	-	1	1,7	1	1,1	
IgG	-	31	96,9	47	78,3	78	84,7	0,0264*
	+	1	3,1	10	16,7	11	12,0	
	++	-	-	3	5,0	3	3,3	

(-):ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso. (1) nível descritivo do teste Mann-Whitney. [*] significativo; [ns] não significativo.

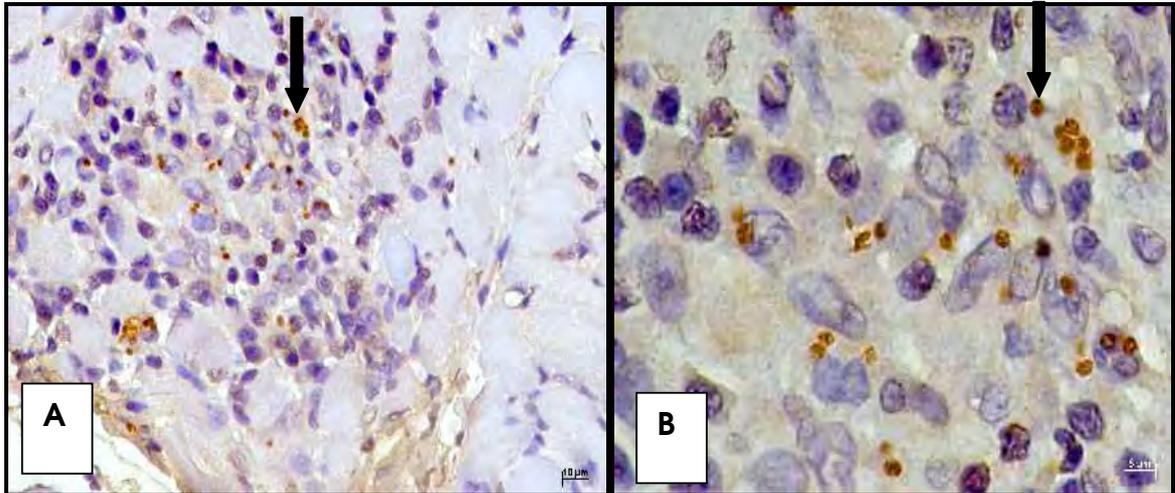


Figura 5. Fotomicrografias de fragmentos do músculo tríceps braquial de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, submetido à técnica de imunohistoquímica para detecção de *Leishmania* sp.. (A) LSAB, obj. 40x; (B) LSAB, obj. 100x. (Jaboticabal-SP, 2009).

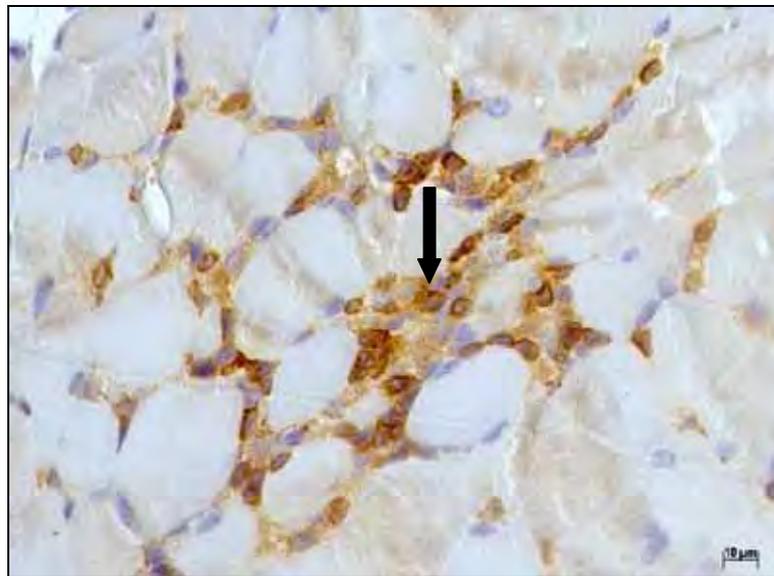


Figura 6. Fotomicrografia de fragmento do músculo gastrocnêmio de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, submetido à técnica de imunohistoquímica para detecção de linfócitos T (CD3+). LSAB, obj. 40x. (Jaboticabal-SP, 2009).

