

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINARIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL

**GRACY CANTO GOMES MARCELLO**

HEMOGRAMA, PROTEINOGRAMA E DETERMINAÇÃO DAS  
ATIVIDADES SÉRICAS DA HAPTOGLOBINA E DA  
CERULOPLASMINA EM CÃES (*Canis familiaris*) SORORREATORES  
PARA *Leishmania* sp. DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE  
JANEIRO – RJ.

**NITERÓI**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GRACY CANTO GOMES MARCELLO

HEMOGRAMA, PROTEINOGRAMA E DETERMINAÇÃO DAS  
ATIVIDADES SÉRICAS DA HAPTOGLOBINA E DA  
CERULOPLASMINA EM CÃES (*Canis familiaris*) SORREADORES  
PARA *Leishmania* sp. DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE  
JANEIRO – RJ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Clínica e Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

Orientadores: Prof. Dr. NAYRO XAVIER DE ALENCAR

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> NÁDIA REGINA PEREIRA ALMOSNY

Co-Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> TÂNIA MARIA PACHECO SCHUBACH

Niterói  
2009

GRACY CANTO GOMES MARCELLO

HEMOGRAMA, PROTEINOGRAMA E DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES  
SÉRICAS DA HAPTOGLOBINA E DA CERULOPLASMINA EM CÃES (*Canis  
familiaris*) SORRETORES PARA *Leishmania* sp. DA REGIÃO METROPOLITANA  
DO RIO DE JANEIRO – RJ.

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária -  
Clínica e Reprodução Animal da  
Universidade Federal Fluminense, como  
requisito parcial para a obtenção do Grau  
de Mestre.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Nayro Xavier de Alencar – Orientador  
Universidade Federal Fluminense

---

Dr.<sup>a</sup> Tânia Maria Pacheco Schubach – Co-orientadora  
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
IPEC – FIOCRUZ

---

Prof. Dr. Antonio Peixoto Albernaz  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

M314

Marcello, Gracy Canto Gomes.

Hemograma, proteinograma e determinação das atividades séricas da haptoglobina e da ceruloplasmina em cães (*Canis familiaris*) sororretores para *Leishmania* sp. da região metropolitana do Rio de Janeiro - RJ / Gracy Canto Gomes Marcello. - 2009.

75 f.

Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal)-Universidade Federal Fluminense, 2009.

Orientador: Nayro Xavier de Alencar

1. Patologia clínica veterinária. 2. *Leishmania*.  
3. Cão. 4. Contagem de células sanguíneas. 5.  
Eletroforese I. Título.

CDD 636.0896075

Dedico este trabalho:

A Deus,  
causa primária de todas as coisas,  
força maior que me faz acreditar  
a todo instante que estou aqui não  
por acaso e que todo o meu esforço  
tem um objetivo maior: evoluir.  
Obrigada, Senhor por ter colocado  
em meu caminho as pessoas certas  
no momento oportuno.

Ao meu querido marido Gabriel,  
que sabe, pacientemente, entender, respeitar,  
e incentivar toda essa minha busca acadêmica.  
A cada etapa conquistada, percebo que fortalece  
mais esse lindo sentimento que temos um pelo outro.  
As minhas vitórias serão suas sempre.  
Muito Obrigada!

Aos meus queridos pais Gerci e Telma,  
a quem eu amo incondicionalmente.  
Responsáveis pela minha formação  
profissional, ética e moral, meu alicerce.  
Muito obrigada por terem conseguido me aconselhar,  
me ajudar e me guiar sem deixar de me dar livre arbítrio  
para que eu julgasse o melhor caminho a seguir.  
Este grau de mestre é também de vocês!

Senhor,  
Fazei-me instrumento de vossa paz.  
Onde houver ódio, que eu leve o amor,  
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão,  
Onde houver discórdia, que eu leve a união,  
Onde houver dúvida, que eu leve a fé,  
Onde houver erro, que eu leve a verdade,  
Onde houver desespero, que eu leve a esperança,  
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria,  
Onde houver trevas, que eu leve a luz.  
Ó Mestre, fazei que eu procure mais  
Consolar que ser consolado,  
Compreender que ser compreendido,  
Amar que ser amado.  
Pois é dando que se recebe,  
É perdoando que se é perdoado e  
é morrendo que se vive para a vida eterna.

Oração de Francisco de Assis  
"Autor Desconhecido"

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

À seção de Pós-graduação da Faculdade de Veterinária – UFF.

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPERJ pela compra do medidor de pH.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nayro Xavier de Alencar que acreditou na minha capacidade em realizar este projeto e depositou em mim toda expectativa e confiança que fizeram com que eu me esforçasse ao máximo para não decepcioná-lo. Obrigada por ser, desde o início da minha vida profissional dentro da Patologia Clínica Veterinária como estagiária do laboratório, um exemplo de profissional e professor, me incentivando, me orientando e me mostrando os melhores caminhos.

À Profa. Dra. Nádia Regina Pereira Almosny pela orientação, por estar sempre disposta a me ajudar em todos os momentos e por permitir a aquisição de alguns dos insumos e equipamentos essenciais à realização deste trabalho.

À equipe do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (IPEC – FIOCRUZ), em especial à Dra. Tânia Maria Pacheco Schubach, minha co-orientadora, por abrir as portas do IPEC e ceder as amostras de sangue utilizadas neste trabalho e ao Dr. Fabiano Borges Figueiredo pelo auxílio essencial durante a coleta de material e realização da sorologia dos animais sadios.

