

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO MIOCÁRDIO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Porcela dos Santos

Uruguiana, RS, Brasil

2013

FERNANDA PORCELA DOS SANTOS

**ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO MIOCÁRDIO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: João Paulo da Exaltação Pascon

Co-Orientador: Maria Lígia de Arruda Mistieri

Uruguaiiana

2013

Santos, Fernanda Porcela.

Aspectos clínicos e histopatológicos do miocárdio de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral. Fernanda Porcela dos Santos. Julho de 2013.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, julho de 2013.

Orientação: João Paulo da Exaltação Pascon

1. Clínica médica de pequenos animais 2. Cardiologia veterinária I. Pascon, João Paulo da Exaltação. II. Aspectos clínicos e histopatológicos do miocárdio de cães com leishmaniose visceral, naturalmente infectados.

FERNANDA PORCELA DOS SANTOS

**ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO MIOCÁRDIO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Clínica Médica de Pequenos Animais

Dissertação defendida e aprovada em: 19, julho de 2013.

Prof. Doutor João Paulo da Exaltação Pascon
Orientador - UNIPAMPA

Guilherme Albuquerque de Oliveira Cavalcanti
Universidade Federal de Pelotas

Maria Lígia de Arruda Mistieri
Universidade Federal do Pampa

Dedico este trabalho aos meus pais, Luís Fernando (*in memoriam*) e Jussara, ao meu irmão Felipe e ao meu noivo Nelson pelo apoio e confiança depositados em mim em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar força nos momentos difíceis, sem ele nada seria possível.

À minha mãe e meu irmão pelo apoio, carinho e compreensão pela ausência, e a minha mãe pelo amor irrestrito e suporte dado em toda minha vida.

Ao Nelson, meu noivo, pelo apoio, carinho e incentivo incondicionais, pelos conselhos dados nas horas mais difíceis e grande companheirismo desde o momento que nos conhecemos.

Ao meu orientador, João Paulo da Exaltação Pascon pela oportunidade e confiança depositados em mim desde o momento que iniciei este mestrado. Pelo incentivo inicial sem o qual não seria possível ingressar na vida acadêmica. Pela amizade, paciência, ensinamentos e sugestões passados para mim ao decorrer deste mestrado.

À Maria Lígia de A. Mistieri, minha co-orientadora, pela amizade, ensinamentos e apoio para participar de projetos.

Ao professor Bruno dos Anjos, pela importantíssima ajuda durante a avaliação histopatológica e paciência para me ensinar.

Ao Deyverson Thiago P. Pereira, estagiário, pela amizade e incansável ajuda no desenvolvimento deste trabalho, sem a qual não seria possível desenvolvê-lo.

Aos meus colegas de pós-graduação, pela convivência, em especial a Cibele Lima Lhamas, pela amizade sincera que levarei para minha vida, pelas conversas longas e paciência para me escutar nos momentos difíceis.

Aos amigos, Maiara Aline Gonçalves, Mayara Nobrega, Caroline Silveira, Lucas Quevedo, Adriano Krabble, pela amizade e convivência que tornaram minha vida durante o mestrado mais feliz e divertida.

As minhas novas amigas da “república de alegretenses”, Patrícia Soares, Nieli Barbosa e Michele Vila Verde, pelo companheirismo e amizade pra vida toda, e pelas conversas de tardezinha sempre embaladas por uma conversa animada e um bom chimarrão.

As minhas fiéis amigas de quatro patas, Xuca e Cida, pelas recepções sempre cheias de alegria e carinho, pelo amor incondicional e paciência pela distância.

Aos cães utilizados neste estudo, sem eles nada seria possível, minha eterna gratidão e respeito.

A CAPES pela bolsa de estudos a mim fornecida, a qual não seria possível realizar este mestrado.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de crescimento e aprendizado provida a mim.

Ao Hospital Universitário Veterinário da UNIPAMPA pela disponibilização do local para realização deste estudo.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária pelo processamento do material histológico e auxílio para avaliação histopatológica.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE QUADROS	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
LISTA DE SIGLAS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. <i>Etiologia</i>	18
2.2. Forma de transmissão da leishmaniose visceral	18
2.3. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp. e patogênese	19
2.4. Sinais clínicos.....	20
2.5. Epidemiologia	20
2.6. Diagnóstico.....	21
2.7. Aspectos clínicos cardiovasculares e histopatologia miocárdica	22
2.8. Hematologia e Bioquímica sérica.....	23
2.9. Radiografia torácica	24
2.10. Eletrocardiografia.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivos Gerais	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
4.1. INTRODUÇÃO.....	32
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.3. RESULTADOS	36
4.4. DISCUSSÃO.....	45

4.5. REFERÊNCIAS	48
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Universidade Federal do Pampa

ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO MIOCÁRDIO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL

AUTOR: FERNANDA PORCELA DOS SANTOS
ORIENTADOR: JOÃO PAULO DA EXALTAÇÃO PASCON
CO-ORIENTADOR: MARIA LÍGIA DE ARRUDA MISTIERI
Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 19 de julho de 2013.

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose parasitária com distribuição cosmopolita, causada pelo protozoário *Leishmania spp.* Diversos sistemas orgânicos podem ser afetados diretamente ou indiretamente pelo parasitismo, resultando em aspectos clínicos variáveis e inespecíficos em cães. Relatos isolados com indícios histológicos de acometimento miocárdico em cães com LV sugerem comprometimento deste sistema. Desta forma, objetivou-se com o presente estudo, avaliar os aspectos clínicos e histopatológicos do miocárdio de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral. Para tanto, as características físicas gerais, hematimétricas, bioquímicas (creatinina quinase-CK, fração MB da creatina quinase-CK-MB- e troponina I), radiográficas do tórax, eletrocardiográficas e histopatológicas do miocárdio foram avaliadas em 36 cães portadores de LV (grupo LV - GLV) e comparadas às variáveis médias de 15 cães hígidos (grupo controle- GC), com exceção da avaliação histopatológica, realizada apenas no GLV. Ao exame físico geral observou-se maior prevalência de cães assintomáticos no GC (100%) e polissintomáticos no GLV (66%). Dois cães do GLV apresentaram sopro sistólico de intensidade II/VI e III/VI, em região de foco mitral. Os valores médios de hemácia, hemoglobina e hematócrito foram inferiores nos cães do GLV ($p < 0,0001$), associados a maiores valores de proteína total ($p < 0,0001$), leucócitos totais ($p = 0,0151$), neutrófilos ($p = 0,0027$), CK ($p = 0,0153$) e CK-MB ($p = 0,0038$) quando comparado ao GC. Não foram observadas alterações radiográficas qualitativas ou diferenças quantitativas entre os grupos avaliados ($p = 0,1228$). À eletrocardiografia foi detectada maior incidência de arritmia sinusal respiratória nos cães do GLV (75%) e ritmo sinusal nos cães do GC (60%), atestado pelo teste das proporções ($p = 0,016$). A amplitude média da onda P foi inferior no GLV ($p = 0,008$). Não foram observadas arritmias cardíacas em ambos os grupos, porém foi verificada no GLV a presença de episódios isolados de marcapasso migratório e *sinus arrest* associados à arritmia sinusal

respiratória. A luz da histopatologia do miocárdio foi possível observar a presença de infiltrado inflamatório mononuclear em 77,8% (n=28) dos cães do GLV, sendo a maior prevalência de infiltrado linfocitoplasmocitário de intensidade leve. Conclui-se que os cães com LV do presente estudo apresentaram maior prevalência de aspectos clínicos polissintomáticos, associados à anemia normocítica normocrômica, acompanhada de leucocitose por neutrofilia e hiperproteinemia, elevação da atividade sérica de CK e CK-MB, sem alterações significativas da silhueta cardíaca à radiografia, maior prevalência de arritmia sinusal respiratória com episódios de marcapasso migratório e *sinus arrest*, relacionados à presença de infiltrado inflamatório mononuclear multifocal leve à histopatologia do miocárdio, com baixa incidência de vasculite necrosante e rara detecção de formas amastigotas da *Leishmania* sp.

Palavras-chave: biomarcadores de lesão miocárdica, cardiologia, caninos, zoonose.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Animal Science
Federal University of Pampa

CLINICAL AND PATHOLOGICAL FEATURES OF MIOCARDIAL DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

AUTHOR: FERNANDA PORCELA DOS SANTOS

ADVISOR: JOÃO PAULO DA EXALTAÇÃO PASCON

Date and place of defense: Uruguaiana, July 19th, 2013.

Visceral leishmaniasis (VL) is a worldwide parasite zoonotic, caused by a protozoa *Leishmania spp.* Several organic systems may be affected directly or indirectly by the parasitism, resulting in variable and unspecific clinical signs in dogs. Myocardial damage in affected dogs is suggested by isolated reports with histological evidences of myocarditis. Therefore, the aim of this study was evaluate the clinical and myocardial histopathologic features of naturally infected dogs with VL. Therefore, general physical characteristics, hematological, biochemical (creatine kinase- CK, MB fraction of creatine kinase and troponin-I) radiographic of the thorax, electrocardiographic and histopathological myocardial were evaluated in 36 dogs with VL (VL group- VLG) and average variables compared to 15 healthy dogs (control group-CG), except for the histopathological evaluation. In the general physical examination was observed higher prevalence of asymptomatic dogs in the control group (100%) and polisymptomatic in GLV (66%). Two dogs of the GLV presented systolic murmur of intensity II / VI and III / VI, in the region of the mitral valve. The mean values of erythrocyte count, haemoglobin and haematocrit were lower in dogs GLV ($p < 0.0001$), associated with higher total protein ($p < 0.0001$), total leukocyte count ($p = 0.0151$), neutrophils ($p = 0.0027$), CK ($p = 0.0153$) and CK-MB ($p = 0.0038$) when compared to CG. Radiographic evaluation reveal no alterations or differences between groups ($p = 0.1228$). In the electrocardiography analysis, higher incidence of respiratory sinus arrhythmia with wandering pacemaker and sinus arrest in dogs of GLV (75%) and sinus rhythm in the CG (60%) was attested by the proportions test ($p = 0.016$). The mean P wave amplitude was lower in GLV ($p = 0.008$). Cardiac arrhythmias were not present in both groups, but sinus arrest was present in GLV. The histopathology of the myocardium displayed mononuclear cell

infiltration in 77.8% (n = 28) of the GLV dogs, with higher prevalence of mild lymphohistioplasmocytic inflammatory infiltrate. We conclude that enrolled dogs with LV presented aspect of polisymptomatic clinical features, associated with normochromic normocytic anemia, followed by leukocytosis, neutrophilia, hyperproteinemia, elevation of serum activity of CK and CK-MB, without significant changes of the cardiac silhouette in the radiography or heart rhythm by electrocardiogram, related to the presence of multifocal mild intensity mononuclear cell infiltration in the myocardial, with low incidence of necrotizing vasculitis and rare detection of amastigotes forms of *Leishmania* sp. on myocardium histopatology.

Key-Works: biomarkers of miocardial injury, cardiology, canine, zoonosis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotografia de radiografia torácica de canino, demonstrando a mensuração da escala vertebral cardíaca (VHS). Eixo longitudinal (setas amarelas), eixo transversal (setas vermelhas), brônquio principal (círculo amarelo), VCC= veia cava caudal..... 25
- Figura 2- Fotografia ilustrativa dos locais onde se coletou os fragmentos para avaliação histopatológica. A, parede livre do coração esquerdo demonstrando a região 1. B, parede livre do coração direito demonstrando a região 2. C, coração de cão demonstrando a região 3. D, região 2. E, região 1. F, região 3..... 35
- Figura 3- Fotografia de cão hígado, fêmea, SRD, pertencente ao GC..... 36
- Figura 4- Fotografias de cães pertencentes ao GLV. A, cão polissintomático apresentando áreas alopécicas nos membros torácicos e pélvicos, onicogribose, lesões crostosas e úlcera cutânea em base de orelha. B, cão com hiperqueratose no focinho e alopecia periorbital. C, cão com alterações dermatológicas como alopecia periorbital e úlcera cutânea em base de orelha. D, onicogribose. E, cão com áreas de hipotricose e seborreia seca..... 37
- Figura 5- Fotografias de radiografias torácicas de cão do GLV. A, radiografia torácica em projeção ventro-dorsal. B, radiografia torácica em projeção latero-lateral..... 40
- Figura 6- Traçado eletrocardiográfico evidenciando parada ou bloqueio sinusal em cão do GLV em derivação II..... 40
- Figura 7 - Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV naturalmente infectado. A, infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário focal discreto. HE, x20. B, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focal discreto. HE, x40..... 42