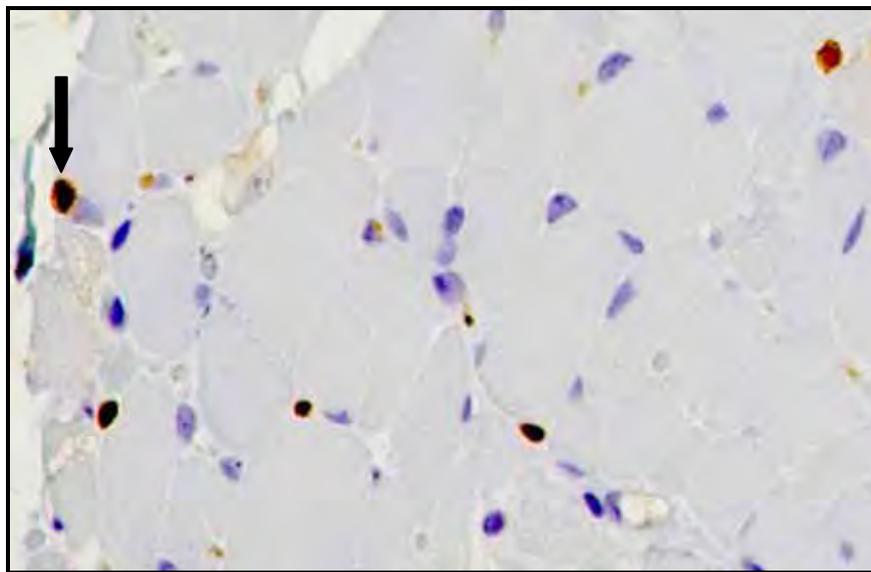


Figura 7. Fotomicrografia de fragmento do músculo tríceps braquial de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, submetido à técnica de imunohistoquímica para detecção de macrófagos. LSAB, obj. 40x (Jaboticabal-SP, 2009).

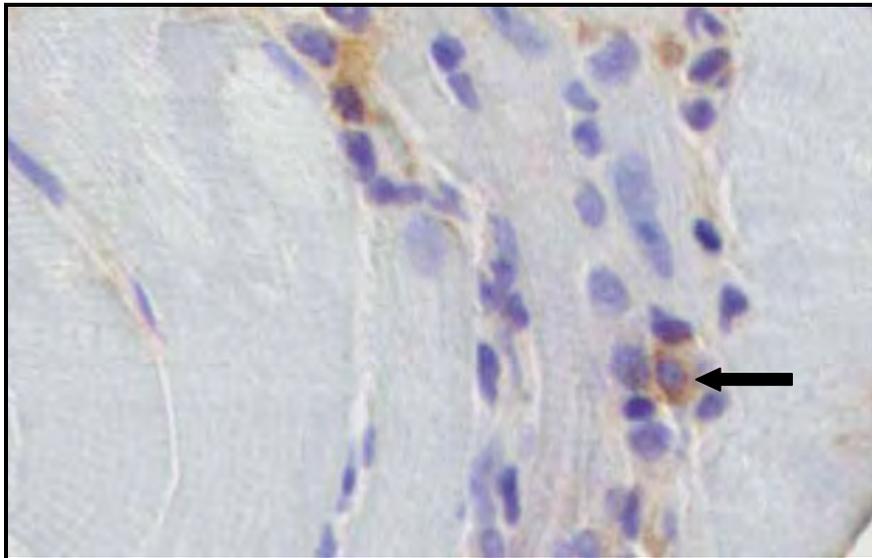


Figura 8. Fotomicrografia de fragmento do músculo extensor carpo radial de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, submetido à técnica de imunohistoquímica para detecção de IgG. LSAB, obj. 40x (Jaboticabal-SP, 2009).

VI. DISCUSSÃO

No presente estudo, dos 23 cães com leishmaniose visceral, 15 (65,2%) apresentavam quadro clínico da doença e oito (34,8%) eram assintomáticos (Quadro 1), semelhante à proporção descrita por NOLI (1999), de que 20 a 40% de uma população canina infectada não exibe sintomas. Dentre os animais sintomáticos, em nenhum foi observada atrofia muscular, diferente de KOUTINAS et al. (1999) e VAMVAKIDIS et al. (2000), que relataram a presença de mioatrofia em 24,7% e 66,67% dos animais portadores de leishmaniose visceral, respectivamente. Somente um animal (4,35%) possuía distúrbios locomotores decorrentes de um quadro de paresia de membros pélvicos (N 21), fato também relatado por MARCONDES (2009), quando descreveu quadros de paresia em cães portadores de leishmaniose visceral.

Alterações clínicas como emagrecimento e caquexia foram observados em 47,8% e 17,4% dos animais, respectivamente, semelhante ao descrito por CIAMARELLA et al. (1997), KOUTINAS et al. (1999), FEITOSA et al. (2000) e BANETH, 2006, sugerindo que esses animais encontravam-se em uma fase mais avançada da doença. Entretanto, por serem cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses, não se conhecia a história pregressa do animal, podendo o emagrecimento e a caquexia serem decorrentes de outros fatores, tais como a desnutrição ou co-infecções.

Os cães foram divididos em dois grupos, independente do quadro clínico apresentado e das alterações histopatológicas. A divisão baseou-se nos resultados da eletromiografia, por meio da qual foi possível identificar animais com alterações musculares restritas a um membro e cães com envolvimento muscular generalizado, configurando um quadro de polimiopatia. A escolha da eletromiografia baseou-se no fato de que em um mesmo músculo vários pontos são estimulados, enquanto na histopatologia avaliou-se apenas um fragmento muscular, conferindo maior confiabilidade aos resultados obtidos no primeiro exame, como salientado por TORRES & NORONHA (2006). Quando a avaliação eletromiográfica ou histopatológica

evidenciava alterações sugestivas de processo crônico, considerou-se que o quadro clínico do animal apresentava uma evolução mais prolongada.