À professora Márcia de Souza Xavier por estar sempre me apoiando, incentivando e estimulando a seguir em frente, pelo exemplo de pessoa, profissional, professora e mulher guerreira que não desiste nunca de seus sonhos. Obrigada pelos convites para ministrar aulas, pelo auxílio durante a realização da PCR e por toda a confiança em mim depositada.

À Profa. Dra. Eliane Teixeira Mársico pela permissão para a utilização dos equipamentos necessários para a realização do piloto deste trabalho e ao Técnico Carlos Frederico Guimarães do Laboratório de Controle Físico-Químico de Alimentos da Faculdade de Veterinária pelo auxílio essencial no preparo das soluções.

Ao Prof. Dr. Salim Kanaan da Faculdade de Medicina da UFF por abrir as portas do Laboratório Didático Multidisciplinar do Hospital Antônio Pedro, abdicando dos seus fins-de-semana para me acompanhar e auxiliar nas dosagens espectrofotométricas deste experimento. Muito obrigada pela atenção e confiança.

Ao Prof. Dr. Aloysio Cerqueira por permitir a realização da PCR no Laboratório de Bactérias Enteropatógenicas e Microbiologia de Alimentos do Instituto

Biomédico da UFF, disponibilizando o laboratório e me recebendo da melhor maneira possível.

Ao Prof. Dr. Antonio Peixoto Albernaz por permitir a utilização do equipamento de eletroforese do Laboratório Clínico Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense e por todo o auxílio operacional que a realização deste exame envolveu.

À equipe do Laboratório de Bactérias Enteropatogênicas e Microbiologia de Alimentos do Instituto Biomédico da UFF pelo auxílio na realização da PCR, em especial Tatiana Didonet, Raphael, Cecília e Lavície.

Ao cão “Valente” do Professor Sávio Bruno da Faculdade de Veterinária da UFF, pelo sangue doado para a realização deste experimento.

Às médicas veterinárias e amigas Roberta Pinho e Luciula Kfuri, pelos soros de animais sadios doados pelo banco de sangue Hemopet.

Ao Prof. Dr. Rodolpho Torres pela análise estatística dos dados deste experimento.

À médica veterinária e amiga Cynthia Lucidi pelos dois anos de cumplicidade e companheirismo durante a residência em Botucatu e pela correção do Abstract.

À Prof. Dra. Regina Kiomi Takahira e ao Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes pela orientação durante o período da residência e por todos os ensinamentos técnicos, éticos e pessoais que eles me passaram durante os meus dois anos de residência, primordiais para a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório Clínico Veterinário de UFF, em especial à técnica Tandara Machado Outeiro por todo apoio e amizade, pelo auxílio na lavagem de material, e no processamento das amostras; aos monitores e aos pós-graduandos Ananda, Miguel, Augusto, Renata Ferreira, Renata Rosa, Carolina e Renato.

A todos os amigos e colegas da pós-graduação pelo convívio durante as aulas e pelo apoio constante, em especial, Maria Alice, Luciana Peralta, Pedro, Raphael, Mariana Boechat, Bruno, Namir, Aline, Flávia Liparisi, Francisco e Camila.

Às médicas veterinárias e amigas Mariana Cazaux, Anna Donato e Silvia Torres pelo apoio e amizade durante a realização deste trabalho e sempre.

Ao meu irmão Grégory e à minha cunhada Gabriele; à toda a minha família, em especial aos meus avós paternos, Gercy e Doralice, e maternos, Walter e Eunice; e à família do Gabriel, em especial aos meus sogros Cesar e Graça pelo apoio e pela compreensão da minha ausência para a realização deste trabalho em alguns momentos.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>°C</b>	Graus Celcius
<b>CEPA</b>	Comitê de ética de pesquisa com animais
<b>CEUA</b>	Comitê de ética no uso de animais em pesquisa
<b>CHGM</b>	Concentração de hemoglobina globular média
<b>CID</b>	Coagulação intravascular disseminada
<b>CRP</b>	Do inglês “C-reactive protein” ou Proteína C reativa
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Trifosfatos desoxirribonucleosídeos
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>ELISA</b>	Do inglês “Enzyme-Linked Imunosorbent Assay” ou ensaio imuno enzimático
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>Fiocruz</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>fL</b>	Fentolitros
<b>g</b>	Força centrífuga g
<b>g</b>	Gramas
<b>g/L</b>	Gramas por litro
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HUAP</b>	Hospital Universitário Antônio Pedro
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IPEC</b>	Instituto de Pesquisa Evandro Chagas
<b>kD</b>	Kilodalton
<b>LG</b>	Leucometria global
<b>LTA</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>LVC</b>	Leishmaniose Visceral Canina
<b>M</b>	Molar
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>mg/dL</b>	Miligramas por decilitro
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio

<b>mgHBC/dL</b>	Miligramas de capacidade de ligação de cianometahemoglobina por decilitro
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mol/L</b>	Molar por litro
<b>N</b>	Normal
<b>n</b>	Número de animais
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>p.</b>	Página
<b>PCR</b>	Do inglês "Polymerase Chain Reaction" ou reação em cadeia da polimerase
<b>PFA</b>	Proteína de fase aguda
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>pmol.</b>	Picomolar
<b>RIFI</b>	Reação de Imunofluorescência Indireta
<b>Taq</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris-Borato-EDTA
<b>TH1</b>	Do inglês "T-Helper 1" ou Linfócito T auxiliador 1
<b>TH2</b>	Do inglês "T-Helper 2" ou Linfócito T auxiliador 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>U</b>	Unidade internacional de medida
<b>UENF</b>	Universidade Estadual do Norte Fluminense
<b>UFF.</b>	Universidade Federal Fluminense
<b>UI/L</b>	Unidades internacionais por litro
<b>V</b>	Volts
<b>VGM</b>	Volume globular médio
<b><math>\Delta A</math></b>	Varição de Absorbância