- Figura 8- Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV naturalmente infectado. A, infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário focal leve (seta). HE, x20. B, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focal leve (círculo). HE, x10..... 42
- Figura 9- Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV naturalmente infectado. A, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário multifocal moderado subepicárdico (seta). HE, x20. B, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focal moderado subepicárdico (seta). HE, x40. C, infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário focal moderado subepicárdico (seta). HE, x20. D, infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário focal moderado subepicárdico (seta). HE, x40..... 43
- Figura 10- Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV naturalmente infectado, demonstrando infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focalmente extenso moderado à acentuado (círculo). HE, x10..... 43
- Figura 11- Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV naturalmente infectado demonstrando a presença de estruturas esféricas basofílicas (seta) no citoplasma de um macrófago, compatíveis com formas amastigotas de *Leishmania sp.*..... 44
- Figura 12- Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV demonstrando a presença de fibrose focal (seta). HE, x10..... 44
- Figura 13- Fotomicrografia do miocárdio de cão com com LV naturalmente infectado evidenciando a presença de vasculite necrosante (círculo). HE, x20..... 44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Porcentagem de ocorrência das alterações clínicas observadas nos animais sintomáticos do GLV.....	38
Quadro 2- Média e desvio-padrão das variáveis hematológicas avaliadas, nos animais do grupo leishmaniose visceral (GLV) e grupo controle (GC).....	39
Quadro 3- Média e desvio-padrão das variáveis eletrocardiográficas avaliadas nos animais dos grupos leishmaniose visceral e controle.....	41
Quadro 4- Porcentagem de ocorrência de lesão histopatológica no miocárdio de cães do GLV, quanto à característica do infiltrado inflamatório e sua intensidade.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA- análise de variância

AV- atrioventricular

ASR- arritmia sinusal respiratória

bpm- batimentos por minuto

CHCM- concentração de hemoglobina corpuscular média

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)

EEM- eixo elétrico médio

GC- grupo controle

GLV- grupo leishmaniose visceral

HE- coloração de hematoxilina-eosina

HUVet- hospital universitário veterinário

LV- leishmaniose visceral

LVC- leishmaniose visceral canina

n.- número

p.- página

PCR- reação em cadeia pela polimerase

PPT- proteína plasmática total

RIFI- reação de imunofluorescência indireta

s- segundos

SFM- sistema fagocítico-mononuclear

SRD- sem raça definida

UNIPAMPA- Universidade Federal do Pampa

v.- volume

VCM- volume corpuscular médio

LISTA DE SIGLAS

cm- centímetro

CK- enzima creatina quinase

CK-BB- fração BB da creatina quinase

CK-MB- fração MB da creatina quinase

CK-MM- fração MM da creatina quinase

cTnI- concentração sérica de troponina I

fL- fentolitros

g/dl- gramas por decilitro

mm/s- milímetros por segundo

ms- milissegundos

mV- milivoltagem

ng/ml- nanogramas por mililitros

U/L- unidades por litro

µg/L- microgramas por litro

µL- microlitro

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade parasitária causada pelo protozoário flagelado *Leishmania sp.* (Fortes 2004). Humanos, felinos, roedores, caninos e outros mamíferos podem ser acometidos pela doença, sendo o cão considerado hospedeiro natural e principal reservatório da enfermidade (Monteiro et al. 2005, Xavier et al. 2006). Sua transmissão ocorre por meio da picada de um vetor, flebotomídeo do gênero *Lutzomyia*, popularmente denominado mosquito-palha, (Gontijo e Melo 2004, Monteiro et al. 2005, Tartarotti et.al. 2011). Após inoculação do parasita no hospedeiro, ocorre sua disseminação pelo organismo e instalação da LV, que acarreta o aparecimento de inúmeros danos em diversos órgãos como pele, baço, fígado, medula óssea, linfonodos e mucosas (Silva et al., 2009). Em cães, a LV apresenta características clínicas inespecíficas e variáveis, resultando em portadores assintomáticos, oligossintomáticos ou polissintomáticos, uma vez que um ou mais órgãos ou sistemas podem ser afetados (Mancianti et al. 1988).

Com relação ao sistema cardiovascular, lesões histopatológicas foram demonstradas em miocárdio de cães naturalmente infectados com LV, sendo estas caracterizadas por miocardite linfoplasmocitária e necrose de coagulação em cardiomiócitos de 27 e 24 cães, respectivamente (Rosa et al. 2013). Além disso, foram descritas miocardite e vasculite com presença de infiltrado inflamatório mononuclear, necrose e degeneração das fibras miocárdicas (López-Peña et.al. 2009, Alves et al. 2010). Da mesma forma, Silva e colaboradores (2009) relataram ocorrência de pericardite crônica associada à *Leishmania chagasi* em cão, com infiltrado linfoistioplasmocitário multifocal de moderado a acentuado. Entretanto, alterações clínicas relacionadas ao sistema cardiovascular decorrentes da infecção por *Leishmania sp.* ainda não foram descritas (López-Peña et.al. 2009, Alves et al. 2010, Rosa et al. 2013).

Estudo *in vivo* avaliando 105 cães naturalmente infectados com LV, demonstraram a ocorrência de sinus arrest em 14,3% dos animais estudados, complexos atriais prematuros em 4,8% e bloqueio de ramo direito em 4,8% dos cães. Outro relato de um cão com esta enfermidade, Lopez-Peña et al. (2009) observaram diminuição da amplitude do complexo QRS, associado à atrofia e degeneração de cardiomiócitos. Por sua vez, bloqueio atrioventricular de primeiro-grau e infradesnivelamento do segmento ST foram descritos em um cão com LV, associados à presença de miocardite e poliarterite necrosante no átrio direito

(Torrent et al. 2005). Neste interim, o registro eletrocardiográfico permite verificar a atividade elétrica do coração, objetivando detectar distúrbios de formação e condução do impulso cardíaco, bem como obter o ritmo e frequência cardíaca (Goodwin 2002).

Da mesma forma que os métodos complementares de diagnósticos por imagem, a mensuração da atividade sérica enzimática e de biomarcadores de lesão miocárdica pode auxiliar na detecção do comprometimento miocárdico precoce, visto que elevação de creatina quinase (CK), fração MB da creatina quinase (CK-MB) (Medeiros et al. 2011) e troponina I (cTnI) (Silvestrini et al. 2012) foram detectados em cães com LV.

Cães com leishmaniose visceral desempenham papel crucial na perpetuação do ciclo rural e urbano desta zoonose, propiciando não apenas prejuízos a sua própria espécie, mas também facilitando a infecção humana. Desta forma, faz-se necessário conhecer o comportamento clínico completo desta enfermidade para auxiliar seu diagnóstico e permitir, diante disto, melhor controle e prevenção da afecção. Neste contexto nota-se especialmente a lacuna de informação relacionada aos efeitos cardiovasculares desta afecção em cães.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Etiologia

A leishmaniose visceral canina (LVC) é causada por um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, que possui duas formas no seu ciclo parasitário: promastigota e amastigota (Fortes 2004). A forma promastigota, constituída de corpo alongado com duas extremidades afiladas seguidas por flagelo, está presente no intestino do hospedeiro intermediário. A forma amastigota possui formato ovalado, não possui flagelo, e se encontra nas células do hospedeiro definitivo, principalmente em macrófagos e outras células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM), mas também pode ser observado em leucócitos (Fortes 2004, Bowman et al. 2006, Lappin 2006).

Este protozoário é capaz de afetar diversas partes do sistema orgânico, resultando basicamente em duas apresentações clínicas principais: cutânea e visceral. Seu período de incubação é muito variável, podendo oscilar de semanas a meses, e às vezes até mais de um ano (Fortes, 2004). Pode acometer diversas espécies como caninos, humanos e outros mamíferos. Mas sua principal relevância está no fato de ser considerada importante zoonose, com roedores e caninos atuando como hospedeiro definitivo e reservatórios. Os humanos e gatos são hospedeiros acidentais (Fortes 2004, Monteiro et.al. 2005, Bowman et al. 2006, Lappin 2006, Xavier et.al. 2006).

2.2. Forma de transmissão da leishmaniose visceral

A principal forma de transmissão da leishmaniose se dá pela picada flebotomídeos contaminados (hospedeiro intermediário) popularmente conhecidos como mosquitos-palha. Os flebotomídeos pertencem a família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia sp.* (Gontijo e Melo 2004, Monteiro et.al. 2005).

Estes insetos medem de 2 a 3 mm de comprimento, possuem o corpo revestido de pelo e coloração clara. Seu ciclo biológico compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Após a cópula, as fêmeas de *Lutzomyia sp.* depositam seus ovos em substrato úmido no solo. Os ovos eclodem de 7 a 10 dias após a postura, originando as larvas que se alimentam de matéria orgânica. Estas sofrem muda em quatro estágios, no período médio de 20 a 30 dias,

quando se transformam em pupa. O período pupal, em condições adequadas, dura em média 14 dias, totalizando ciclo de vida em médio de 30 a 40 dias para chegar ao adulto (Ministério da Saúde 2006).

O inseto apresenta período de maior atividade entre as 18 e 22 horas e habita locais variados, entretanto, as formas imaturas desenvolvem-se em ambientes úmidos, ricos em matéria orgânica e com baixa incidência luminosidade (Feitosa et al. 2000). Para sua nutrição, necessitam de carboidratos como fonte de energia, todavia somente a fêmea é hematófaga (Ministério da Saúde 2006)

No Brasil, o principal gênero transmissor da *Leishmania sp.* é a *Lutzomyia sp.* (Gontijo e Melo 2004, Monteiro et.al. 2005), com maior prevalência da espécie *Lutzomyia longipalpis* em áreas endêmicas de leishmaniose visceral, como verificado no Estado do Rio Grande do Sul (Barata et al. 2005, Tartarotti et al. 2011).

A adaptação deste vetor a ambientes peridomiciliares, aliada à diversidade de hospedeiros vertebrados incluídos no repasto sanguíneo deste vetor como aves, seres humanos, cães dentre outros, deixam clara sua contribuição para transmissão e perpetuação da doença e importância epidemiológica no ciclo urbano desta zoonose (Barata et al. 2005, Silva et al. 2007, Tartarotti et al. 2011).

2.3. Ciclo de vida da *Leishmania sp.* e patogênese

O ciclo de vida da *Leishmania spp.* se inicia no repasto sanguíneo dos flebotômídeos em hospedeiros vertebrados contaminados, a partir dos quais os insetos ingerem forma amastigota do protozoário. No intestino do vetor, as formas amastigotas se transformam em promastigotas e, por cissiparidade simples, se reproduzem. Portanto, grande número de protozoários pode ser inoculado por regurgitamento no hospedeiro vertebrado, por meio da picada do flebotômídeo (Fortes, 2004).

Após a inoculação do protozoário no organismo do hospedeiro, o sistema imune do animal sofre modificações. A infecção é caracterizada por resposta policlonal de células B, levando a grande produção de anticorpos contra os antígenos parasitários, gerando quadro de hipergamaglobulinemia e formação de imunocomplexos circulantes. Na leishmaniose canina, a deposição dos imunocomplexos e subsequente ativação do sistema complemento têm sido associadas à vasculite, uveíte, artrite, dermatite e glomerulonefrite (Torrent et al. 2005, Lappin 2006).

2.4. Sinais clínicos

Após a inoculação do parasita no hospedeiro vertebrado, ocorre sua disseminação pelo organismo e instalação da leishmaniose propriamente dita, que acarreta, em sua forma visceral, lesões em diversos órgãos, em especial a pele, baço, fígado, medula óssea, linfonodos e mucosas (Fortes 2004, Lappin 2006, Ministério da Saúde 2006, Xavier et.al. 2006).

No cão, o comprometimento orgânico causado pelo protozoário pode resultar em diversos sinais clínicos inespecíficos como: perda de peso com apetite de normal a elevado, poliúria, polidipsia, depressão, vômito, diarreia, tosse, epistaxe, espirro e melena. As lesões cutâneas são detectadas em aproximadamente 90% dos cães sintomáticos e caracterizam-se principalmente por hiperqueratose, descamação, úlceras mucocutâneas e nódulos intradérmicos sobre o focinho, orelhas externas, orelhas médias e coxins. Esplenomegalia, linfadenopatia, dermatopatia, febre, rinite, dermatite, ruídos pulmonares aumentados, icterícia, articulações sensíveis e edemaciadas, uveíte (Ministério da Saúde 2006, Lappin 2006, López-Peña et al. 2009), ascite, anemia (Fortes, 2004) e edema de membros e face (López-Peña et al., 2009) são comumente identificados nos exames físicos.

Por este motivo, a doença pode se manifestar de diferentes formas, incluindo animais assintomáticos (sem sinal clínico), animais oligossintomáticos (com até três sinais clínicos), ou polissintomáticos (mais de três sinais clínicos) (Ministério da Saúde 2006, Xavier et.al. 2006).

2.5. Epidemiologia

O primeiro relato da existência do protozoário em seres humanos ocorreu em 1900, quando o médico inglês William Leishman descobriu as formas amastigotas deste parasita, posteriormente estudadas por Charles Donovan, Laveran e Mesnil. Somente em 1903, Ronald Ross reconheceu a existência de um novo gênero, a *Leishmania*, como agente causal das leishmanioses, que recebeu este nome em honra de seu descobridor, Leishman. O primeiro relato de leishmaniose em seres humanos no Brasil ocorreu em 1934, quando foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania sp.* em cortes histológicos de fígado de pacientes que morreram com suspeita de febre amarela. Somente 20 anos depois é que se registrou o primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará (Altamirano et al. 2003).