Apesar dos cães não possuírem evidências clínicas de miopatia, as interpretações dos resultados eletromiográficos confirmaram que 15 cães tinham polimiopatia e, outros seis, lesões em músculos isolados. Apesar disso, somente um animal demonstrou alterações locomotoras, confirmando as observações de VAMVAKIDIS et al. (2000), de que a maior parte dos cães com leishmaniose visceral possui polimiopatia mesmo sem manifestações locomotoras.

Uma das causas de miopatia é a denervação do músculo, fato que foi excluído como fator desencadeante da lesão muscular nos cães do presente estudo, por meio dos resultados da eletroneuromiografia. Além da avaliação muscular, os nervos que inervam os respectivos músculos foram também testados em um estudo prévio (BUENO DE CAMARGO, 2009), e não se observou denervação em nenhum deles. No entanto, este exame permitiu identificar cronicidade das lesões em 14 (93,3%) cães com polimiopatia e em um (12,5%) animal com miopatia, semelhante ao verificado por VAMVAKIDIS et al. (2000), sugerindo que, com a evolução do quadro, as alterações apareçam em vários grupos musculares.

No presente estudo foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* sp. somente na musculatura de quatro cães (17,4%), divergindo dos relatos de PACIELLO et al. (2009) que identificaram parasitas por meio da imunoistoquímica na musculatura de 13 (86%) dos 15 animais avaliados. No entanto, os autores avaliaram somente cães que apresentavam quadro clínico evidente de fraqueza e atrofia muscular em decorrência da leishmaniose visceral. Semelhante ao que foi verificado neste estudo, as formas amastigotas do parasita foram visualizadas principalmente no interior de macrófagos do infiltrado inflamatório no endomísio, uma região que possui grande quantidade de capilares.

Diferente de GIUNCHETTI et al. (2009) e PACIELLO et al. (2009), não foi possível correlacionar a severidade do quadro clínico com a quantidade de marcação

antigênica para formas amastigotas. Uma possível explicação para o fato é que os primeiros autores verificaram a carga parasitária hepática, órgão de eleição para o encontro de leishmanias; enquanto os últimos avaliaram a musculatura somente de animais com sinais clínicos de comprometimento muscular.

A imunomarcação para CD3+ e macrófagos na musculatura dos cães com leishmaniose visceral confirma a participação da resposta celular na patogenia da miopatia. Entretanto, era de se esperar que os animais que possuíam grande quantidade de CD3+ e macrófagos não apresentassem mais o parasita no tecido muscular, como foi observado por MARCONDES (2009), quando da avaliação do sistema nervoso central de cães com leishmaniose visceral. Os resultados do presente estudo também se contrapõem às descrições de LARANGEIRA (2009), que verificou uma correlação inversa entre o número de CD3+ e a quantidade de formas amastigotas em tecidos linfóides e na pele de cães infectados por *Leishmania* sp..

Dos músculos que apresentavam marcação antigênica pra CD3+ e macrófagos, 91,42% (32/35) e 100% (29/29) possuíam evidências eletromiográficas ou histopatológicas de cronicidade da lesão, respectivamente. Desta forma, apesar da presença de CD3+ e macrófagos ter ocorrido entre 30 a 40% dos fragmentos musculares avaliados, sua identificação estava correlacionada sempre com uma evolução mais crônica da doença, semelhante ao verificado por MARCONDES (2009) no sistema nervoso de cães com leishmaniose visceral.

A marcação antigênica para macrófagos foi mais intensa nos fragmentos musculares com presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. e CD3+, provavelmente porque essas células são as mais parasitadas, agem como apresentadoras de antígenos para linfócitos T e, ainda, quando ativadas, auxiliam na eliminação do parasita, conforme descritos por ENGWERDA et al. (2004). Apesar da evidente participação da resposta imune celular por linfócitos T na etiopatogenia da lesão muscular em cães com leishmaniose visceral, sua ocorrência em 38,10% (35/92)

dos músculos e em 73,91% (17/23) dos cães estudados, indica que outros fatores certamente influenciam no desenvolvimento da lesão muscular.

A imunomarcção para IgG foi realizada na intenção de avaliar a participação da resposta humoral na patogenia da doença no sistema muscular. Dos 92 músculos esqueléticos avaliados, apenas 14 (12%) apresentaram marcação antigênica para IgG, diferindo dos achados de VAMVAKIDIS et al. (2000) que observaram imunorreatividade em todos os fragmentos musculares de 24 cães com leishmaniose visceral, tanto com, quanto sem atrofia muscular. Segundo os autores, animais infectados podem ter como causa da miopatia uma ação direta do parasita ou um mecanismo imunomediado. No segundo caso pode ocorrer a formação de anticorpos circulantes contra as leishmanias e as miofibras, com o depósito ou formação de imunocomplexos na musculatura esquelética. De modo geral, os anticorpos são direcionados contra as proteínas das miofibrilas, que não são normalmente expostas ao sistema imune.

Na presente pesquisa não foi possível correlacionar a presença de IgG com a identificação de formas amastigotas do parasita, uma vez que apenas quatro fragmentos musculares apresentaram as duas imunomarcções, enquanto em outros dez identificou-se IgG sem a presença de leishmanias. Estas observações sugerem que houve a formação de anticorpos tanto contra o parasita como contra as miofibrilas, confirmando os relatado de VAMVAKIDIS et al. (2000).