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p.8

RESUMO, p.12

ABSTRACT, p.13

1 INTRODUÇÃO, p.14

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.16

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, p.16

2.1.1 Etiologia, p.17

2.1.2 Histórico, p.18

2.1.3 Ciclo Biológico, p.19

2.1.4 Patogenia, p.20

2.1.5. Aspectos clínicos, p.21

2.1.6 Aspectos laboratoriais, p.23

2.1.6.1 Alterações hematológicas, p.23

2.1.6.2 Alterações nas proteínas séricas, p.24

2.1.7 Diagnóstico laboratorial, p.25

2.1.8 Prevenção, p.26

2.1.9 Tratamento, p.26

2.1.10 Correlação da LVC com a Ehrlichiose, p.27

2.2 PROTEÍNAS SÉRICAS, p.28

2.2.1 Albumina, p.29

2.2.2 Globulinas, p.30

2.3 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS, p.31

2.4 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA, p.33

2.4.1 Haptoglobina, p.35

2.4.2 Ceruloplasmina, p.36

3 MATERIAL E MÉTODOS, p.38

3.1 AMOSTRAGEM, p.38

3.2 COLETA DE MATERIAL, p.39

3.2.1 Hemograma e Reação em cadeia da polimerase para *Ehrlichia* sp. , p.39

3.2.2 Determinação da concentração sérica de proteínas totais, albumina, globulinas, eletroforese de proteínas, haptoglobina e ceruloplasmina, p.39

3.3 EXAMES LABORATORIAIS, p.40

3.3.1 Hemograma, p.40

3.3.2 Concentrações séricas de proteína total, albumina e globulina, p.40

3.3.3 Eletroforese das proteínas séricas totais, p.41

3.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do genoma de *Ehrlichia* sp. , p.42

3.3.5 Determinação da concentração sérica da haptoglobina, p.43

3.3.6 Determinação da concentração sérica da ceruloplasmina, p.46

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p.48

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO, p.49

4.1 HEMOGRAMA, p.49

4.1.1 Eritrograma, p.49

4.1.2 Leucograma, p.50

4.1.3 Plaquetometria, p.52

4.2 PROTEINOGRAMA, p.52

4.2.1 Concentrações séricas de proteína total, albumina e globulinas por espectrofotometria, p.52

4.2.2 Eletroforese de proteínas séricas, p.54

4.3 HAPTOGLOBINA E CERULOPLASMINA, p.55

4.4 PCR para *Ehrlichia* sp., p.59

5 CONCLUSÕES, p.60

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.61

## RESUMO

A Leishmaniose Visceral é uma doença de caráter zoonótico que representa um grave problema de saúde pública no Brasil. É causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* e tem como vetor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. O cão funciona como o principal reservatório da doença para o homem, que tem se difundido em larga escala no Brasil juntamente com a urbanização dos meios rurais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar em cães sororretores para *Leishmania* sp. as possíveis alterações do hemograma; do proteinograma e das proteínas de fase aguda haptoglobina e ceruloplasmina, comparando os valores destas com as alterações de leucograma inflamatório. Para esta finalidade foram utilizadas amostras sanguíneas de 95 cães divididos em dois grupos. O grupo I era constituído por 75 cães de raças variadas apresentando anticorpos anti-*Leishmania* pelo método de RIFI. O grupo II foi composto por 20 animais sadios de raças variadas com a mesma reação negativa. Foram coletadas amostras de sangue para realização do hemograma; PCR para *Ehrlichia* sp., determinação de proteína sérica total, albumina e globulina; eletroforese de proteínas séricas e determinação da atividade sérica da haptoglobina e da ceruloplasmina. A análise dos resultados revelou anemia normocítica e hipocrômica, linfopenia, hiperproteinemia com hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, ocasionada por aumento individual das bandas das  $\alpha_2$  globulinas,  $\beta$  globulinas ou  $\gamma$  globulinas ou por uma combinação destas alterações. A gamopatia policlonal foi observada em todos os animais que apresentaram hipergamaglobulinemia. Os níveis séricos de haptoglobina em animais sororretores para *Leishmania* sp. elevaram-se cerca de duas vezes em relação aos níveis séricos desta mesma proteína em animais sadios. No caso da ceruloplasmina, este aumento ocorreu cerca de três vezes. Quando comparada às alterações de leucograma inflamatório como leucocitose e neutrofilia, a determinação dos níveis séricos das proteínas de fase aguda haptoglobina e ceruloplasmina foi mais sensível para determinar a presença de um quadro inflamatório ativo em cães sororretores para *Leishmania* sp. Concluiu-se nesse estudo que as principais alterações do hemograma, do proteinograma e das proteínas de fase aguda haptoglobina e ceruloplasmina em cães sororretores para *Leishmania* sp. são anemia, linfopenia, hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia com gamopatia policlonal e aumento dos níveis séricos de haptoglobina e ceruloplasmina. Tais alterações permitem um melhor entendimento da fisiopatogenia do mecanismo inflamatório que ocorre na LVC.