A leishmaniose visceral, inicialmente, foi considerada doença característica de zonas rurais. No entanto, houve mudanças epidemiológicas no decorrer do tempo, devido à crescente urbanização, com desmatamento e migração da população para áreas urbanas. As precárias condições socioeconômicas e de saneamento, contribuíram para transmissão e disseminação da leishmaniose visceral (Barata et al. 2005, Monteiro et al. 2005). Com a expansão da doença e o aumento no número de casos, esta passou a ser considerada, pela Organização Mundial da Saúde, prioridade dentre as doenças tropicais (WHO 2010). Atualmente, a Leishmaniose Visceral é prevalente em 88 países, afetando 1,6 milhões de pessoas anualmente, dos quais 90% concentram-se nos países Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. Ainda assim, estima-se que 200 milhões de pessoas estejam em risco de infecção (Barata et.al. 2005, Monteiro et.al. 2005, WHO 2010).

No Brasil, a enfermidade ocorre em 21 Estados da federação, atingindo em média 3.379 novos casos humanos anualmente. Na região Sul não haviam sido relatados casos autóctones até o ano de 2008, quando o município de São Borja notificou surto de cães com leishmaniose visceral. Em dezembro de 2010, a soroprevalência de cães afetados do município atingiu 22,5%. No mesmo período, o município de Uruguaiana registrou soroprevalência em cães de 14% (Ministério da Saúde 2006, Mello et al. 2010, Tartarotti et al. 2011).

2.6. Diagnóstico

O diagnóstico da afecção, muitas vezes, é difícil de ser realizado, pois muitos cães são assintomáticos ou apresentam sinais inespecíficos. A doença pode ficar inaparente por longo período, dependendo das condições imunológicas dos cães infectados. Para a confirmação do diagnóstico é necessária à realização de testes parasitológicos diretos, capazes de detectar a presença do parasita, ou indiretos. Dentre os testes indiretos, destacam-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), nos quais podem-se detectar a presença de anticorpos contra *Leishmania sp.* no soro. Além destes, pode ser realizada a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), a qual permite detectar o parasita, no entanto, este teste é mais oneroso. (Gontijo e Melo 2004, Fissore et al. 2004, Ministério da Saúde 2006, Queiroz et al. 2010, Gramiccia 2011).

A RIFI é o método mais comumente utilizado, demonstrando sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro. Sua especificidade

pode ser prejudicada quando há presença de reações cruzadas com outras doenças infecciosas e parasitárias, a exemplo da tripanossomíase (Alves et al. 2010). O teste de ELISA é amplamente empregado por sua rápida e fácil execução, além de permitir a detecção de baixos títulos de anticorpos. Para o diagnóstico preciso da doença, os testes de ELISA e RIFI são realizados em conjunto, sendo primeiramente realizado o RIFI, por possuir alta sensibilidade, diminuindo os riscos de resultados falso-negativos e posteriormente, realiza-se o ELISA que apresenta maior especificidade e diminui a ocorrência de reações cruzadas. (Ministério da Saúde 2006)

A PCR é uma técnica que identifica e amplia o DNA do cinetoplasto do parasita em fragmentos da pele ou amostras de soro do cão e apresenta sensibilidade e especificidade próximas a 100% (Ministério da Saúde 2006, Gramiccia 2011, Queiroz 2010), porém possui a desvantagem do alto custo de realização.

Os métodos parasitológicos diretos permitem a visualização direta do parasita, a partir de esfregaços realizados com material de punção aspirativa de linfonodos, biópsia de medula óssea e raspados de pele. Este exame possui especificidade elevada, no entanto, a sensibilidade é considerada baixa. Dos testes disponíveis, o Ministério da Saúde preconiza utilização da RIFI e ELISA (Fissore et al. 2004, Gontijo e Melo 2004, Ministério da Saúde 2006, Queiroz et al. 2010, Gramiccia 2011).

2.7. Aspectos clínicos cardiovasculares e histopatologia miocárdica

No sistema cardiovascular, os danos provocados pela leishmaniose visceral em cães e seres humanos ainda não são bem compreendidos. No entanto, alguns relatos e estudos em cães demonstram indícios de lesão miocárdica sugerindo agressão direta ou indireta do parasita ao sistema cardiovascular (López-Peña et al. 2009, Silva et al. 2009, Alves et al. 2010, Sousa et al. 2013).

A análise histológica do miocárdio de 30 cães naturalmente infectados por LV evidenciou miocardite linfoplasmocitária principalmente na região subendocárdica e subepicárdica, além de necrose de coagulação de cardiomiócitos, aumento de colágeno intersticial e presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.* no coração de 20 cães. Em relatos de cães infectados com esta doença descreveu-se a ocorrência de miocardite, vasculite e necrose, além de reação inflamatória com infiltrado mononuclear, e consequente degeneração das fibras miocárdicas (López-Peña et al. 2009, Alves et al. 2010). Da mesma

forma, Silva e colaboradores (2009) relataram ocorrência de pericardite crônica associada à *Leishmania chagasi* em um cão, com infiltrado multifocal de moderado a acentuado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, e discreta inflamação no miocárdio. De forma similar, um relato isolado de cão com LV revelou a presença de miocardite e poliarterite necrosante no átrio direito deste animal (Torrent et al. 2005). No entanto, em nenhum destes relatos foram evidenciados os efeitos clínicos da doença (Silva et al. 2009, Alves et al. 2010). Em contrapartida, relatos em seres humanos descrevem taquicardia e sopro sistólico, além da presença de derrame pericárdico discreto em portadores da afecção (Diamantino 2010).

2.8. Hematologia e Bioquímica sérica

Em cães com leishmaniose visceral, os achados laboratoriais comumente caracterizam-se por alterações hematológicas como anemia, geralmente normocítica normocrômica, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, hiperproteinemia, trombocitopenia, leucopenia associada à linfopenia ou leucocitose. Alguns estudos atribuem anemia e leucopenia à supressão da produção eritrocitária na medula óssea, causada pela colonização desta pelo parasita (Costa-Val et al. 2007).

Além da hematologia, as mensurações da atividade sérica enzimática e de biomarcadores de lesão miocárdica, podem auxiliar na detecção de lesões teciduais decorrentes de LV. Estudos *in vivo* de cães com LV demonstraram, aumento sérico de alguns biomarcadores como creatina quinase (CK), fração MB da creatina quinase (CK-MB) (Medeiros et al. 2011) e concentração sérica de troponina I (cTnI) reiterando a importância destas avaliações (Silvestrini et al. 2012).

A creatina quinase (CK) é enzima cuja mensuração é comum na Medicina Veterinária como indicador de lesão muscular inespecífica. Sabe-se que esta enzima realiza a regulação do metabolismo intracelular dos tecidos contráteis (contração muscular), através da fosforilação da creatina pelo ATP para geração de energia. Pode ser encontrada no citosol ou associada a estruturas miofibrilares e possui duas subunidades M e B, as quais originam três isoenzimas: CK-BB, CK-MB e CK-MM. A CK-BB encontra-se de forma predominante no cérebro e sistema digestório e a CK-MM está presente no músculo estriado. A isoenzima CK-MB, por sua vez, é encontrada especificamente no miocárdio e é liberada na corrente sanguínea frente à hipóxia ou necrose de fibras cardíacas (Yonezawa et al. 2009, Santos et al. 2011).

Outros biomarcadores relevantes, as troponinas, formam um complexo que regula a interação cálcio-dependente da miosina com a actina. São constituídas de três diferentes proteínas: I, C e T, existentes tanto nos músculos esqueléticos quanto no cardíaco e codificadas por diferentes genes. A troponina I é biomarcador específico de lesão miocárdica, que se encontra exclusivamente nos cardiomiócitos. Esta proteína regula a contração muscular através da sua ligação a uma molécula de cálcio, o que ocasiona a liberação do sítio ativo da actina permitindo a ligação dos miofilamentos actina e miosina, para realizar a contração muscular. Sua liberação na circulação ocorre frente à necrose miocárdica (Lobetti, Dvir & Pearson 2002, Diniz et al. 2007, Yonezawa et al. 2009).

2.9. Radiografia torácica

O exame radiográfico do tórax é um dos métodos de diagnóstico mais utilizado para avaliar a silhueta cardíaca de cães, pois permite não somente a sua visibilização, mas também a observação de efusão pleural e pericárdica. Para avaliação cardíaca são necessárias projeções lateral e ventrodorsal ou dorsoventral buscando obter imagem espacial adequada. Deve-se posicionar o animal de forma simétrica e padronizada, para obter imagem radiográfica adequada e permitir o acompanhamento da progressão clínica do paciente. O mau posicionamento com rotação do animal pode causar alterações significativas na aparência do coração e estruturas relacionadas, prejudicando a interpretação radiográfica. As variações na aparência da silhueta cardíaca podem ser influenciadas também pela fase da respiração (inspiração ou expiração), estado corporal do animal, conformação torácica e fase do ciclo cardíaco. As radiografias, de preferência, devem ser realizadas na fase de inspiração máxima, em busca de contraste adequado entre os pulmões e as diferentes estruturas torácicas (Ware 2006).

A radiografia de é avaliada por meio dos métodos qualitativo e quantitativo, dos quais se sugere aumento de câmaras atrioventriculares e aumento global da silhueta cardíaca (escala vertebral), respectivamente. O método radiográfico qualitativo faz uso dos conhecimentos sobre anatomia radiográfica do profissional avaliador, a fim de se detectar alterações de forma e tamanho do coração. A avaliação quantitativa, denominada escala vertebral cardíaca ou *vertebral heart size* (VHS), permite avaliar o tamanho global do coração utilizando o sistema de unidade vertebral (Buchanan e Bücheler 1995, Schelling 2002, Simone 2007). O VHS é avaliado a partir de mensurações do eixo longitudinal e eixo transversal cardíaco. O eixo

longitudinal é medido do bordo ventral do brônquio principal esquerdo à porção mais ventral do ápice cardíaco. O eixo transversal perpendicular máximo é medido no terço central da sombra cardíaca, tomando como referência a veia cava caudal. Após, ambas as medidas são comparadas com a coluna vertebral torácica, iniciando no limite cranial da quarta vértebra torácica, sendo este comprimento estimado em décimos (0,1 vértebra). Estas medidas são somadas para a obtenção do VHS (Figura 1) (Buchanan e Bücheler 1995, Ware 2006).

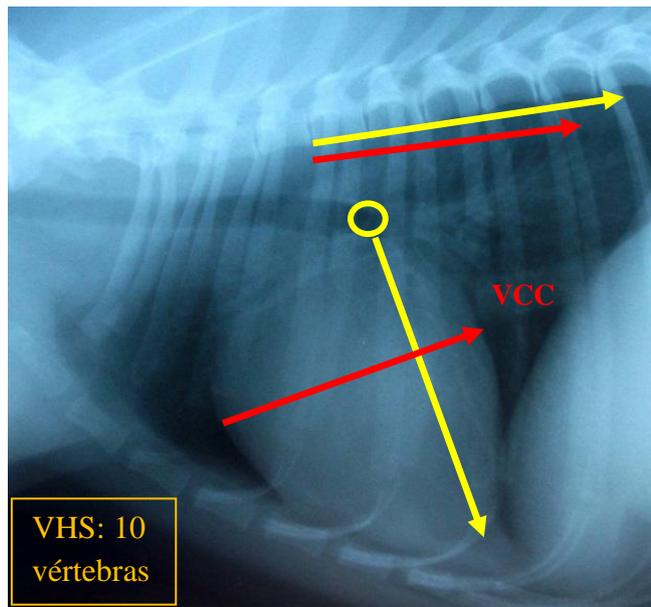


Figura 1. Fotografia de radiografia torácica de canino, demonstrando a mensuração da escala vertebral cardíaca (VHS). Eixo longitudinal (setas amarelas), eixo transversal (setas vermelhas), brônquio principal (círculo amarelo), VCC= veia cava caudal.

2.10. Eletrocardiografia

O registro eletrocardiográfico permite verificar a atividade elétrica do coração, objetivando detectar distúrbios de formação e condução do impulso cardíaco, bem como obter o ritmo e frequência cardíaca. Este exame é realizado a partir da colocação de eletrodos positivos e negativos na superfície corpórea, utilizando sete derivações (DI, DII, DIII, aVF, aVL, aVR), para captar as diferenças de potencial elétrico que, ao eletrocardiograma, geram ondas e complexos que representam os estágios de despolarização e repolarização do miocárdio permitindo, desta forma, diagnosticar arritmias cardíacas decorrentes de alterações miocárdicas (Goodwin 2002).

Eletrocardiograma constitui método de diagnóstico complementar importante na LV, visto que, estudo relatou a ocorrência de sinus arrest, bloqueio de ramo direito, complexos atriais prematuros e maior duração da onda P e complexo QRS (Sousa et al. 2013) em cães com LV, bem como relatos isolados de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* descreveram ocorrência de bloqueio atrioventricular de primeiro-grau com infradesnívelamento de ST (Torrent et al. 2005) e menor amplitude do complexo QRS (Lopez-Peña et al. 2009) nestes animais.

Por fim, cães com Leishmaniose Visceral desempenham papel crucial na perpetuação do ciclo rural e urbano da doença, propiciando não apenas prejuízos a sua própria espécie, mas também favorecendo a infecção humana. Desta forma, faz-se necessário conhecer o comportamento clínico desta enfermidade; especialmente em seus aspectos cardiovasculares, por meio de exames complementares, como hematimetria, bioquímica sérica, eletrocardiografia, radiografia e histopatologia, visando auxiliar o diagnóstico precoce e melhorar o prognóstico dos pacientes acometidos. Neste aspecto, o comportamento similar da infecção observado entre humanos e cães, faz deste último um excelente modelo experimental que possibilita a busca por maiores informações.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivos Gerais*

Por meio deste trabalho objetivou-se avaliar os aspectos clínicos e histopatológicos do miocárdio de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral.