Cinco cães não apresentaram imunomarcções em nenhum fragmento muscular (N2, N4, N7, N11 e N18). Destes um não possuía nenhuma alteração histopatológica nos fragmentos musculares estudados (N18); um possuía degeneração de miofibras nos quatro músculos (N2) e outro (N7) em apenas dois músculos estudados; o animal N4 apresentava infiltrado inflamatório em um músculo e, finalmente o cão N11 possuía infiltrado de tecido adiposo também em único músculo. Esses resultados contradizem as observações de VAMVAKIDIS et al. (2000) e PACIELLO et al. (2009), os quais identificaram imunomarcções em todos os músculos de cães com leishmaniose visceral em que foram observadas alterações histopatológicas. Apesar do diagnóstico

de leishmaniose visceral ter sido confirmado parasitologicamente nos cinco animais, é possível que as lesões musculares identificadas nos mesmos sejam decorrentes de co-infecções, principalmente por se tratarem de cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses, diferentes dos autores supracitados que trabalharam com cães provenientes de canis e de clínicas.

No tocante à imunomarcção para *Leishmania* sp., macrófagos e IgG houve uma diferença entre cães com envolvimento muscular generalizado e animais com comprometimento de apenas um grupo muscular ou membro (Tabela 1). Os únicos animais em que foram encontradas formas amastigostas de *Leishmania* sp. pertenciam ao grupo de cães com quadro de polimiopatia identificada pela eletromiografia, sendo também os que apresentavam a maior quantidade de macrófagos e IgG, confirmando os achados de VAMVAKIDIS et al. (2000).

Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,0633$) no que diz respeito à presença de linfócitos T CD3+, os cães com polimiopatia apresentaram um número discretamente mais elevado destas células. Proporcionalmente a quantidade de linfócitos T CD3+ nos músculos foi muito maior que a de IgG, sugerindo a participação mais intensa de mecanismos de imunidade celular no combate ao parasita, fato também observado por TORRES-NETO et al. (2009) quando da avaliação da resposta imune celular e humoral em lesões de pele de cães com leishmaniose visceral.

VII. CONCLUSÕES

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

- Cães portadores de leishmaniose visceral sem evidências clínicas de comprometimento muscular podem apresentar alterações eletromiográficas e histopatológicas no músculo, causadas pelo parasito ou por uma resposta imunológica.
- A presença de marcação antigênica para formas amastigotas de *Leishmania* sp., linfócitos T (CD3+), macrófagos e IgG confirmam a participação do parasito e da resposta imune celular e humoral na fisiopatogenia da doença no tecido muscular, excluindo o processo catabólico como a única causa da miopatia;
- As imunomarcações para *Leishmania* sp. ocorreram apenas em fragmentos musculares de cães com lesões crônicas e evidências eletromiográficas e histopatológicas de polimiopatia;
- A marcação antigênica para macrófagos, linfócitos T (CD3+) e IgG foi mais relevante em músculos de cães com alterações eletromiográficas e histopatológicas de polimiopatia crônica.

VIII. REFERÊNCIAS

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

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

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

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v.24, n.7, p.324-330, 2009.

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

BARRA, M.B. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Revista da AMRIGS**, v.50, n.2, p.173-184, 2006.

BARRAL-NETTO, M.R.; BADARÓ, A.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; SANTOS, S.B.; BADARÓ, F.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; FALCOFF, E.; FALCOFF, R. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.163, p.853 - 857, 1991.

BEENA, K.R.; RAMESH, V.; MUKHERJEE, A. Identification of parasite antigen, correlation of parasite density and inflammation in skin lesions of post kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v.30, p.616-620, 2003.

BLOT, S.; FUHRER, L. Myopathies in domestic carnivores (Part 2). **The European Journal of Companion Animal**, v.6, n.1, p.56-69, 1996.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, n.4, p.439-440, 1997.

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

BUENO DE CAMARGO, M. H. **Avaliação eletrofisiológica e histopatológica do nervo periférico em cães naturalmente acometidos pela leishmaniose visceral**. 2009, 72f.Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

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

CAMARGO-NEVES , V. L. F. Classificação epidemiológica dos municípios para a Leishmaniose Visceral Americana. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n.39, p.1-12, 2007.

CARNEIRO-FILHO, A.; CARNEIRO, A.P.; VAZ, C.J.N.; CRUZ, M.W.; COELHO, R.; SCOLA R.H. **Projeto diretrizes AMB-CFM - Eletroneuromiografia e Potenciais Evocados**, 2001. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/045.pdf. Acesso em: 03 de novembro de 2009.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

CRUZ, M.W.; SCOLA R.H.; COELHO, R.L.A.; CARNEIRO-FILHO, A.; VAZ, C. **Projeto diretrizes AMB-CFM - Eletroneuromiografia na abordagem diagnóstica das Neuropatias Periféricas**, 2001. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/046.pdf. Acesso em: 28 outubro de 2009.

CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do Gênero *Leishmania* patogênica para o homem. **O Hospital**. v. XI, n.2, p.5-9, 1937.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista Saúde Pública**, v.40, n.3, p.537-541, 2006.