Palavras-chave: *Leishmania* sp. Hemograma. Eletroforese de proteínas séricas. Haptoglobina. Ceruloplasmina. Cão.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a zoonotic disease which represents an important Public Health issue in Brazil. It is caused by the protozoan *Leishmania (Leishmania) chagasi* and is transmitted by the phlebotomine vector *Lutzomyia longipalpis*. Dogs are the major carriers of this disease. Therefore, this disorder has been largely disseminated in Brazil due to the urbanization of rural areas. The aim of the present study was to evaluate possible alterations on the complete blood count, proteinogram and acute phase proteins profile (i.e. serum haptoglobin and ceruloplasmin) in canine seroreactive for *Leishmania*, and to compare these parameters with alterations compatible with acute leukocytosis. We evaluated blood samples from 95 dogs, which were separated in two groups. Group I was represented by 75 of various breeds showing anti-*Leishmania* antibodies by the IFAT. Group II was represented by 20 healthy animals of various breeds, presenting negative results for the reaction mentioned above. Blood samples were submitted to a complete blood count; PCR to identify the genus *Ehrlichia* sp. total serum protein, albumin and globulin measurement; serum protein electrophoresis; and evaluation of haptoglobin and ceruloplasmin activities. The results revealed normocytic hypochromic anemia, lymphopenia, hyperproteinemia accompanied by hypoalbuminemia and hyperglobulinemia caused by an individual increase on the  $\alpha_2$ ,  $\beta$  or  $\gamma$  globulin band, or by a combination of the three of them. Polyclonal gammopathy was observed in all dogs which presented hypergammaglobulinemia. The levels of serum haptoglobin in animals seroreactive for *Leishmania* sp. presented a two-fold increase compared to the healthy animals. A three-fold increase was observed for the serum ceruloplasmin. When compared to alterations compatible with acute leukocytosis, such as leukocytosis and neutrophilia, the measurement of the acute phase proteins haptoglobin and ceruloplasmin was more sensitive to identify an active inflammatory process in the dog's seroreactive for *Leishmania* sp. In conclusion, the main alterations in CBC, proteinogram, haptoglobin and ceruloplasmin in dogs seroreactive for *Leishmania* sp. are anemia, lymphopenia, hyperproteinemia hypoalbuminemia, hyperglobulinemia accompanied by polyclonal gammopathy and increase of serum haptoglobin and ceruloplasmin. These alterations provide a better evaluation of the physiopathology of the inflammatory process involved in the CVL.

Key-words: *Leishmania* sp. CBC. Serum protein electrophoresis. Haptoglobin. Ceruloplasmin. Dog.

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral é uma zoonose que representa um grave problema de saúde pública no Brasil, onde é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (MARZOCHI, et al. 1994). A doença acomete vários animais, inclusive o cão, além do homem. No Brasil, o cão é considerado o principal reservatório do protozoário no ambiente urbano (WHO, 1990). Os animais acometidos apresentam, geralmente, caquexia, mucosas hipocoradas, linfadenopatia generalizada, febre intermitente, hepatoesplenomegalia, onicogribose, ceratoconjuntivite, e lesões cutâneas, como dermatite seca esfoliativa, ulcerações e alopecia focal ou generalizada (MARZOCHI et al. 1985, CIARAMELLA et al. 1997, BREITSCHWERDT e SCHANTZ 2006). Dentre os achados laboratoriais encontram-se anemia, trombocitopenia, leucopenia ou leucocitose, azotemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e proteinúria (KONTOS e KOUTINAS, 1993; BRAVO et al., 1993). À eletroforese, observa-se mais comumente um quadro de gamopatia policlonal, mas pode haver também gamopatia monoclonal. Podemos observar também aumento nas bandas das  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas (FONT, 1996; MEYER e HARVEY, 2004). O diagnóstico pode ser feito por observação de formas amastigotas em aspirados de medula óssea ou linfonodo, por PCR, ou através de métodos sorológicos aglutinação direta, hemaglutinação passiva, imunofluorescência indireta e ELISA (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2002; MIRÓ, 2008).

O tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) não é permitido no Brasil, por se tratar de um país com múltiplas áreas endêmicas que têm aumentado conforme o passar dos anos em quantidade e em número de casos por área, já que não há evidências de que o tratamento canino resulte na diminuição da carga parasitária e na retirada do estado de portador. Ou seja, não há comprovações de

que o tratamento elimine a capacidade do cão de, quando picado por um flebotomíneo, transmitir o protozoário ao vetor (MIRÓ, 2008). Sendo assim, devido à grande importância zoonótica da LVC no Brasil o Ministério da Saúde recomenda a eutanásia dos cães quando soropositivos para antígenos de *Leishmania* a partir da metodologia da RIFI com titulação acima de 1:40, medida que funciona também como profilaxia da doença (DA SILVA et al., 2005).

Os estudos sobre a leishmaniose visceral são de extrema importância para a clínica médica de pequenos animais e para a saúde pública, já que a doença se alastra geograficamente por todo o mundo, inclusive por diversas regiões brasileiras (SLAPPENDEL e GREENE, 1990).

O presente trabalho teve por objetivos avaliar em cães sororretores para *Leishmania* sp. possíveis alterações do hemograma; do proteinograma e dos níveis séricos das proteínas de fase aguda haptoglobina e ceruloplasmina;

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A leishmaniose caracteriza-se por um grupo de doenças infecciosas que afetam os seres humanos e os animais domésticos e selvagens em todo o mundo (BANETH, 2006). É considerada uma zoonose causada por diversos protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida ao homem e aos animais por um inseto do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (CIARAMELLA, et al. 1997; BANETH, 2006 ). Nos seres humanos, a leishmaniose é classificada, de acordo com a sua apresentação clínica e o agente etiológico, em leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral (HERWALDT, 1999). Nos cães, a leishmaniose pode ser classificada em duas doenças distintas, a leishmaniose visceral canina (LVC) e a leishmaniose tegumentar americana (LTA), causadas por agentes etiológicos diferentes e com apresentações clínicas também diferentes (BANETH, 2006).