3.2. *Objetivos Específicos*

- Comparar possíveis alterações ao exame físico geral dos cães com LV e saudáveis.
- Comparar possíveis alterações eletrocardiográficas de ritmo, de frequência cardíaca, duração e amplitude das ondas P, complexos QRS, ondas T, duração dos intervalos PR e QT, nivelamento de ST e eixos cardíacos médios de cães com LV e saudáveis.
- Comparar possíveis alterações radiográficas qualitativas e quantitativas cardíacas, visibilizadas em radiografias torácicas nas projeções lateral e ventrodorsal, em inspiração completa, de cães com LV e saudáveis.
- Comparar alterações no hemograma e possíveis aumentos de biomarcadores de lesão miocárdica como a fração MB da creatina quinase (CK-MB) e troponina I, além da dosagem da atividade sérica creatina quinase (CK) de cães com LV e saudáveis.
- Verificar possíveis alterações histológicas no miocárdio de cães com LV.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no manuscrito a seguir. O manuscrito está formatado de acordo com as normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira, ao qual será submetido.

ARTIGO CIENTÍFICO

ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA MIOCARDITE ASSOCIADA À INFECÇÃO NATURAL POR LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES¹

Fernanda P. dos Santos², João P.E. Pascon³, Maria L.A. Mistieri³, Deyverson T.P.Pereira³, Bruno L. Anjos, Ílson D. Silveira⁴, Marcelo L. Porciuncula⁵

ABSTRACT

Santos F.P., Pascon J.P.E., Mistieri M.L.A., Pereira D.T.P., Anjos B.L., Silveira I.D. & Porciuncula M.L. 2013 [**Clinical and pathological features of myocardial dogs with visceral leishmaniasis**] Aspectos clínicos e histopatológicos da miocardite associada à infecção natural por LV em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Uruguaiiana, BR472 km 592, Uruguaiiana, RS, 97500-970, Brasil. E-mail: auferporcela@hotmail.com.

Visceral leishmaniasis (VL) is a worldwide parasite zoonotic, caused by a protozoa *Leishmania sp.* Several organic systems may be affected directly or indirectly by the parasitism, resulting in variable and unspecific clinical signs in dogs. Myocardial damage in affected dogs is showed by reports with histological evidences of myocarditis. Therefore, the aim of this study was evaluate the clinical and myocardial histopathologic features of naturally infected dogs with VL. Therefore, general physical characteristics, hematological, biochemical (creatinine kinase- CK, MB fraction of creatine kinase and troponin-I) radiographic of the thorax, electrocardiographic and histopathological myocardial were evaluated in 36 dogs with VL (VL group- VLG) and average variables compared to 15 healthy dogs (control group-CG), except for the histopathological evaluation. In the general physical examination was observed just asymptomatic dogs in the control group (100%) and higher prevalence of polysymptomatic in GLV (66%). Two dogs of the GLV presented systolic murmur of intensity

¹ Recebido em _____

Aceito para publicação em _____

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Uruguaiiana, BR472 km 592, Uruguaiiana, RS, 97500-970, Brasil.* Autor para correspondência:

³ Curso de Medicina Veterinária, UNIPAMPA - Campus Uruguaiiana, BR472 km 592, Uruguaiiana, RS, 97500-970, Brasil.

⁴ Biosul Análises Clínicas, Rua Treze de Maio 2379, Uruguaiiana, RS, 97500-600, Brasil.

⁵ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brasil.

II / VI and III / VI, in the region of the mitral valve. The mean values of erythrocyte count, haemoglobin and haematocrit were lower in dogs GLV ($p < 0.0001$), associated with higher total protein ($p < 0.0001$), total leukocyte count ($p = 0.0151$), neutrophils ($p = 0.0027$), CK ($p = 0.0153$) and CK-MB ($p = 0.0038$) when compared to CG. Radiographic evaluation reveal no alterations or differences between groups ($p = 0.1228$). In the electrocardiography analysis, higher incidence of respiratory sinus arrhythmia associated sinus arrest in dogs of GLV (75%) and sinus rhythm in the CG (60%) was attested by the proportions test ($p = 0.016$). The mean P wave amplitude was lower in GLV ($p = 0.008$). The histopathology of the myocardium displayed mononuclear cell infiltration in 77.8% ($n = 28$) of the GLV dogs, with higher prevalence of mild lymphohistioplasmocytic inflammatory infiltrate. We conclude that enrolled dogs with LV presented aspect of polysymptomatic clinical features, associated with normochromic normocytic anemia, followed by leukocytosis, neutrophilia, hyperproteinemia, elevation of serum activity of CK and CK-MB, without significant changes of the cardiac silhouette in the radiography or heart rhythm by electrocardiogram, related to the presence of multifocal mild intensity mononuclear cell infiltration in the myocardial, with low incidence of necrotizing vasculitis and rare detection of amastigotes forms of *Leishmania* sp. on myocardium histopatology.

Key-Works: biomarkers of miocardial injury, cardiology, canine, zoonosis

RESUMO - [Aspectos clínicos e histopatológicos da miocardite associada à infecção natural por leishmaniose visceral em cães]

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose parasitária com distribuição cosmopolita, causada pelo protozoário *Leishmania spp.* Diversos sistemas orgânicos podem ser afetados diretamente ou indiretamente pelo parasitismo, resultando em aspectos clínicos variáveis e inespecíficos em cães. Estudos com indícios histológicos de acometimento miocárdico em cães com LV demonstram comprometimento deste sistema. Desta forma, objetivou-se com o presente estudo, avaliar os aspectos clínicos e histopatológicos do miocárdio de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral. Para tanto, as características físicas gerais, hematimétricas, bioquímicas (creatinina quinase-CK, fração MB da creatina quinase-CK-MB- e troponina I), radiográficas do tórax, eletrocardiográficas e avaliações histopatológicas do miocárdio foram avaliadas em 36 cães com LV (grupo LV - GLV) e comparadas às variáveis médias de 15 cães hígidos (grupo controle- GC), com exceção da

avaliação histopatológica realizada apenas nos cães portadores de LV. Ao exame físico geral observou-se maior prevalência de cães assintomáticos no GC (100%) e polissintomáticos no GLV (66%). Dois cães do GLV apresentaram sopro sistólico de intensidade II/VI e III/VI, em região de foco mitral. Os valores médios de hemácia, hemoglobina e hematócrito foram inferiores nos cães do GLV ($p < 0,0001$), associados a maiores valores de proteína total ($p < 0,0001$), leucócitos totais ($p = 0,0151$), neutrófilos ($p = 0,0027$), CK ($p = 0,0153$) e CK-MB ($p = 0,0038$) quando comparado ao GC. Não foram observadas alterações radiográficas ou diferença de VHS entre os grupos avaliados ($p = 0,1228$). À eletrocardiografia foi detectada maior incidência de arritmia sinusal respiratória associada à marcapasso migratório e *sinus arrest* nos cães do GLV (75%) e ritmo sinusal nos cães do GC (60%), atestado pelo teste das proporções ($p = 0,016$). A amplitude média da onda P foi inferior no GLV ($p = 0,008$). A luz da histopatologia do miocárdio foi possível observar a presença de infiltrado inflamatório mononuclear em 77,8% ($n = 28$) dos cães do GLV, sendo a maior prevalência de infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário de intensidade leve. Conclui-se que os cães com LV do presente estudo apresentaram prevalência de aspectos clínicos polissintomáticos, associados à anemia normocítica normocrômica, acompanhada de leucocitose por neutrofilia e hiperproteinemia, elevação da atividade sérica de CK e CK-MB, sem alterações significativas da silhueta cardíaca à radiografia ou do ritmo cardíaco ao eletrocardiograma, relacionados à presença de infiltrado inflamatório mononuclear multifocal leve à histopatologia do miocárdio, com baixa incidência de vasculite necrosante e rara detecção de formas amastigotas da *Leishmania* sp.

Palavras-chave: biomarcadores de lesão miocárdica, cardiologia, caninos, zoonose.

4.1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose parasitária causada pelo protozoário flagelado *Leishmania sp.* (Fortes 2004). No Brasil, a doença é considerada endêmica em 21 estados da federação (Ministério da Saúde 2006), abrangendo boa parte do território nacional. Sua transmissão é realizada pela picada do inseto denominado flebotomídeo, pertencentes ao gênero *Lutzomyia sp.*, considerado hospedeiro intermediário (Gontijo e Melo 2004, Monteiro et al. 2005). Adaptado a diversos hospedeiros definitivos, o parasita é capaz de infectar seres humanos, felinos, roedores, caninos e outros mamíferos, contudo, apenas os canídeos são considerados hospedeiros naturais e principal reservatório da doença (Monteiro et al. 2005, Xavier et al. 2006).

Em cães, a LV apresenta características clínicas inespecíficas e variáveis, resultando em portadores assintomáticos, oligossintomáticos ou polissintomáticos, uma vez que um ou mais órgãos ou sistemas podem ser afetados (Mancianti et al. 1988). Lesões miocárdicas histológicas foram demonstradas em cães com LV, como degeneração e necrose de cardiomiócitos, no entanto, seus efeitos clínicos permanecem ainda obscuros.

Avaliações *post-mortem* de 30 cães naturalmente infectados com LV evidenciaram miocardite linfoplasmocitária e necrose de coagulação em cardiomiócitos em 27 e 24 cães, respectivamente (Rosa et al. 2013). De maneira semelhante, relatos isolados de cães com esta enfermidade descreveram a ocorrência de miocardite, vasculite necrosante e pericardite, caracterizados por infiltrado inflamatório do tipo mononuclear, juntamente com degeneração e necrose das fibras cardíacas (Silva et al. 2009, Alves et al. 2010). No entanto, não foram verificadas alterações eletrocardiográficas relevantes associadas a estas lesões histopatológicas. Entretanto, estudo *in vivo* avaliando 105 cães naturalmente infectados com LV, demonstraram a ocorrência de sinus arrest em 14,3% dos animais estudados, complexos atriais prematuros em 4,8% e bloqueio de ramo direito em 4,8% dos cães. Em relato de um cão com esta enfermidade, Lopez-Peña et al. (2009) observaram diminuição da amplitude do complexo QRS, associado à atrofia e degeneração de cardiomiócitos. Por sua vez, bloqueio atrioventricular de primeiro-grau e infradesnivelamento do segmento ST foram descritos em um cão com LV, associados à presença de miocardite e poliarterite necrosante no átrio direito (Torrent et al. 2005). Da mesma forma, maior atividade sérica dos biomarcadores de lesão miocárdica creatina quinase (CK), fração MB da creatina quinase (CK-MB) (Medeiros et al. 2011) e concentração sérica de troponina I (cTnI) (Silvestrini et al. 2012), foram detectadas

em cães com LV. Tais relatos ressaltam a importância da realização de estudos controlados para investigar a ocorrência destes efeitos em cães infectados, além de verificar a relação entre estas alterações.

Desta forma, cientes das possíveis alterações cardiovasculares que podem decorrer da infecção, objetivou-se por meio deste estudo comparar os achados do exame físico geral, hematologia, bioquímica sérica (CK, CK-MB e cTnI), radiografia torácica, eletrocardiografia e histopatologia do miocárdio de cães com infecção natural por *Leishmania sp* (grupo leishmaniose visceral) e sem infecção (grupo controle).

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 51 cães provenientes da casuística do Hospital Universitário Veterinário (HUVet) – Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)-Campus Uruguiana, autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da instituição (protocolo 016/2012). Todos os animais foram submetidos ao diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, pelos métodos de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático - ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), sendo considerados soropositivos quando apresentarem titulação igual ou superior a 1:40 para o RIFI e reatividade para o teste ELISA. Desta forma, o grupo controle (GC) foi formado por 15 cães hígidos soronegativos para LVC, sendo destes 5 machos e 10 fêmeas, de raças variadas (Sem raça definida, Doberman Pinscher, Cão Boiadeiro Australiano, Boxer, Labrador Retriever), com idade entre um e oito anos e peso corporal médio de $18,31 \pm 10,07$ kg. O grupo leishmaniose visceral (GLV) foi composto por 36 cães soropositivos para LV (infecção natural), sendo 22 machos e 14 fêmeas, de raças variadas (Sem raça definida, Labrador Retriever, Daschund, Cão Boiadeiro Australiano), com idade entre um e sete anos e peso corporal médio de $15,25 \pm 8,047$ kg.

Todos os cães do presente estudo foram submetidos a exame físico geral, hematimétrico, bioquímico sérico (CK, CK-MB e cTnI), radiográfico torácico e eletrocardiográfico, sendo que suas médias foram comparadas entre os grupos GC e GLV. Apenas os cães do GLV foram submetidos à avaliação histopatológica *post mortem* do miocárdio. Ao exame físico, os animais foram classificados quanto aos sinais clínicos apresentados em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos, conforme descrito por Mancianti et al. (1988).