DE ANDRADE, R.A.; REIS, A.B.; GONTIJO, C.M.F.; BRAGA, L.B.; ROCHA, R.D.R.; ARAÚJO, M.S.S.; VIANNA, L.R.; MARTINS-FILHO, O.A. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.116, p.85-97, 2007.

DEDET, J.P.; BELLAZZOUNG, S. Leishmaniasis in North Africa. In: CHANG, K.; BRAY, R. **Leishmaniasis**, Amsterdam: Elsevier Science, 1985. p.353.

DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medicine Journal**, p.79, 1903.

ENGLUND, P.; LINDOOS, E.; NENNESMO, I.; KLARESKOG, L.; LUNDBERG, I.E. Skeletal muscle fibers express major histocompatibility complex class II antigens independently of inflammatory infiltrates in inflammatory myopathies. **American Journal of Parasitology**, v.159, n.4, p.1263-1272, 2001.

ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; KAYE, P.M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **TRENDS in Parasitology**, v.20, n.11, p.524-530, 2004.

EUGÊNIO, F.R.; SILVA, A.M.; ANDRADE, A.L.; MAIA, C.A.A.; BEVILACQUA, L.; ZANETTE, M.F.; CARVALHO, F.P.; LUVIZOTTO, M.C. **Miosite por *Leishmania sp* de músculos mastigatórios** - Relato de caso. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS - CONPAVEPA, 2., 2002, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Escritório Editorial, 2002. p.109-110.

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

FERRARO, G.C.F. **Avaliação eletrofisiológica e histopatológica do músculo estriado esquelético em cães naturalmente acometidos pela leishmaniose visceral**. 2009, 90f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

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

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, Sevilla, Spain. **Proceeding...** Salamanca: Intervet bv, 2002. p. 21.

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

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO COELHO, G.L.L; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.6, p.161-173, 2003.

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

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Histopatological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.84, p.269-277, 2009.

HARRISON, L.H.; NAIDU, T.G.; DREW, J.S.; DE ALENCAR, J.E.; PEARSON, R.D. Reciprocal relationship between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. **Reviews of Infectious Disease**, v.8, n.3, p.447-453, 1986.

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

JERONIMO, S.M.B.; SOUSA, A.Q.; PEARSON, R.D. Leishmaniose. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Tratado de Medicina Interna**, 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.2434.

KAYE, P.M.; SVENSSON, M; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C.R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 239-253, 2004.

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

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

KRAMER, L.; CALVI, L.E.; GRANDI, G. Immunity to *Leishmania infantum* in the dog: Resistance and disease. **Veterinary Research Communications**, v.30, suppl. 1, p.53-57, 2006.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICH, R. ed. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, p.1-121, 1987.

LARANGEIRA, D.F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor.** 2009. 79f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2009.

LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P.; SOTTO, M.N.; SINHORINI, I.L.; GOTO, H. The role of complement in the acute inflammation process in the skin and in the host-parasite interaction in hamster inoculated with *L. (L.) chagasi*. **International Journal of Experimental Pathology**, v.77, n.1, p.15-24, 1996.

LAVÉLAN, C.L.A.; MESNIL, F. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lou. Et mean) Parasite d'une fièvre d'Inde. **Comptes Rendus de l'Association des Anatomistes**, n.137, p.957-961, 1903.

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

MACRI, B.; GUARDA, F. A case of dermatomyositis due to leishmaniasis in a dog. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v.129, n.5, p.265, 1987.

MARCONDES, M. Leishmaniose uma zoonose. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 7; 2007, São Paulo, São Paulo, **Anais...** São Paulo, 2007, p. 211.

MARCONDES, M. **Envolvimento do sistema nervoso central na leishmaniose visceral canina.** 2009. 154f. Tese (Livre-docência). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista – Araçatuba, 2009.

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, n.3, p.237-246, 1999.

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

MELO, F.A. **Alterações da matriz celular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados**, 2005. 93f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2005.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2007.p.67-83.

MOREIRA, M.A.B; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.245, 2007.

MORITA, T.; SHIMADA, A.; YASHIRO, S.; TAKEUCHI, T.; HIKASA, Y.; OKAMOTO, Y.; MABUCHI, Y. Myofiber expression of class I major histocompatibility complex accompanied by CD8+ T-cell-associated myofiber injury in a case of canine polymyositis. **Veterinary Pathology**, v. 39, n.4, p.512-515, 2002.

NICOLE, C. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie. **Archives du Institute Pasteur de Tunisia**, v.3, p.1-26, 1908.

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

PACIELLO, O.; SHELTON, G.D.; PAPPARELLA, S. Expression of major histocompatibility complex class I and II antigens in canine masticatory muscle myositis. **Neuromuscular Disorders**, v.17, p.313-320, 2007.

PACIELLO, O.; OLIVA, G.; GRADONI, L.; MANNA, L.; FOGLIA MANZILLO, V.; WOJCIK, S.; TRAPANI, F.; PAPPARELLA, S. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. **Neuromuscular disorders**, 2009, In Press.

PANCIERA, R.J.; MATHEW, J.S.; CUMMINGS, C.A.; DUFFY, J.C.; EWING, S.A.; KOCAN, A.A. Comparison of tissue stages of *Hepatozoon americanum* in the dog using immunohistochemical and Routine histologic methods. **Veterinary Pathology**. v.38, p.422-426, 2001.