A LTA é causada no Brasil pelo protozoário *Leishmania (Viannia) brasiliensis* Possui ampla distribuição que vai desde a América Central até o norte da Argentina. No Brasil, o parasito foi isolado de roedores silvestres em Pernambuco, de felídeos no Rio de Janeiro e de canídeos no Ceará, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Ministério da Saúde, 2007).

No Brasil, a LVC é causada por um protozoário intracelular dimórfico denominado *Leishmania (Leishmania) chagasi* (BRAVO, et al. 1993), de acordo com Neves e Santucci (2006), a doença ocorre em todas as regiões brasileiras, sendo a ocorrência nas regiões Nordeste e Centro Oeste mais significativa. Originalmente a LVC atingia o ambiente rural e silvestre. Porém, em décadas mais recentes, devido

aos desmatamentos e transformações do meio-ambiente, tem atingido áreas urbanas e peri-urbanas, tornando-se uma importante questão de saúde pública.

O cão é considerado o reservatório doméstico da leishmaniose visceral causada pela *L. (L.) chagasi*, desempenhando importante papel na manutenção da doença humana (WHO, 1990). Apesar da leishmaniose visceral (LV) ser mais comumente encontrada no homem e no cão, outros animais domésticos como o gato e silvestres como o cahorro-vinagre (FIGUEIREDO et al., 2008) também podem adquirir o protozoário através do flebotomíneo e desenvolver a doença (THERAN e LING, 1967; TRYPHONAS et al., 1977; BANETH et al., 1998; NATAMI et al., 2000). Muitos dos sinais clínicos apresentados pelos cães são semelhantes aos apresentados pelos seres humanos na LV (KEENAN, et al. 1984), nos cães, entretanto, é comum a apresentação de sinais cutâneos e viscerais concomitantemente (BANETH, 2006).

O estudo da LV é de extrema importância para a clínica médica de pequenos animais e para a saúde pública, visto que a doença se alastra geograficamente por todo o mundo, inclusive por diversas regiões brasileiras. Além disso, a infecção pela *Leishmania* pode causar doença clínica nos cães e gatos, tornando-os reservatórios da doença para o homem em cidades onde a doença tem caráter endêmico (SLAPPENDEL e GREENE, 1990).

### 2.1.1 Etiologia

Os agentes etiológicos das leishmanioses pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Atualmente, as espécies de *Leishmania* estão agrupadas e classificadas em dois subgêneros: *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*, de acordo com a classificação proposta por Lainson et al. (1987). Estão descritas, até o momento, 31 espécies infectando uma ampla variedade de mamíferos hospedeiros silvestres ou domésticos e vetores, das quais 22 espécies são patogênicas. As principais espécies envolvidas na LV são *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (WHO, 1984; KOUTINAS et al., 1999).

A espécie *L.(L.) chagasi* foi descrita como a responsável por causar a LVC, já na África e na região do Mediterrâneo, foi descrita a espécie *L.(L.) infantum*. Segundo Dantas-Torres (2006), as duas espécies foram analisadas geneticamente e

não foi possível detectar diferenças genômicas significativas entre as mesmas, concluindo que as duas espécies fariam parte de uma só espécie. Entretanto, há divergências quanto à origem do parasita, havendo duas diferentes hipóteses. A primeira delas defende que a espécie *L.(L.) infantum* foi importada do continente europeu juntamente com a colonização portuguesa e hispânica das Américas (KILLICK-KENDRICK, 1985; RIOUX et al., 1990). A outra hipótese seria da existência da espécie *L.(L.) chagasi* nas Américas antes da colonização europeia (LAINSON e RANGEL, 2005). Tal divergência sobre a origem da espécie influi na classificação taxonômica da mesma e, portanto até nova classificação as espécies continuam sendo sinônimas, denominada *L.(L.) chagasi* quando presente nas Américas e *L.(L.) infantum* quando presente no Mediterrâneo ou na África.

No Brasil, a espécie *L.(L.) chagasi* tem como seu principal vetor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (MARZOCHI, et al. 1994). Nas áreas endêmicas, o flebotomíneo apresenta-se de forma abundante, entretanto, as taxas de infecção deste inseto pela *L.(L.) chagasi* são baixas, entre 0,2 e 7,1% (RYAN et al., 1984; SHERLOCK, 1996; LAINSON et al., 1985). Apesar da via de transmissão da LVC através do flebotomíneo ser estabelecida como a principal forma de transmissão natural, outros mecanismos de transmissão em potencial não podem ser descartados (COUTINHO e LINARDI, 2007). Coutinho et al. (2005) sugeriram a capacidade vetorial do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e Coutinho e Linardi (2007) comprovaram a presença da *L.(Leishmania) chagasi* em pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis*, entretanto não conseguiram provar a capacidade das mesmas de transmitir o protozoário para animais da espécie canina e causar a LVC.

### 2.1.2 Histórico

O primeiro relato do parasita do gênero *Leishmania* foi feito por Borovsky em 1898. Tais observações foram feitas na Rússia, em um paciente humano com a forma cutânea da doença. Em 1903 na Índia, Leishman e Donovan, de formas independentes e sem conhecimento sobre as descobertas de Borovsky, também descreveram o parasita em casos de leishmaniose visceral. Também em 1903, Ross denominou o parasita como *Leishmania donovani*. O papel epidemiológico do cão como hospedeiro intermediário *L. donovani* só foi estabelecido em 1908 por Charles

Nicolle na Tunísia. Gaspar Viana, em 1912, descobriu a ação curativa do antimônio pentavalente sobre pacientes com calazar, o que reduziu em cerca de 70 a 90% o índice de mortalidade desta doença em pacientes humanos em vários países da África e da Ásia. A transmissão da *L. donovani* ao homem pela picada do inseto *Phlebotomus argentipis* foi definitivamente demonstrada somente em 1942, tornando possível a conclusão sobre o principal agente transmissor desta zoonose (REY, 1991). No Brasil, em 1934 foi possível obter a primeira orientação epidemiológica a partir dos relatórios de Penna. Evandro Chagas em 1936 descreveu o primeiro caso diagnosticado “in vivo” da leishmaniose visceral no Brasil. Cunha e Chagas em 1937 estabeleceram o agente etiológico no Brasil através da denominação de *L. donovani chagasi* (REY, 1991).