Amostras sanguíneas foram coletadas para avaliação hematimétrica e bioquímico-sérica, sendo a hematimetria e dosagem de proteínas plasmáticas totais (PPT) mensuradas conforme descrito por Rebar (2003). A CK, CK-MB e cTnI foram mensurados em amostras séricas obtidas pela centrifugação do sangue total sem anticoagulante a 3000rpm, durante três minutos. A atividade sérica das enzimas CK e CK-MB foi mensurada pelo método cinético enzimático, por meio de espectrofotômetro de absorvância, com kit comercial CK-NAC Liquiform e CK-MB Liquiform (Labtest Diagnóstica SA, Belo Horizonte, Minas gerais), respectivamente, sendo que estas enzimas foram avaliadas em laboratórios distintos. Por sua vez, utilizou-se o método imunocromatográfico com kit comercial Troponina I - K085 (Bioclin, Belo Horizonte, Minas gerais, Brasil) para mensuração da cTnI.

A silhueta cardíaca foi avaliada por meio da radiografia da região torácica, nas projeções lateral direita e ventrodorsal. Na projeção lateral, a silhueta cardíaca foi mensurada em seu eixo transversal e eixo longitudinal, para obtenção da escala vertebral cardíaca segundo Buchanan & Bücheler (1995). De forma complementar, os padrões radiográficos de aumento das câmaras cardíacas atriais e ventriculares foram avaliadas qualitativamente nas duas projeções radiográficas estudadas (Ware 2006).

O exame eletrocardiográfico foi realizado no plano frontal com os animais em decúbito lateral direito, membros paralelos entre si e perpendiculares ao tronco, sem utilização de fármacos sedativos ou anestésicos, por meio de eletrocardiógrafo computadorizado digital (Módulo ECG digital Micromed®, Brasília, Distrito Federal). Eletrodos tipo jacaré foram fixados sobre a pele umedecida com álcool, para registro das derivações de membros bipolares I, II e III, e unipolares, aVF, aVL e aVR (Tilley 1992). Posteriormente, os eletrocardiogramas gerados foram analisados e a mensuração das ondas, segmentos e intervalos realizada na derivação II, sensibilidade 1cm=1mV e velocidade 25mm/s em software apropriado (Wincardio Micromed, Brasília, Distrito Federal). As variáveis eletrocardiográficas estudadas foram ritmo, frequência cardíaca, duração e amplitude das ondas P e do complexo QRS, duração do intervalo PR e QT, eixo elétrico médio e avaliação do nivelamento do segmento ST.

Os cães do GLV foram submetidos à eutanásia de acordo com os princípios éticos e legais, conforme previsto no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Departamento de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde 2006). Nestes cães, realizou-se avaliação histopatológica de fragmentos do miocárdio fixados em formol a 10%, incorporadas em parafina, seccionadas a 5µm e coradas com coloração de

hematoxilina-eosina (HE). Três regiões histológicas padronizadas foram analisadas em todos os cães do GLV, possibilitando avaliação dos átrios e ventrículos, denominadas região 1 (corte longitudinal da parede livre do coração esquerdo, abrangendo porção do átrio e ventrículo esquerdo) (Figuras 2A e 2E), região 2 (corte longitudinal da parede livre do coração direito, abrangendo porção do átrio e ventrículo direito) (Figuras 2B e 2D) e região 3 (corte transversal em “T”, englobando ventrículo esquerdo, ventrículo direito e septo interventricular) (Figuras 2C e 2F).

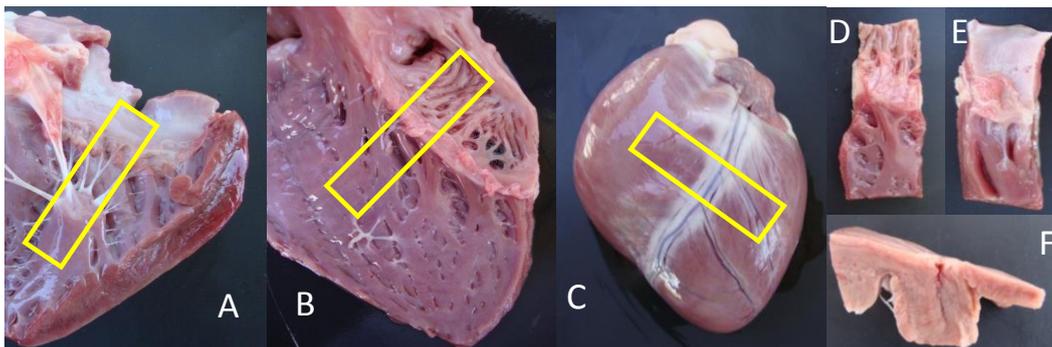


Figura 2- Fotografia ilustrativa dos locais onde se coletou os fragmentos para avaliação histopatológica. A, parede livre do coração esquerdo demonstrando a região 1. B, parede livre do coração direito demonstrando a região 2. C, coração de cão demonstrando a região 3. D, região 2. E, região 1. F, região 3.

Para a avaliação qualitativa das regiões histológicas foram considerados a integridade das fibras musculares cardíacas, além da presença ou ausência de infiltrado inflamatório e da *Leishmania sp.* intra-lesional. A severidade da lesão foi classificada em 5 graus, variando de discreto a acentuado, conforme descrito por Alves et al. (2010).

As variáveis eletrocardiográficas, radiográficas quantitativas, hematimétricas e bioquímico séricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e suas médias comparadas entre os GC e GLV pelo teste *t*-Student ao nível de significância de 5% (Graphpad Prism[®] v.5, GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia). O teste das proporções ($p < 0,05$) foi utilizado para comparar a porcentagem dos ritmos cardíacos entre os grupos GC e GLV (Minitab[®] v.15, Minitab Inc., State College, Pensilvânia). As alterações histopatológicas foram descritas em porcentagem de ocorrência e sua severidade correlacionada aos biomarcadores de lesão miocárdica pelo teste de Pearson (r) (Graphpad Prism[®] v.5, GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia).

4.3. RESULTADOS

Durante a avaliação física, 100% (n=15) dos cães do GC e 8,3% (n=3) dos cães do GLV foram classificados como assintomáticos (Figura 3), enquanto 66,6% (n=24) dos cães do GLV foram classificados como polissintomáticos e 25% (n=9) como oligossintomáticos. Dentre os sinais clínicos observados, os relacionados ao sistema tegumentar (83,3%, n=30), em especial a seborreia seca (69,7%, n=23) e linfadenomegalia (96,9%, n=32) foram os mais frequentes (Quadro 1) (Figura 4). Apenas duas cadelas do GLV, SRD, pesando 15,1kg e 6,1kg, com idade superior a seis anos, apresentaram sopro sistólico em foco mitral, grau II/VI e III/VI, respectivamente.



Figura 3- Fotografia de cão hígado, fêmea, SRD, pertencente ao GC.



Figura 4- Fotografias de cães pertencentes ao GLV. A, cão polissintomático apresentando áreas alopécicas nos membros torácicos e pélvicos, onicogrifose, lesões crostosas e úlcera cutânea em base de orelha. B, cão com hiperqueratose no focinho e alopecia periorbital. C, cão com alterações dermatológicas como alopecia periorbital e úlcera cutânea em base de orelha. D, onicogrifose. E, cão com áreas de hipotricose e seborreia seca.

Quadro 1. Porcentagem de ocorrência das alterações clínicas observadas nos animais sintomáticos do GLV.

Alterações clínicas	n	GLV (%)
Linfadenomegalia generalizada	32	96,9
Seborreia seca	23	69,7
Úlceras e crostas cutâneas	21	63,6
Onicogribose	19	57,6
Secreção ocular mucopurulenta	19	57,6
Hipotricose	15	45,5
Alopecia	12	36,4
Hiperqueratose	9	27,3
Desidratação moderada	7	21,2
Palidez de mucosa	7	21,2
Desidratação leve	5	15,1

Na avaliação hematimétrica, os cães do GLV apresentaram valores médios inferiores ($p > 0,05$) de hematócrito, hemoglobina e número total de hemácias quando comparados ao GC. No entanto, os valores médios de proteína plasmática total (PPT), leucócitos totais e neutrófilos foram superiores no GLV quando comparados ao GC (Quadro 2).

Com relação à bioquímica sérica, a atividade sérica das enzimas CK e CK-MB foi superior nos cães do GLV quando comparados aos valores do GC (Quadro 2). A concentração sérica da cTnI foi inferior ao limite mínimo mensurável neste estudo ($0,200\text{ng/mL}$), em todos os cães avaliados, há exceção de quatro cães do GLV ($0,2474 \pm 0,1524\text{ng/mL}$), impedindo a comparação entre os grupos.

Quadro 2. Média e desvio-padrão das variáveis hematológicas e bioquímicas avaliadas, nos animais do grupo leishmaniose visceral (GLV) e no grupo controle (GC).

Variáveis hematológicas	GLV (n=36)	GC (n=15)	P
Hematócrito (%)	25,36±7,337	43,40±3,906	<0,0001
Hemoglobina (g/dl)	8,419±2,446	14,43±1,292	<0,0001
Hemácias (µL)	3,821±1,084	6,434±0,8695	<0,0001
VCM (fL)	66,32±7,224	68,11±8,057	0,4369
CHCM (%)	33,16±0,1317	33,43±1,793	0,3640
PPT (g/dl)	10,33±1,396	8,293±0,5898	<0,0001
Leucócitos totais (µL)	19150±12140	10910±5306	0,0151
Neutrófilos (µL)	14920±9848	6694±2992	0,0027
Linfócitos (µL)	1879±1730	1799±950,7	0,8681
Monócitos (µL)	1540±1363	907,7±610,7	0,0930
Eosinófilos (µL)	992,7±1353	1257±2247	0,6250
CK (U/L)	128,2±59,26	80,79±66,49	0,0153
CK-MB (U/L)	450,9±318,8	196,1±75,73	0,0038

%= porcentagem, g/dl= gramas por decilitro, µL= microlitros, fL= femtolitros, VCM= volume corpuscular médio, CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT= proteína plasmática total, U/L= unidades por litro.

Não foram observadas diferenças radiográficas na escala vertebral cardíaca média ($p=0,1228$) entre os grupos GC ($10,13 \pm 0,67$ vertebras) e GLV ($9,76 \pm 0,78$ vértebras) (Figura 5). Da mesma forma, não foram observadas alterações na silhueta cardíaca que sugerissem aumento qualitativo das câmaras cardíacas, em ambos os grupos estudados.

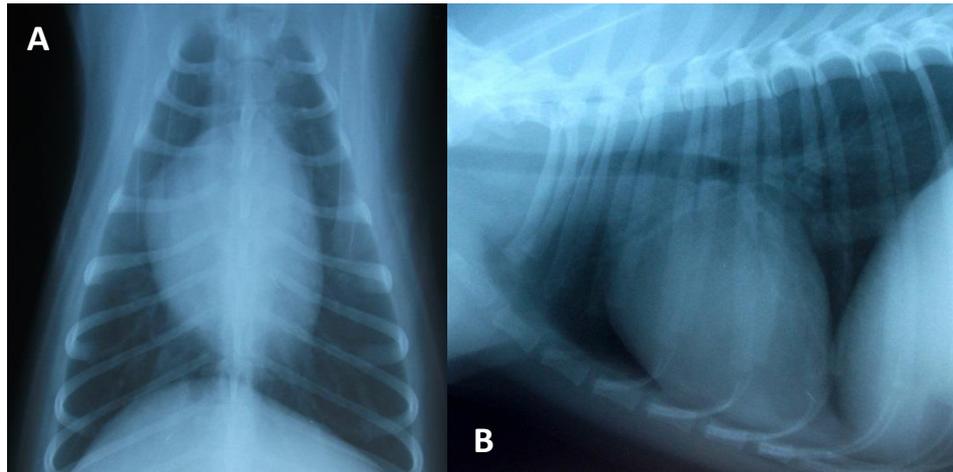


Figura 5- Fotografias de radiografias torácicas de cão do GLV. A, radiografia torácica em projeção ventro-dorsal. B, radiografia torácica em projeção latero-lateral.

Com relação à eletrocardiografia, não foram observadas arritmias cardíacas em ambos os grupos avaliados. Entretanto, os cães do GLV apresentaram maior prevalência (75%, n=27) de arritmia sinusal respiratória (ASR) quando comparadas ao GC (40%, n=6), atestada pelo teste das proporções ($p=0,016$). Por sua vez, maior prevalência de ritmo sinusal foi observada no GC (60%, n=9) em relação ao GLV (25%, n=9) ($p=0,016$). Episódios isolados de parada ou bloqueio sinusal (*sinus arrest*) (Figura 6) e marcapasso migratório, associados à ASR, foram detectados, respectivamente, em três e dois cães do GLV. A amplitude média da onda P foi inferior no GLV em relação ao GC ($p=0,008$), conforme demonstrado no Quadro 3.



Figura 6- Traçado eletrocardiográfico evidenciando parada ou bloqueio sinusal em cão do GLV em derivação II.

Quadro 3. Média e desvio-padrão das variáveis eletrocardiográficas avaliadas nos animais dos grupos leishmaniose visceral (GLV) e controle (GC).