PEARSON, R.D.; COX, G.; JERONIMO, S.M.; CASTRACANE, J.; DREW, J.S.; EVANS, T.; DE ALENCAR, J.E. Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.47, p.8-15, 1992.

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

PODELL, M. Inflammatory myopathies. **The Veterinary Clinics of North América (Small Animal Practice)**, v.32, n.1, p.147-167, 2002.

PUMAROLA, M.; MOORE, P.F.; SHELTON, G.D. Canine inflammatory myopathy: analysis of cellular infiltrates. **Muscle & Nerve**, v.29, n.6, p.782, 2004.

RIBEIRO, C.R. **Aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais de cães sororreagentes para leishmaniose visceral, em foco de transmissão do Distrito Federal – DF – Brasil**. 2007. 93f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1993.

ROITT, I.M.; DELVES, P.J. **Fundamentos de Imunologia**, 10.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004, 490 p.

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

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Leishmaniose Visceral Americana: II Informe Técnico. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2003. 48p. Disponível em: www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_vis/LVA24ago03.pdf Acesso em 15 de setembro de 2009.

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

SCOTT, D.W.; WILLIAM, H.M.; GRIFFIN, G.E. Viral, rickettsial and protozoal skin disease. In:____. **Small animal dermatology**. 6.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.517.- 542.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.3, p.285-291, 2001.

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

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

TAFURI, W.L., SANTOS, R.L, ARANTES, R.M.E., GONÇALVES, R., MELO, M. N., MICHALICK, M.S.M., TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v.292, n.1-2, p.17-23, 2004.

THOMSON, F.K.; BOWEN, J.M. Electrodiagnostic testing: mapping and clinical use of motor points in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.159, n.12, p.1763-1770, 1971.

TORRES, L.F.B.; NORONHA, L. Músculos esqueléticos. In: BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.1036-1061.

TORRES-NETO, R.; RODRIGUES, M.M.P.; AMORIM, R.L.; CONCEIÇÃO, L.G.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FRANCO, S.R.V.S. Expression of CD3 and CD79a cell markers in exfoliative and ulcerative skin lesion in dogs with leishmaniasis. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.165-174, 2009.

VALENTINE, B.A.; MCGAVIN, M.D. Skeletal muscle. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4.ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p.973-1039.

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

XAVIER, S.C.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L. Canine visceral Leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal repostia from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.994-1000, 2006.

WIENDL, H.; HOHLFELD, R.; KIESEIER, B.C.; Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. **TRENDS in Immunology**, v.26, n.7, 2005.

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

IX. ANEXOS

Anexo A - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N1), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	Miopatia

* (-): ausência de alterações

Anexo B - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N2), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia crônica
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo C - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N3), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	Miopatia
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo D - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N4), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	Processo inflamatório
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo E - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N5), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	Miopatia
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo F - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N6), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polipamiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	Miopatia
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo G - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N7), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo H - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N8), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo I - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N9), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia
Extensor carpo radial	Miopatia crônica
Bíceps femoral	Miopatia
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo J - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N10), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia crônica
Extensor carpo radial	Miopatia crônica
Bíceps femoral	Miopatia crônica
Gastrocnêmio	Miopatia crônica

* (-): ausência de alterações

Anexo L - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N11), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia crônica
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	Miopatia crônica

* (-): ausência de alterações

Anexo M - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N12), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia
Extensor carpo radial	Miopatia
Bíceps femoral	Miopatia crônica
Gastrocnêmio	Miopatia crônica

* (-): ausência de alterações

Anexo N - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N13), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Processo inflamatório; miopatia crônica
Extensor carpo radial	Miopatia crônica
Bíceps femoral	Miopatia crônica
Gastrocnêmio	Miopatia crônica

* (-): ausência de alterações

Anexo O - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N14), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia crônica
Extensor carpo radial	Processo inflamatório
Bíceps femoral	Processo inflamatório
Gastrocnêmio	Miopatia crônica

* (-): ausência de alterações

Anexo P - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N15), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia crônica
Extensor carpo radial	Miopatia primária; processo inflamatório
Bíceps femoral	Miopatia; processo inflamatório
Gastrocnêmio	Miopatia crônica

* (-): ausência de alterações

Anexo Q - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N16), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia crônica
Extensor carpo radial	Miopatia crônica
Bíceps femoral	Miopatia crônica
Gastrocnêmio	Miopatia crônica

* (-): ausência de alterações

Anexo R - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N17), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia crônica
Extensor carpo radial	Miopatia crônica
Bíceps femoral	Miopatia crônica
Gastrocnêmio	Miopatia crônica

* (-): ausência de alterações

Anexo S - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N18), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	Processo inflamatório; miopatia
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	Miopatia

* (-): ausência de alterações

Anexo T - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N19), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia crônica
Extensor carpo radial	Processo inflamatório; miopatia crônica
Bíceps femoral	Miopatia crônica
Gastrocnêmio	Miopatia

* (-): ausência de alterações

Anexo U - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N20), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia crônica
Extensor carpo radial	Miopatia
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	Miopatia