### 2.1.3 Ciclo Biológico

O ciclo de vida do parasita envolve um vetor, no qual encontramos a forma promastigota do parasita e um hospedeiro vertebrado, no qual encontramos a forma amastigota do parasita dentro de macrófagos. O vetor *Lutzomyia longipalpis* realiza o repasto sanguíneo em um animal ou homem infectado e ingere macrófagos contendo a forma amastigota da *Leishmania*, presente nos tecidos do hospedeiro. A forma amastigota é liberada pelos macrófagos dentro do intestino do flebotomíneo e se transformam em promastigotas (forma móvel e extracelular do parasita), que por sua vez, se replicam dentro do intestino do flebotomíneos. As formas promastigotas se acumulam no intestino médio, do proventrículo e do esôfago do vetor deixando-os bem repletos. Quando a fêmea parasitada volta a realizar um novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas são regurgitadas e transmitidas para um novo hospedeiro. No organismo do hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos que, entretanto, não conseguem exterminá-las. Dentro dos macrófagos, a forma promastigota internaliza seu flagelo e volta à forma amastigota intracelular que se multiplica atingindo dezenas de parasitas em uma única célula até destruí-la. Os protozoários livres são então novamente fagocitados pelos macrófagos, perpetuando a infecção no hospedeiro (WHO, 1990; ROSYPAL et al., 2003; BANETH, 2006).

#### 2.1.4 Patogenia

Dentro do organismo do hospedeiro, as formas amastigotas alcançam primariamente o sistema circulatório sanguíneo-linfático, replicando-se em vários órgãos como baço e fígado, alcançando também o tecido cutâneo, causando uma infecção de caráter generalizado (BANETH, 2006). Nem todos os cães naturalmente ou experimentalmente infectados pela *Leishmania* desenvolvem a doença (KILLICK-KENDRICK et al., 1994; PINELLI et al., 1995).

A resposta imune desenvolvida pelo organismo do cão no momento em que ocorre a infecção ou até mesmo no decorrer da mesma parece ser o fator mais importante para determinar se o animal infectado irá desenvolver a doença clínica, sub-clínica ou crônica (BANETH, 2006). Durante a infecção canina por *Leishmania* há um estímulo humoral, ou seja, para aumentar o número de linfócitos B, e ao mesmo tempo, ocorre também diminuição dos linfócitos T. O aumento de linfócitos B produz uma quantidade excessiva de imunoglobulinas não-protetoras, que se une aos antígenos circulantes sem, no entanto, conseguir neutralizá-lo, formando imunocomplexos que se depositam em vários órgãos e tecidos. Além disso, sem o auxílio dos linfócitos T, o macrófago não consegue destruir e eliminar os parasitas, permitindo a multiplicação das formas amastigotas, ruptura do macrófago infectado e liberação das amastigotas, que ficam livres para infectar novos macrófagos (TABOADA e MERCHANT, 1995). Esse mecanismo de resistência da *Leishmania* ao fagolisossomos dos macrófagos parece estar ligado à produção de substâncias como fosfolipoglicanos pelo parasita, impedindo a maturação do fagossomo (BANETH, 2006).

Os imunocomplexos são responsáveis por muitos dos sinais clínicos observados na LVC (SLAPPENDEL e GREENE, 1990; FERRER, 1992; KOUTINAS et al., 1993; KOUTINAS et al., 1999). Quando os imunocplexos se depositam nas paredes dos vasos sanguíneos podem causar vasculite, além de glomerulonefrite, no caso de deposição nos túbulos renais, e poliartrite, no caso de deposição nas cápsulas articulares. Tais imunocomplexos também podem causar diminuição da vida média de células sanguíneas ao se ligar às mesmas, causando anemia hemolítica e trombocitopenia imunomediadas. Neste caso, pode haver o envolvimento da produção de auto-anticorpos contra as células sanguíneas, já que o estímulo humoral é muito intenso, o sistema imune acaba perdendo a regulação e

produzindo anticorpo contra as células do próprio organismo (MARTINEZ-MORENO et al., 1995; KOUTINAS et al., 1999).

Entretanto, não é apenas a resposta imune humoral que determina o tipo de apresentação clínica da doença. A resposta imune celular também atua neste sentido (BANETH et al., 2008). A LVC induz resposta imune celular TH1 e TH2, que a partir do balanceamento entre as mesmas, parecem regular a replicação do parasita, a progressão da doença ou a cura. Ou seja, quando há o favorecimento da resposta imune celular TH1, há o favorecimento da diminuição da replicação e consequente eliminação do parasita; já quando há o favorecimento de resposta imune celular TH2 há o favorecimento da replicação e consequentemente da disseminação do parasita (STRAUSS-AYALI et al., 2007).

#### 2.1.5. Aspectos clínicos

A LVC é uma doença multissistêmica que apresenta um quadro clínico variado. A maioria dos cães afetados apresenta emaciação, atrofia muscular generalizada, linfadenopatia e intensa descamação cutânea. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (BANETH et al, 2008).