Variáveis eletrocardiográficas	GLV	GC	P
Onda P (s)	0,037 ± 0,004	0,038 ± 0,003	0,7943
Onda P (mV)	0,152±0,060	0,202 ± 0,050	0,0080
Intervalo PR (s)	0,111 ± 0,110	0,091 ± 0,015	0,4962
Complexo QRS (s)	0,053 ± 0,004	0,053 ± 0,004	0,9839
Complexo QRS (mV)	1,46 ± 0,469	1,62 ± 0,651	0,3478
Intervalo QT (s)	0,193 ± 0,023	0,205 ± 0,022	0,1257
EEM (°)	+69,53 ± 17,690	+71,53 ± 17,800	0,7142
Frequência cardíaca (bpm)	123,3 ± 18,670	117,7 ± 24,120	0,3723

s= segundos, mV= milivoltagem, EEM= eixo elétrico médio, bpm= batimentos por minuto.

Com relação à avaliação histopatológica do miocárdio dos cães do GLV verificou-se ausência de lesão em 22,2% (n=8) e presença de infiltrado inflamatório mononuclear (Figuras 4 a 8) em 77,8% (n=28), sendo a maior prevalência de infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário de intensidade leve (Quadro 4, Figuras 7A e 7B). Dos 28 animais acometidos, 85,7% (n=24) apresentaram infiltrado inflamatório no miocárdio, 39,3% (n=11) no epicárdio e 14,3% (n=4) no endocárdio. A distribuição destas lesões variou entre focal (25%, n=7) (Figuras 7 e 8), focalmente extensa (10,7%, n=3) (Figura 10) ou multifocal (64,3%, n=18) (Figura 9A). Além do infiltrado inflamatório, fibrose miocárdica focal leve (Figura 12) e vasculite necrosante (Figura 13) subepicárdica foram detectadas em dois e quatro cães, respectivamente, porém, não foram observadas alterações histopatológicas compatíveis com degeneração ou necrose miocárdica. A presença intracitoplasmática da forma amastigota da *Leishmania sp* foi confirmada em apenas um animal (Figura 11). Não houve correlação entre a intensidade das lesões histológicas e a concentração sérica da CK-MB ($r= 0,2321$, $\text{slope}=80.77 \pm 66.40$).

Quadro 4. Porcentagem de ocorrência de lesão histopatológica no miocárdio de cães do GLV, classificado quanto à característica do infiltrado inflamatório e sua intensidade.

Característica do infiltrado inflamatório	Intensidade do infiltrado inflamatório (%)						Total
	Discreto	Leve	Moderado	Moderado à acentuado	Acentuado	Sem alteração	
Linfoistioplasmocitário	13,9	27,8	5,5	2,8	-	-	50
Linfoistiocitário	2,8	-	-	-	-	-	2,8
Linfoplasmocitário	11,1	8,3	-	-	-	-	19,4
Misto	-	2,8	-	-	-	-	2,8
Plasmocitário	2,8	-	-	-	-	-	2,8
Sem infiltrado inflamatório	-	-	-	-	-	22,2	22,2
Total	30,6	38,9	5,5	2,8	0	22,2	100

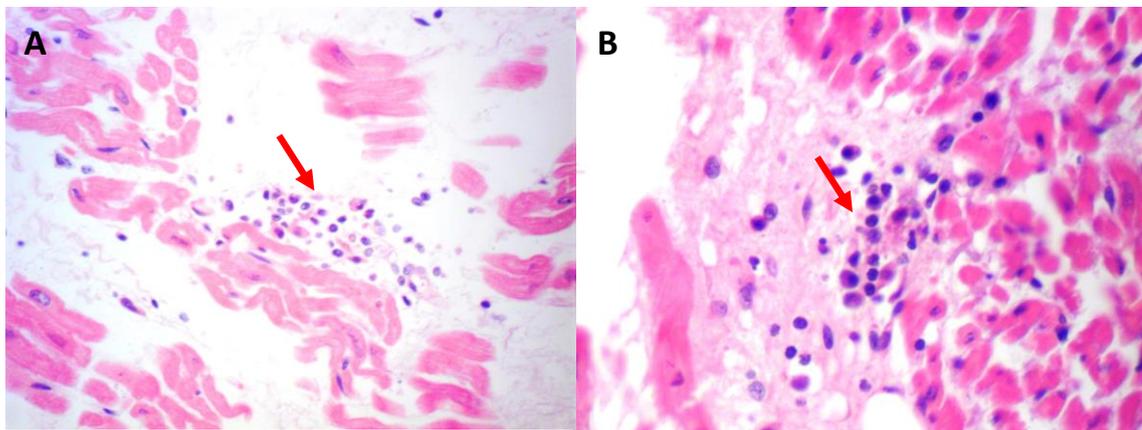


Figura 7- Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV naturalmente infectado. A, infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário focal discreto. HE, x20. B, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focal discreto. HE, x40.

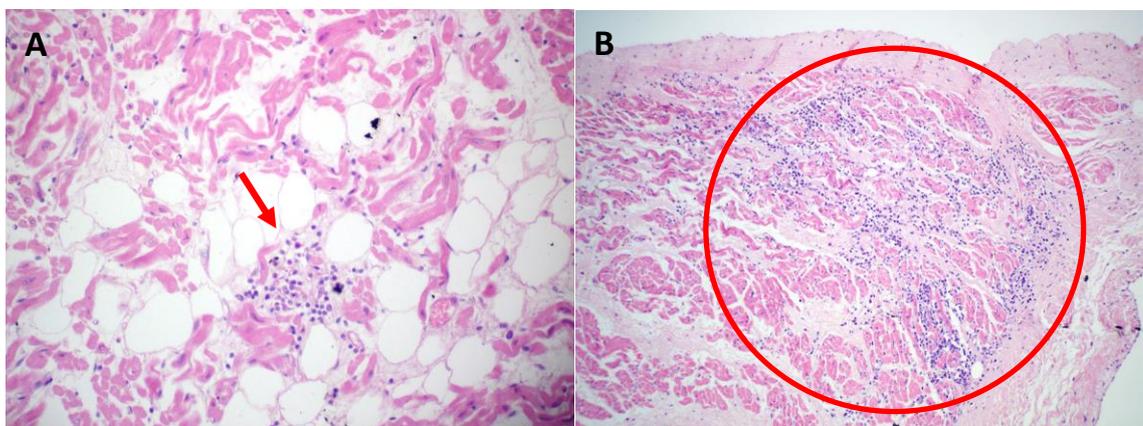


Figura 8- Fotomicrografias do miocárdio de cão com LV naturalmente infectado. A, infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário focal leve (seta). HE, x20. B, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focal leve (círculo). HE, x10.

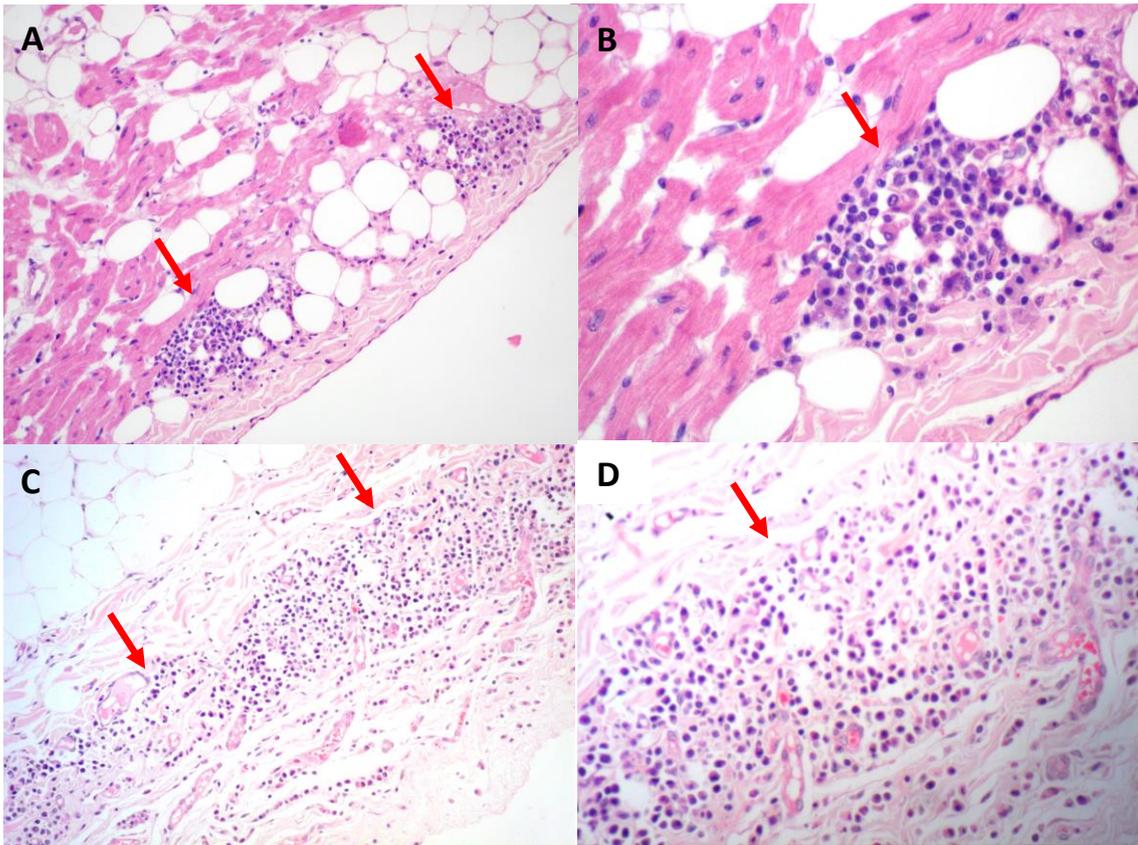


Figura 9- Fotomicrografias do miocárdio de cães com LV naturalmente infectados. A, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário multifocal moderado subepicárdico (seta). HE, x20. B, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focal moderado subepicárdico (seta). HE, x40. C, infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário focal moderado subepicárdico (seta). HE, x20. D, infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário focal moderado subepicárdico (seta). HE, x40.

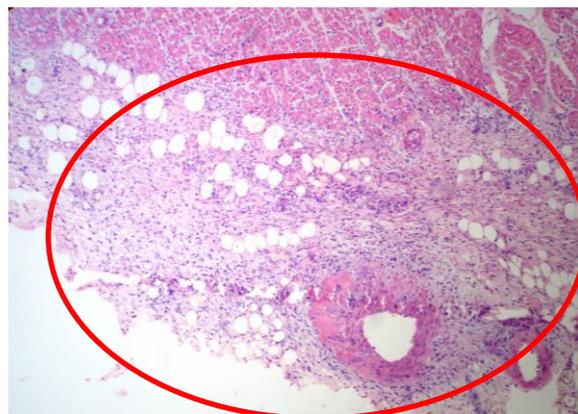


Figura 10- Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV naturalmente infectado, demonstrando infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focalmente extenso moderado à acentuado (círculo). HE, x10.

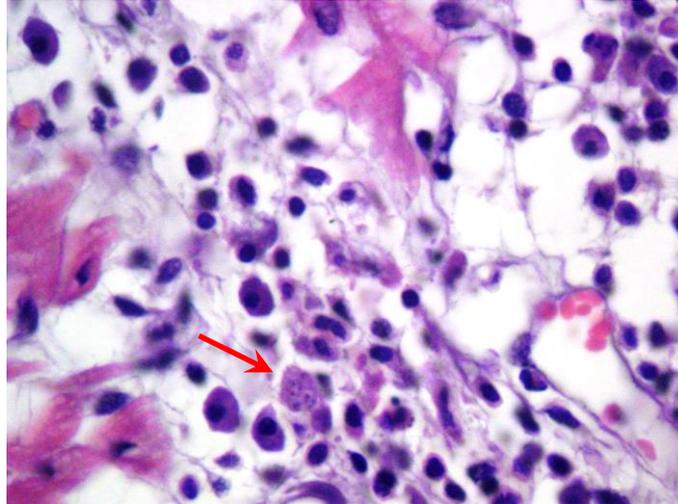


Figura 11- Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV naturalmente infectado demonstrando a presença de estruturas esféricas basofílicas (seta) no citoplasma de um macrófago, compatíveis com formas amastigotas de *Leishmania sp.*



Figura 12- Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV demonstrando a presença de fibrose focal (seta). HE, x10.

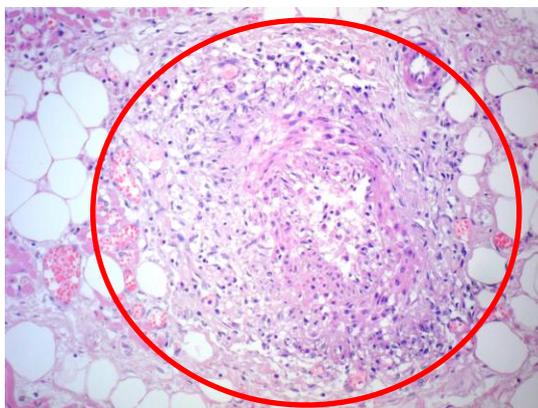


Figura 13- Fotomicrografia do miocárdio de cão com LV naturalmente infectado evidenciando a presença de vasculite necrosante (círculo). HE, x20.