* (-): ausência de alterações

Anexo V - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N21), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia crônica
Extensor carpo radial	Processo inflamatório
Bíceps femoral	Miopatia
Gastrocnêmio	Processo inflamatório; miopatia crônica

* (-): ausência de alterações

Anexo X - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N22), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Miopatia; processo inflamatório
Extensor carpo radial	Miopatia crônica
Bíceps femoral	Miopatia crônica
Gastrocnêmio	Processo inflamatório; miopatia

* (-): ausência de alterações

Anexo Z - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação eletromiográfica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N23), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação eletromiográfica
Tríceps braquial	Processo inflamatório; miopatia crônica
Extensor carpo radial	Processo inflamatório; miopatia
Bíceps femoral	Processo inflamatório
Gastrocnêmio	Miopatia crônica

* (-): ausência de alterações

Anexo AA - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N1), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	Infiltrado inflamatório mononuclear
Gastrocnêmio	Infiltrado inflamatório mononuclear; degeneração de miofibras

* (-): ausência de alterações

Anexo BB - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N2), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Intensa degeneração de miofibras
Extensor carpo radial	Degeneração de miofibras
Bíceps femoral	Degeneração de miofibras
Gastrocnêmio	Degeneração de miofibras

* (-): ausência de alterações

Anexo CC - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N3), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Infiltração de tecido adiposo
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo DD - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N4), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	Infiltrado inflamatório mononuclear
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações.

Anexo EE - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N5), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	Infiltrado inflamatório mononuclear;
Bíceps femoral	Infiltrado inflamatório mononuclear; degeneração de miofibras
Gastrocnêmio	Infiltrado inflamatório mononuclear; degeneração de miofibras; fibrose

* (-): ausência de alterações

Anexo FF - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N6), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Intensa degeneração de miofibras
Extensor carpo radial	Intensa degeneração de miofibras
Bíceps femoral	Degeneração de miofibras; intensa infiltração de tecido adiposo
Gastrocnêmio	Degeneração de miofibras

* (-): ausência de alterações

Anexo GG - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N7), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	Degeneração de miofibras
Gastrocnêmio	Degeneração de miofibras

* (-): ausência de alterações

Anexo HH - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N8), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiotopia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Infiltrado de tecido adiposo
Extensor carpo radial	Degeneração de miofibras
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo II - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N9), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Infiltrado inflamatório mononuclear; degeneração de miofibras
Extensor carpo radial	Degeneração de miofibras; intensa fibrose
Bíceps femoral	Degeneração de miofibras
Gastrocnêmio	Intenso infiltrado inflamatório mononuclear; intensa degeneração de miofibras

* (-): ausência de alterações

Anexo JJ - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N10), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Intenso infiltrado inflamatório mononuclear; intensa degeneração de miofibras; infiltrado de tecido adiposo; intensa fibrose
Extensor carpo radial	Intenso infiltrado inflamatório mononuclear; intensa degeneração de miofibras; intensa fibrose
Bíceps femoral	Intenso infiltrado inflamatório mononuclear; intensa degeneração de miofibras; intensa fibrose
Gastrocnêmio	Intenso infiltrado inflamatório mononuclear; intensa degeneração de miofibras; intensa fibrose

* (-): ausência de alterações.

Anexo LL - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N11), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	Infiltração de tecido adiposo
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo MM - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N12), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Degeneração de miofibra; infiltrado inflamatório mononuclear
Extensor carpo radial	Intenso infiltrado inflamatório mononuclear
Bíceps femoral	Degeneração de miofibra; infiltrado inflamatório mononuclear
Gastrocnêmio	Intensa degeneração de miofibras; intensa fibrose

* (-): ausência de alterações

Anexo NN - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N13), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Degeneração de miofibra; infiltração de tecido adiposo; fibrose
Extensor carpo radial	Degeneração de miofibras; fibrose
Bíceps femoral	Degeneração de miofibras; infiltrado inflamatório mononuclear; fibrose
Gastrocnêmio	Degeneração de miofibras

* (-): ausência de alterações

Anexo OO - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N14), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Degeneração de miofibras; infiltrado inflamatório mononuclear; fibrose
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	Degeneração de miofibras; fibrose

* (-): ausência de alterações

Anexo PP - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N15), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Degeneração de miofibras; infiltrado inflamatório mononuclear; fibrose
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo QQ - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N16), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Intensa degeneração de miofibras; intenso infiltrado inflamatório mononuclear; fibrose
Extensor carpo radial	Intensa degeneração de miofibras
Bíceps femoral	Intensa degeneração de miofibras; fibrose
Gastrocnêmio	Intensa degeneração de miofibras

* (-): ausência de alterações

Anexo RR - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N17), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Degeneração de miofibra
Extensor carpo radial	Fibrose
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	Degeneração de miofibra; fibrose

* (-): ausência de alterações

Anexo SS - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N18), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	-
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	-
Gastrocnêmio	-

* (-): ausência de alterações

Anexo TT - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N19), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Degeneração de miofibra; intenso infiltrado de tecido adiposo; fibrose
Extensor carpo radial	Degeneração de miofibras, infiltrado inflamatório mononuclear; infiltrado de tecido adiposo ; fibrose
Bíceps femoral	Intensa degeneração de miofibras, infiltrado inflamatório mononuclear; intenso infiltrado de tecido adiposo; fibrose
Gastrocnêmio	Degeneração de miofibras; intenso infiltrado de tecido adiposo

* (-): ausência de alterações.