A LVC pode se apresentar nas formas aguda, sub-clínica, ou crônica, com período de incubação que varia de semanas a anos (MARZOCHI et al., 1985; BANETH, 2006). A sintomatologia varia, portanto de acordo com a forma da doença. Um animal com o quadro clínico típico pode apresentar caquexia, perda progressiva de peso, mucosas hipocoradas, linfadenopatia generalizada, febre intermitente, hepatoesplenomegalia, onicogribose, ceratoconjuntivite, e lesões cutâneas, como dermatite seca esfoliativa, ulcerações e alopecia focal ou generalizada. Um animal com LVC também pode apresentar poliartrite, glomerulonefrite, falência renal e hepática, sangramento intestinal, diarreia, vômito, epistaxe e hemorragia gengival (MARZOCHI et al. 1985, CIARAMELLA et al. 1997, BREITSCHWERDT e SCHANTZ 2006).

As alterações cutâneas da LVC incluem dermatite exfoliativa, ulcerativa, nodular e pustular (KOUTINAS et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; PAPADOGIANNAKIS et al, 2005). As lesões cutâneas na LVC não são provocadas

necessariamente pela resposta inflamatória à presença física do parasita na pele, já que mesmo em animais cuja pele não apresenta sinais de dermatite, as formas amastigotas do protozoário também estão presentes em grande escala (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; PAPADOGIANNAKIS et al, 2005).

A intensa linfadenopatia generalizada que ocorre na LVC é causada pelo aumento do tamanho e da quantidade dos folículos linfóides e pela hipertrofia e hiperplasia intensas dos macrófagos medulares. A carga parasitária presente nos linfonodos infartados não tem correlação direta com o tipo da doença e com a severidade das lesões encontradas em outros órgãos (LIMA et al., 2004). A esplenomegalia também está relacionada com o aumento da quantidade de macrófagos, além de ocorrer também devido à neovascularização formada na polpa do baço e ao aumento das fibras reticulares esplênicas (ALEXANDRE-PIRES et al., 2006).

Lesões oculares como uveíte anterior, conjuntivite, ceratoconjuntivite seca, blefarite podem acontecer em separado ou concomitantemente. Tais lesões estão presentes como o único sinal clínico em 16% dos cães sintomáticos (NARANJO et al., 2005).

Aparentemente, todos os cães com LVC têm alguma alteração renal. E, em alguns casos, a doença renal pode ser a única alteração aparente em cães infectados. Costa et al. (2003) observou histopatologicamente a presença de glomerulonefrite em 100% dos 55 cães com LVC avaliados, dentre os quais 13 eram assintomáticos, 78% apresentavam nefrite intersticial e 91% apresentavam deposição glomerular do antígeno do parasita. A doença renal pode apresentar-se apenas com proteinúria, entretanto, pode progredir para um quadro de síndrome nefrótica ou insuficiência renal crônica com glomerulonefrite, nefrite túbulo intersticial e amiloidose. A glomerulonefrite pode ser associada também à deposição renal de imunocomplexos. Apesar da grande prevalência da doença renal, a azotemia só se torna evidente quando mais de 70% dos néfrons estão afuncionais, o que acontece quando a doença já alcançou estágios avançados (BANETH et al., 2008).

### 2.1.6 Aspectos laboratoriais

Dentre os achados laboratoriais encontram-se anemia, trombocitopenia, leucopenia ou leucocitose, azotemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e proteinúria. O aumento da atividade das enzimas hepáticas pode ocorrer em casos de lesão ou obstrução hepática (BRAVO et al., 1993; KONTOS e KOUTINAS, 1993).

#### 2.1.6.1 Alterações hematológicas

A anemia está presente na maioria dos cães sintomáticos e pode ocorrer por vários motivos, como a anemia da doença inflamatória, a anemia hemolítica imunomediada, a deficiência de eritropoietina em casos de cães já em insuficiência renal crônica ou as hemorragias (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999). No caso da anemia da doença inflamatória, a anemia ocorre como uma resposta do hospedeiro a um estímulo inflamatório, mediada pela liberação de citocinas durante a inflamação (WANER e HARRUS 2000). Estas citocinas agem diminuindo da disponibilidade do ferro, a vida média das hemácias e a taxa de eritropoiese com o objetivo de evitar a utilização do ferro pelas bactérias culminando em uma anemia discreta, geralmente arregenerativa normocítica e normocrômica que pode variar em intensidade de intensa a moderada (FERRER, 1992; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; MATTOS et al., 2004). Acredita-se que esta anemia tenha como principal mecanismo a anemia da inflamação, embora a insuficiência renal, perda de sangue (epistaxe, perda gastrointestinal) devido a trombocitopenia, e possivelmente uma alteração medular possam contribuir para esta síndrome (FERRER, 1992; KONTOS e KOUTINAS, 1993).

Em relação ao leucograma, os cães com LVC podem apresentar desde leucometria global com valores dentro da normalidade (TRYPHONAS et al., 1977) até leucocitose ou leucopenia (BANETH, 2006). Tryphonas et al. (1977) relataram eosinopenia relativa, monocitose moderada em um cão com LVC.

Sinais de hemorragia como epistaxe, hematúria, perda de sangue pelas fezes podem ocorrer devido a alterações hemostáticas, sendo a trombocitopenia uma dos achados mais frequentes (BANETH et al., 2008). Pode haver aumento do tempo de trombina e dos produtos de degradação da fibrina, além de trombocitopatias com

resposta diminuída à agregação plaquetária, porém, o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada podem estar dentro dos valores de referência o que caracteriza um quadro inicial de coagulação intravascular disseminada (CID) induzido pela infecção pela *Leishmania* (VALLADARES et al. 1998).