4.4. DISCUSSÃO

No presente estudo, o GLV apresentou maior prevalência de cães polissintomáticos e oligossintomáticos, divergindo das informações de Barcelos (2009), na qual 57,1% (n=16) dos cães com LV, provenientes da região do Rio de Janeiro foram classificados como assintomáticos. Entretanto, inquérito sorológico da região de Mato Grosso demonstrou que 17,1% (n=7) dos cães com LV eram oligossintomáticos e 73,2% (n=30) eram polissintomáticos, a semelhança dos resultados aqui descritos (Barcelos 2009). Da mesma forma, Sonoda (2007) em estudo retrospectivo, verificou maior ocorrência de cães oligossintomáticos (50%) e polissintomáticos (47,2%). As diferenças observadas podem estar relacionadas à espécie de *Leishmania* envolvida, à imunidade do hospedeiro, bem como à interação hospedeiro-parasita (Mancianti et al. 1988). Ainda assim, possivelmente a população canina avaliada no presente estudo possa ter influenciado neste resultado, por acreditar que os cães assintomáticos tenham menor participação da rotina hospitalar. Dentre os achados clínicos dos cães do GLV do presente estudo, a linfadenomegalia e sinais tegumentares foram mais prevalentes, assim como também relatado por Ciaramella et al. (1997), Costa-Val et al. (2007), Sonoda (2007), Larangeira (2008) e Alves et al. (2010).

Dois cães do GLV apresentaram sopro sistólico em região de foco mitral, grau II/VI e III/VI a semelhança do observado por Diamantino (2010) em seres humanos com LV. Ainda que o sopro cardíaco seja um sinal clínico inespecífico, ainda não associado à LV em cães (Torrent et al. 2005, Lopez-Peña et al. 2009, Silvestrini et al. 2012, Sousa et al. 2013), Diamantino (2010), descreveu sopro sistólico em 35,9% (n=28) de seres humanos afetados, a semelhança do presente estudo.

A semelhança do observado no presente estudo, diversos autores verificaram em cães com LV (Pumarola et al. 1991, Torrent et al. 2005, Costa-Val et al. 2007, Dias 2008, Lopez-Peña et al. 2009, Alves et al. 2010) e em seres humanos portadores de LV (Diamantino 2010) a ocorrência de anemia normocítica normocrômica. Embora o mecanismo celular da anemia não tenha sido investigado, pesquisas indicam que a anemia nestes casos pode ter origem na supressão medular óssea da produção eritrocitária ocasionada pelo parasita (Costa-Val et al. 2007), bem como na redução da instabilidade da membrana eritrocitária resultando em sequestro mecânico de hemácias pelo baço (Luna et al. 2000).

Em relação ao leucograma, verificou-se leucocitose com neutrofilia nos cães do GLV, no entanto, Costa-Val et al. (2007) observaram contagem normal de leucócitos em 69%

(n=29) dos cães com LV, seguido de apenas 21,5% (n=9) de cães com leucocitose com neutrofilia e 9,5% (n=4) com leucopenia. Em seres humanos com LV, Diamantino (2010) verificou leucopenia em 70,5%, sendo que 6,9% destes pacientes apresentaram neutropenia. Avaliando-se a contagem de proteínas plasmáticas totais, estudos demonstram que cães com LV apresentam hiperproteinemia (Torrent et al. 2005, Silvestrini et al. 2012) devido a hiperglobulinemia (Castro et al. 2012, Freitas et al. 2012), fato este que ocorre devido ao aumento dos linfócitos B policlonais durante a infecção (Reis et al. 2009, Coura-Vital et al. 2011), de forma semelhante sugere-se que no presente estudo a hiperproteinemia observada nos cães do GLV avaliados seja decorrente desta alteração.

De forma semelhante ao verificado neste estudo, Medeiros et al. (2011) descreveram maior atividade sérica das enzimas CK e CK-MB em cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* Por sua vez, estudo em seres humanos portadores de LV não evidenciou aumento deste biomarcador cardíaco (Diamantino 2010). Porém, relatos de cães com danos miocárdicos provocados por causas diversas como trauma cardíaco (Diniz, Schwartz & Collicchio-Zuanaze 2007) e intoxicação experimental com bufotoxina (Camplesi et al. 2009) ocasionam níveis altos de CK-MB corroborando com os presentes achados. No entanto, os valores séricos médios de CK-MB foram superiores aos valores médios de CK total em ambos os grupos avaliados, sendo esta alteração atribuída à mensuração da atividade sérica dessas enzimas ter sido realizada em laboratórios distintos, o que proporcionou divergência na técnica empregada, principalmente com relação ao tempo de desnaturação de proteínas empregado, impossibilitando a comparação entre elas. Contudo, ressalta-se que houve diferença significativa de CK-MB entre os GC e GLV, demonstrando lesão miocárdica, visto que esta isoenzima indica lesão de cardiomiócitos promovida por hipóxia e/ou necrose (Yonezawa et al. 2009, Santos et al. 2011). Entretanto, no presente estudo, não foram encontrados achados histopatológicos indicativos de necrose miocárdica nas regiões avaliadas, sugerindo que a hipóxia miocárdica ou necrose em regiões não avaliadas sejam responsáveis pela elevação da atividade sérica deste biomarcador cardíaco.

A cTnI é um indicador específico de necrose miocárdica (Diniz, Schwartz & Collicchio-Zuanaze 2007, Yonezawa et al. 2009) com valores de normalidade para cães saudáveis variando de 0,02ng/mL (Sleeper, Clifford & Laster 2001), 0,03 ng/mL (Oyama & Solter 2004) a <0,05ng/mL (Adin et al. 2005). Ainda que elevação desta variável já tenha sido observada em cães com LV (Silvestrini et al. 2012), no entanto, não foi possível compará-la entre os cães do GC e GLV do presente estudo, uma vez que a sensibilidade de detecção deste

biomarcador pelo método empregado foi baixa e apenas quatro cães apresentaram valores superiores ($0,2474 \pm 0,1524$ ng/mL) aos mensuráveis pelo kit utilizado ($>0,200$ ng/mL)

A avaliação radiográfica não evidenciou divergências entre os cães do GC e GLV, sendo que os achados sugerem a não influência da doença sobre esta avaliação diagnóstica por imagem. Ainda que não tenham sido encontrados estudos semelhantes em cães, resultados análogos também foram obtidos em seres humanos naturalmente infectados (Diamantino 2010).

No presente estudo, não foram observadas arritmias ou distúrbios de condução elétrica do coração, com exceção de três (8,3%) cães do GLV que apresentaram episódios de parada ou bloqueio sinusal (*sinus arrest*). Da mesma forma, Sousa et al. 2013 verificaram a ocorrência de *sinus arrest* em 14,3% dos cães com LV, bem como observaram bloqueio de ramo direito e batimentos atriais prematuros em 4,8% dos cães. De maneira semelhante, um relato isolado de miocardite atrial sem origem determinada detectou a presença *sinus arrest* em um cão (Woolley 2007). O bloqueio sinusal, muitas vezes, é considerado ritmo cardíaco normal, porém é associado a outras causas, como ao aumento do tônus vagal, ao desequilíbrio eletrolítico, a neoplasias cervicais e patologias do átrio (Tilley 1992). Apesar da causa não ter sido investigada, Rosa et.al. (2013) relatam que o *sinus arrest* é atribuído à miocardite crônica, hemorragia miocárdica no átrio e fibrose adjacente ao nodo sinusal. Outras alterações na condução do impulso elétrico cardíaco já foram descritas em um cão naturalmente infectado com LV como bloqueio atrioventricular de primeiro grau (Torrent et.al. 2005). Ainda que a diminuição de amplitude da onda P não tenha sido descrita em cães com LV, Lopez-Peña et al. (2009) observou supressão de onda R, enquanto Sousa et al. (2013) descreveu maior duração da onda P e complexo QRS.

Assim como observado nos cães deste ensaio experimental, Alves et al.(2010), Lopez-Peña et al. (2009) e Silva et al.(2009) também observaram maior prevalência de infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário. Porém, Rosa et al. (2013) ao avaliarem 30 cães com LV verificaram maior prevalência de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, totalizando 89,9% dos casos, contudo este mesmo estudo verificou a ocorrência de infiltrado inflamatório leve em 73,3 a 86,7% dos cães estudados, sendo o átrio direito a região mais acometida. No entanto, outros estudos observaram maior intensidade destes infiltrados inflamatórios que variaram de leve a moderado (Alves et al. 2010), moderada a intensa (Silva et al. 2009) e intensa (Lopez-Peña et al. 2009). Corroborando aos achados do presente estudo, Alves et al. 2010 e Silva et al. 2009 verificaram maior presença de miocardite e pericardite, no coração de

caninos com LV. No entanto, Rosa et al. (2013) verificou maior concentração de células inflamatórias nas regiões subepicárdica e endocárdica.

A forma amastigota de *Leishmania sp* foi observada no interior de macrófago em apenas um animal, entretanto, estudo avaliando 30 cães com LV verificou, por meio de imunohistoquímica, a presença das formas amastigotas de *Leishmania sp*. em 20 animais (Rosa et al. 2013), corroborando as descrições de Lopez-Peña et.al. (2009) e Silva et.al.(2009) em relatos isolados de cães com miocardite e pericardite, respectivamente.

No presente estudo, não foram verificadas lesões em fibras cardíacas, embora estudos tenham detectado a ocorrência de degeneração hialina (Alves et.al. 2010), necrose de cardiomiócitos (Lopez-Peña et.al. 2009, Alves et.al. 2010, Rosa et al. 2013), atrofia de fibras musculares cardíacas (Lopez-Peña et.al. 2009) e aumento de colágeno intersticial (Rosa et al. 2013). Rosa e colaboradores (2013) descreveram necrose do tipo coagulativa, sendo que esta alteração ocorreu em átrio e ventrículo direito na maioria dos casos.

Ainda assim, quatro cães do GLV apresentaram vasculite necrosante do miocárdio, corroborando os achados de Rosa et al. (2013), que observaram apenas um cão com vasculite, e Pumarola et al. (199) e Torrent et al. (2005), os quais relataram poliarterite necrosante no miocárdio de cães com LV. Na maioria dos casos esta lesão vascular ocorre devido à deposição de imunocomplexos na parede de vasos sanguíneos (reação de hipersensibilidade tipo III), ocasionada pelo estímulo imunogênico frente à infecção, resultando em formação elevada de imunocomplexos. Em grande quantidade, estes complexos podem aderir ao endotélio vascular resultando em ativação da resposta celular inflamatória (hipersensibilidade tipo IV) e dano tecidual (Torrent et al. 2005, Rosa et al. 2013).

Nas condições em que se realizou o presente estudo foi possível concluir que os cães com LV ensaiados quando comparados ao GC, apresentaram aspectos clínicos polissintomáticos, sendo que 5,5% dos cães continham sopro sistólico, bem como elevação da atividade sérica de CK e CK-MB, com predominância de arritmia sinusal respiratória associada à marcapasso migratório e sinus arrest, além da presença de infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário multifocal leve do miocárdio.

4.5. REFERÊNCIAS

Adin, D.B. et al. 2005. Cardiac troponin I concentrations in normal dogs and cats using a bedside analyzer. *Journal of Veterinary Cardiology*, 7:27-32.

- Alves, G.B.B. et al. 2010. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 4:310-315.
- Barcelos, D.S. 2009. Aspectos clínicos e parasitários de cães infectados naturalmente por *Leishmania* spp em duas áreas de transmissão intensa com diferentes características ambientais e sociais. Dissertação de Mestrado em Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 91p.
- Buchanan, J.W. & Bücheler, J. 1995. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 206:194-199.
- Castro, I.P. et.al. 2012. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. *Biosci. J.*, 28:799-804.
- Camplesi, A.C. et al. 2009. Dosagem de marcadores cardíacos CK-MB e TnIc e eletrólitos no envenenamento experimental por veneno de sapo em cães. *Pesq. Vet. Bras.* 29: 632-636.
- Ciaramella, P. et al. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research*, 22:539-543.
- Costa-Val, A.P. et.al. 2007. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal*, 174:636-643.
- Coura-Vital, W. et al. 2011. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. *The Veterinary Journal*, 190:e43–e47.
- Diamantino, T.C.C. 2010. Leishmaniose visceral: avaliação das repercussões cardiovasculares secundárias à doença e ao tratamento em crianças e adolescentes tratadas com três esquemas terapêuticos. Tese de Doutorado em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 221p.
- Dias, C.D. 2008. Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados no Distrito Federal. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 82p.
- Diniz, P.P.V.P. Schwartz, D.S. & Collicchio-Zuanaze, R.C. 2007. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dog: two case reports. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59:85-89.
- Diniz, P.P.V.P. et.al. 2008. Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Ehrlichiosis. *J. Vet. Intern. Med.*, 22:1136–1143.

- Dvir, E. et.al. 2004. Electrocardiographic changes and cardiac pathology in canine babesiosis. *Journal of Veterinary Cardiology*, 6:15-23.
- Ferreira, F.S. et al. 2010. Estudo do comportamento da creatino quinase (ck) e creatino quinase-mb (ck-mb) sérica de cães submetidos à oxigenação por membrana extracorpórea (ecmo) durante um período de três horas. *Ci. Anim. Bras., Goiânia*, 11:705-712.
- Fortes, E. 2004. Protozoologia, p.81-84. In: *Ibid. (Ed) Parasitologia veterinária*. 4º ed. Editora Ícone, São Paulo.
- Freitas, J. C. C. et.al. 2012. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, 45:24-29.
- Gontijo, C.M.F. & Melo, M.N. 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Brasil. Epidem.*, 7:338-349.
- Kaneshige, T. et al. 2007. Complete atrioventricular block associated with lymphocytic myocarditis of the atrioventricular node in two Young adult dogs. *J.Comp. Path.*, 137:146-150.
- Larangeira, D.F. 2008. Avaliação da imunidade celular e humoral em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor. Tese de Doutorado em Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo, São Paulo. 80p.
- Lobetti, R.; Dvir, E. & Pearson, J. 2002. Cardiac Troponins in Canine Babesiosis. *J. Vet. Intern. Med.*, 16:63–68.
- López-Peña, M. et al. 2009. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51:20.
- Luna, R. et al. 2000. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis associated anaemia. *J. Comp. Path.*, 122: 213-216.
- Mancianti, F. et al. 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82:566-567.
- Medeiros, A.A et al. 2011. Níveis de CK e CK-MB em cães naturalmente infectados por *Leishmania*. *Anais 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*. Florianópolis, Santa Catarina.