Anexo UU - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N20), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Degeneração de miofibras; infiltrado de tecido adiposo; fibrose
Extensor carpo radial	Intensa degeneração de miofibras
Bíceps femoral	Degeneração de miofibras; infiltrado de tecido adiposo; fibrose
Gastrocnêmio	Degeneração de miofibras

* (-): ausência de alterações

Anexo VV - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N21), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Degeneração de miofibras; infiltrado inflamatório mononuclear; fibrose
Extensor carpo radial	Degeneração de miofibras
Bíceps femoral	Intensa degeneração de miofibras; intenso infiltrado inflamatório mononuclear
Gastrocnêmio	Intensa degeneração de miofibras; intenso infiltrado inflamatório mononuclear; infiltração de tecido adiposo; fibrose

* (-): ausência de alterações.

Anexo XX - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N22), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Degeneração de miofibras
Extensor carpo radial	Degeneração de miofibras
Bíceps femoral	Intensa degeneração de miofibras; fibrose
Gastrocnêmio	Intensa degeneração de miofibras

* (-): ausência de alterações.

Anexo ZZ - Interpretação dos resultados obtidos na avaliação histopatológica dos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N23), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia. (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculo	Avaliação histopatológica
Tríceps braquial	Intensa degeneração de miofibras
Extensor carpo radial	-
Bíceps femoral	Degeneração de miofibras; infiltrado de tecido adiposo
Gastrocnêmio	Degeneração de miofibras; infiltrado de tecido adiposo; fibrose

* (-): ausência de alterações.

Anexo AAA - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps, braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N1), naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	+	-	-	-
Bíceps femoral	++	-	-	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-) ausente; (+) raros; (++) leve; (+++) moderado; (++++) intenso.

Anexo BBB - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N2) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	-	-	-	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-) ausente; (+) raros; (++) leve; (+++) moderado; (++++) intenso.

Anexo CCC - Resultados da reação de imunistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N3) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	+	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	+	-	-	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) :leve; (+++) :moderado; (++++): intenso.

Anexo DDD - Resultados da reação de imunistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N4) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	-	-	-	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) :leve; (+++) :moderado; (++++): intenso.

Anexo EEE - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N5) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	+++	-	+	+
Gastrocnêmio	++	-	+	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo FFF - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N6) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	+	-	+	-
Gastrocnêmio	++	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo GGG - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N7) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	-	-	-	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo HHH - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N8) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, sem evidências eletromiográficas de polimiopatia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	+	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	-	-	-	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo III- Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N9) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	+	-
Extensor carpo radial	+	+	++	-
Bíceps femoral	+	+	++	-
Gastrocnêmio	+	-	++	+

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo JJJ - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N10) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	++	+++	++	-
Extensor carpo radial	++++	++	++	-
Bíceps femoral	-	-	-	-
Gastrocnêmio	++++	++	++	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo LLL- Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N11) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	-	-	-	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo MMM - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N12) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	+	-
Extensor carpo radial	+	-	++	+
Bíceps femoral	++	-	+++	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo NNN - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N13) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	+	-	-	-
Bíceps femoral	++	-	-	+
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo OOO - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N14) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	+	-	-	-
Bíceps femoral	++	-	-	+
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo PPP - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N15) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	++	-	-	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

Anexo QQQ - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N16) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	++	++++	++	+
Extensor carpo radial	++	+++	++	-
Bíceps femoral	+++	++++	++++	+
Gastrocnêmio	++	+++	+++	++

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo RRR - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N17) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	-	-	-	-
Gastrocnêmio	-	-	-	++

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo SSS - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N18) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	-	-	-	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo TTT - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N19) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiopatia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	++	-	+	-
Extensor carpo radial	++	+	++	-
Bíceps femoral	+	+	+	+
Gastrocnêmio	-	-	-	-

*(-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo UUU- Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N20) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	+	-	-	-
Bíceps femoral	-	-	+	-
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo VVV - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N21) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	+	-	-	+
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	+	-	+	++
Gastrocnêmio	++	-	+	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo XXX - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N22) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	-	-	-	-
Extensor carpo radial	-	-	+	-
Bíceps femoral	+	-	-	+
Gastrocnêmio	-	-	-	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.

Anexo ZZZ - Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de linfócitos T (CD3+), *Leishmania* sp., macrófagos e IgG, nos músculos estriados esqueléticos tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio de cão (N23) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, com evidências eletromiográficas de polimiotopia (Jaboticabal – SP, 2009).

Músculos	Imunoistoquímica			
	Linfócitos T	<i>Leishmania</i> sp.	Macrófagos	IgG
Tríceps braquial	++	-	++	+
Extensor carpo radial	-	-	-	-
Bíceps femoral	+	-	+	-
Gastrocnêmio	-	-	+	-

* (-): ausente; (+): raros; (++) : leve; (+++) : moderado; (++++): intenso.