- Melo, M.M. et al. 2008. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60:631-640.
- Ministério da Saúde. 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde.
- Monteiro, E.M. et al. 2005. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 38:147-152.
- Oyama, M.A. & Solter, P.F. 2004. Validation of an immunoassay for measurement of canine cardiac troponin-I. *Journal of Veterinary Cardiology*, 6:17-24.
- Oyama, M.A. & Sisson, D.D. 2004. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J. Vet. Intern. Med.*, 18:831-839.
- Pumarola, M. et al. 1991. Canine Leishmaniasis Associated with Systemic Vasculitis in Two Dogs. *J. Comp. Path.*, 105:279-286.
- Rebar, A. H. et al. 2003. p.15-18. Guia de Hematologia para cães e gatos. 1ed., Roca, São Paulo,
- Reis, A.B. et al. 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral Leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128:87-95.
- Rezende, R.S. et al. 2009. Análise microscópica ventricular esquerdo em cães soropositivos para cinomose. *Pesq. Vet. Bras.*, 29:117-119.
- Rosa, F.A. et al. 2013. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*. *Veterinary Pathology*. 00:0.
- Santos, A.I.F. et al. 2011. Dosagem sérica de troponina I em cães com desnível do segmento ST utilizando quimioluminescência. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63:1330-1336.
- Silva, B.C. et al. 2009. Chronic pericarditis in a naturally *Leishmania chagasi* infected dog. *Braz. J. Vet. Pathol. Botucatu-SP*, 2:107-10.
- Silvestrini, P. et al. 2012. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. *Veterinary Clinical Pathology*, 41:568-574.
- Sleeper M.M., Clifford C.A. & Laster L.L. 2001. Cardiac troponin I in the normal dog and cat. *J. Vet. Intern. Med.*, 15:501-503.
- Sonoda, M.C. 2007. Leishmaniose visceral canina: aspectos clinico-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. Dissertação de Mestrado em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Sousa, M.G. et al. 2013. Assesment of the electrocardiogram in dogs with visceral leishmaniasis. *Pesq. Vet. Bras.* 33:643-647.
- Souza, A.I. et al. 2008. Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural*, 38:1351-1356.
- Tilley, L.P. 1992. *Essentials of canine and feline electrocardiography*. 3th ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 470p.
- Torrent, E. et.al. 2005. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, 46:549-552.
- Yonezawa, L.A. et al. 2009. Marcadores Cardíacos na Medicina Veterinária. *Ciência Rural*, 33:45-47.
- Xavier, S.C. et al. 2006. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58:994-1000.
- Ware, W.A. 2006. Distúrbios do sistema cardiovascular, p.30. In: Nelson, R.W. & Couto, C.G. (Eds) *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 3^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Woolley, R.R. et.al. 2007. Atrial myocarditis as a cause of sinus arrest in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, 48:455-457.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente estudo foi realizado pode-se concluir que:

- Os cães do GLV apresentam prevalência de sinais clínicos polissintomáticos, relacionados principalmente a linfadenomegalia e sinais clínicos tegumentares quando comparados ao GC.
- Os cães do GLV desenvolvem anemia normocítica normocrômica, leucocitose por neutrofilia e hiperproteinemia, bem como elevação da atividade sérica de CK e CK-MB quando comparados ao GC.
- Os cães do GLV e GC não apresentam alterações radiográficas torácicas que sugiram aumento da silhueta cardíaca.
- Os cães do GLV apresentam maior prevalência de arritmia sinusal respiratória associada a episódios isolados de parada ou bloqueio sinusal e marcapasso migratório, além da menor amplitude média da onda P quando comparados ao GC.
- Os cães com LV apresentam, na maioria dos casos, presença de infiltrado inflamatório linfoistioplasmocitário multifocal leve do miocárdio, com baixa incidência de fibrose, vasculite necrosante e rara presença de formas amastigotas da *Leishmania* sp.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIN, D.B. et al. Cardiac troponin I concentrations in normal dogs and cats using a bedside analyzer. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.7, n., p.27-32, 2005.

ALVES, G.B.B. et.al. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto-SP, v.4, n.3, p. 310-315, 2010.

ALTAMIRANO, A.J. et.al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História da Ciência e Saúde**, Rio de Janeiro, v.10, n.3, 2003.

BARATA, R.A. et.al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília-DF, v.38, n.5, p.421-425, 2005.

BARCELOS, D.S. Aspectos clínicos e parasitários de cães infectados naturalmente por *Leishmania spp* em duas áreas de transmissão intensa com diferentes características ambientais e sociais. **Dissertação de Mestrado em Ciências Clínicas**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 91p. 2009.

BOWMAN, D. et.al. Protozoários. In: BOWMAN, D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8º ed., Barueri - SP: Manole, p.85-86, 2006.

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. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lv_grave_nc.pdf>. Acesso em: 10 out. 2011.

BUCHANAN, J.W.; BÜCHELER, J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. **J Am Vet Med Assoc**, v.206, n.2, p.194-199, 1995.

CASTRO, I.P. et.al. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. **Biosci. J**, v.28, n.5, p.799-804, 2012.

CAMPLESI, A.C. et al. Dosagem de marcadores cardíacos CK-MB e TnIc e eletrólitos no envenenamento experimental por veneno de sapo em cães. **Pesq. Vet. Bras.** v.29, n.8, p.632-636, 2009.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research**, v.22, p.539-543, 1997.

COSTA-VAL, A.P. et.al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v.174, p.636-643, 2007.

COURA-VITAL, W. et al. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **The Veterinary Journal**, v.190, p.e43–e47, 2011.

DIAMANTINO, T.C.C. Leishmaniose visceral: avaliação das repercussões cardiovasculares secundárias à doença e ao tratamento em crianças e adolescentes tratadas com três esquemas terapêuticos. **Tese apresentada ao programa de pós-graduação em ciências aplicadas à saúde da criança e do adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em ciências da saúde**. Belo Horizonte - MG, 2010.

DIAS, C.D. Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados no Distrito Federal. **Dissertação de Mestrado em Saúde Animal**, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 82p. 2008.

DINIZ, P.P.V.P. et.al. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dog: two case reports. **Arq Bras Med Vet Zootec**. v.59, n.1, p.85-89, 2007.

DINIZ, P.P.V.P. et.al. Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Ehrlichiosis. **J Vet Intern Med**, v.22, p.1136–1143, 2008.

DVIR, E. et.al. Electrocardiographic changes and cardiac pathology in canine babesiosis. **Journal of Veterinary Cardiology**, 6:15-23. 2004.

FEITOSA, M.M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.28, p.36-44, 2000.

FERREIRA, F.S. et al. Estudo do comportamento da creatino quinase (ck) e creatino quinase-mb (ck-mb) sérica de cães submetidos à oxigenação por membrana extracorpórea (ecmo) durante um período de três horas. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v.11, n.3, p.705-712, 2010.

FISSORE, C. et.al. Convenience of serum for Visceral Leishmaniasis Diagnosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.11, p. 5332–5333, 2004.

FORTES, E. Protozoologia. In: FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 4^o edição. São Paulo-SP. p.81-84. 2004.

FREITAS, J. C. C. et.al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.45, n.1, p.24-29, 2012.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Brasil Epidem**, Rio de Janeiro, v.7, n.3, p.338-349, 2004.

GOODWIN, J.K. Eletrocardiografia. In: TILLEY, L.P.; GOODWIN, J.K. **Manual de Cardiologia para Cães e Gatos**. 3 ed. São Paulo: Roca, p.39-65, 2002.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Vet Parasit.**, v.181, p.23– 30, 2011.

KANESHIGE, T. et al. Complete atrioventricular block associated with lymphocytic myocarditis of the atrioventricular node in two Young adult dogs. **J.Comp. Path.**, v.137, p.146-150, 2007.

LAPPIN, M.R. Infecções Protozoárias Polissistêmicas. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.1265-1266, 2006.

LARANGEIRA, D.F. Avaliação da imunidade celular e humoral em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor. **Tese de Doutorado em Patologia Experimental e Comparada**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo, São Paulo. 80p. 2008.

LOBETTI, R.; DVIR, E. & PEARSON, J. Cardiac Troponins in Canine Babesiosis. **J Vet Intern Med**, v.1, p.63–68, 2002.

LÓPEZ-PEÑA, M. et.al. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.51, n.20, 2009.

LUNA, R. et al. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis associated anaemia. **J. Comp. Path.**, v.122, p.213-216, 2000.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.82, p.566-567, 1988.

MEDEIROS, A.A et al. Níveis de CK e CK-MB em cães naturalmente infectados por *Leishmania*. **Anais 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Florianópolis, Santa Catarina. 2011.

MELLO, A.M. et.al. Manual de Zoonoses. Programa de Zoonoses da Região Sul. **Conselhos Regionais de Medicina Veterinária e Zootecnia dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná**. 2.ed. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

MONTEIRO, E.M. et.al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília-DF, v.38, n.2, p.147-152, 2005.

OYAMA, M.A. & SOLTER, P.F. Validation of an immunoassay for measurement of canine cardiac troponin-I. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.6, n.2, p.17-24, 2004.

OYAMA, M.A. & SISSON, D.D. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. **J Vet Intern Med**, v.18, p.831-839, 2004.

PUMAROLA, M. et.al. Canine Leishmaniasis Associated with Systemic Vasculitis in Two Dogs. **J Comp. Path**, v.105, p.279-286, 1991.

QUEIROZ, N.M.G.P. et.al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 34-40, 2010.

REBAR, A. H. et al. **Guia de Hematologia para cães e gatos**. 1ed., Roca, São Paulo, p.15-18. 2003.

REIS, A.B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral Leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.87-95, 2009.

REZENDE, R.S. et al. Análise microscópica ventricular esquerdo em cães soropositivos para cinomose. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n., p.117-119, 2009.

ROSA, F.A. et al. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*. **Veterinary Pathology**, v.00, n.0, 2013.

SANTOS, A.I.F. et.al. Dosagem sérica de troponina I em cães com desnível do segmento ST utilizando quimioluminescência. **Arq Bras Med Vet Zootec.** v.63, n.6, 2011.

SCHELLING, C.G. Exame Radiográfico do Coração. In: TILLEY, L.P.; GOODWIN, J.K. **Manual de Cardiologia para Cães e Gatos**. 3 ed. São Paulo: Roca, p.15-37, 2002.

SILVA, B.C. et.al. Chronic pericarditis in a naturally *Leishmania chagasi* infected dog. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**. Botucatu-SP, v.2, n.2, p.107-10, 2009.

SILVESTRINI, P. et al. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, p.568-574. 2012.

SIMONE, D.H. Examen Radiográfico. In: BELENERIAN, G. et.al. *Afecciones Cardiovasculares en Pequeños Animales*. 2 ed. **Inter-Médica**, Buenos Aires, p.63-75, 2007.

SLEEPER M.M., CLIFFORD C.A. & LASTER L.L. Cardiac troponin I in the normal dog and cat. **J Vet Intern Med**, v.15, p.501–503, 2001.

SONODA, M.C. Leishmaniose visceral canina: aspectos clinico-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. **Dissertação de Mestrado em Clínica Veterinária**, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

SOUSA, M.G. et al. Assesment of the electrocardiogram in dogs with visceral leishmaniasis. **Pesq Vet Bras.** v.33, n.5, p.643-647, 2013.

SOUZA, A.I. et al. Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, v.38, n., p.1351-1356, 2008.

TARTAROTTI, A.L. et.al. Boletim epidemiológico sobre leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul. **Centro Estadual de Vigilância em Saúde - Secretária Estadual da Saúde do Rio grande do Sul**, v.13, n.1, 2011.

TORRENT, E. et.al. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.46, p.549-552, 2005.

YONEZAWA, L.A. et al. Marcadores Cardíacos na Medicina Veterinária. **Ciência Rural**, v. 33, p. 45-47, 2009.

XAVIER, S.C. et.al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Belo Horizonte-MG, v.58, n.6, p.994-1000, 2006.

WARE, W.A. Exames Diagnósticos do Sistema Cardiovascular. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.1265-1266, 2006.

WOOLLEY, R.R. et.al. Atrial myocarditis as a cause of sinus arrest in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.48, n., p.455-457, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. 2010. Acesso em fevereiro de 2012. Disponível em: http://www.who.int/neglected_disease/2010report/NTD_2010report_embargoed.pdf.

TILLEY, L.P. 1992. **Essentials of canine and feline electrocardiography**. 3th ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 470p.