#### 2.1.6.2 Alterações nas proteínas séricas

Os animais com LVC apresentam, em sua maioria (70-90%), hiperproteinemia, isto é, aumento dos níveis de proteínas séricas totais (KOUTINAS et al., 1999). A hiperproteinemia está associada, geralmente, à hiperglobulinemia (MEYER e HARVEY, 2004), que pode ser atribuída à gamopatia policlonal encontrada comumente na LVC gerada pela forte resposta imune humoral causada por esta doença, levando à produção de grande quantidade de diversas imunoglobulinas. Entretanto, alguns animais com LVC podem apresentar gamopatia monoclonal, devido à intensa proliferação de plasmócitos e produção de apenas um clone de imunoglobulinas (FONT, 1996). A hiperglobulinemia pode ocorrer também devido ao aumento das concentrações séricas das proteínas de fase aguda, observada a partir do aumento das bandas das  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas no perfil eletroforético, já que a LVC induz forte resposta inflamatória por parte do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2005). Entretanto, o aumento de globulinas quase sempre está associado à hipoalbuminemia geralmente atribuída à baixa ingestão protéica, nos casos de animais em anorexia ou má-nutrição prolongadas, à perda, nos casos de animais com nefropatia ou à deficiência na produção, nos casos de animais com insuficiência hepática. A hipoalbuminemia pode ocorrer também pela inibição da produção de albumina pelo fígado mediada pela liberação de citocinas inflamatórias, já que a albumina é considerada uma proteína de fase aguda negativa, processo denominado hipoalbuminemia compensatória e que ocorre como uma tentativa do organismo de evitar a hiperviscosidade plasmática já que há um aumento de globulinas (KANEKO, 1997). Entretanto, alguns animais podem apresentar níveis séricos de albumina normais. Em algumas situações, os valores diminuídos de albumina compensam o aumento nos valores de globulinas, podendo acarretar em

um valor normal de proteínas totais (WERNER et al., 2004; BINHAZIM et al., 1992; KOUTINAS et al., 1999).

#### 2.1.7 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da LVC pode ser realizado através de diagnóstico parasitológico ou de diagnóstico sorológico. O diagnóstico parasitológico, considerado conclusivo, baseia-se na identificação de formas amastigotas em aspirados de linfonodos, medula óssea, baço, ou fígado corados por Giemsa ou no isolamento do parasito em cultura de formas promastigotas no meio de Novy-MacNeal-Nicolle a temperatura ambiente (BRAVO et al., 1993) utilizando as mesmas amostras citadas acima. Entretanto, no caso da visualização de formas amastigotas do parasito, a técnica detecta tais formas amastigotas em apenas 60% dos animais infectados, no caso de aspirado de medula óssea e em apenas 30% deles, no caso de aspirado de linfonodos. Esta sensibilidade diminui mais ainda quando o cão apresenta a LVC sub-clínica (MIRÓ et al, 2008). O isolamento do parasito através da cultura de formas promastigotas é considerado prova-ouro (MADEIRA et al., 2006). Madeira et al. (2006) confirmaram a presença de espécies do gênero *Leishmania* através da cultura em 80,3% dos animais sororretores para *Leishmania* sp. com titulação acima de 1:40 na RIFI. O parasito também pode ser evidenciado em lesões cutâneas através de “imprint” da lesão (ROSYPAL et al., 2003). Não é freqüente a visualização do parasito no sangue periférico através de hemogramas de rotina (FOGLIAMANZILLO et al., 2005). Outro método utilizado é a avaliação histológica de biopsias, porém de baixa sensibilidade. Devido à grande variabilidade dos sinais clínicos apresentados e à baixa sensibilidade dos exames de detecção direta do parasita, outros testes, como a detecção do DNA da *Leishmania* por reação de polimerase em cadeia (PCR) também foram desenvolvidos. Já o diagnóstico sorológico detecta a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro. Dentre eles estão a aglutinação direta, hemaglutinação passiva, imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2002). Entretanto, os métodos sorológicos podem acarretar em resultados falso-positivos, em casos de reação cruzada com outros protozoários como o *Trypanosomazi cruzi* ou casos de leishmaniose tegumentar americana LTA (MADEIRA et al, 2006).

### 2.1.8 Prevenção

A prevenção baseada no controle do flebotomíneo é considerada capaz de bloquear o ciclo da *Leishmania* e prevenir a disseminação das doenças canina e humana. O combate ao flebotomíneo pode ser realizado através de compostos repelentes ou inseticidas como os piretróides utilizados no ambiente sob a forma de “spray” para dedetização. No cão, a deltametrina mostrou-se um componente eficaz no combate às picadas do vetor sob a forma de coleira repelente e inseticida (MIRÓ et al, 2008). Gavvani et al. (2002) mostraram que o uso da coleira impregnada por deltametrina reduziu a soroconversão em cães e crianças numa área endêmica na Índia, o que prova que diminuindo a infecção canina, reduz-se também a transmissão para a população humana. A utilização de inseticidas tópicos a base de piretróides nos cães e de medidas de prevenção indiretas como o uso de redes de proteção nas janelas e portas também podem ser usados com o objetivo de reduzir a taxa de infecção (MIRÓ et al, 2008).

Devido à grande importância zoonótica da LVC no Brasil o Ministério da Saúde recomenda a eutanásia dos cães quando soropositivos para antígenos de *L.(Leishmania) chagasi* a partir da metodologia da RIFI com titulação acima de 1:40, medida que funciona também como profilaxia da doença (DA SILVA et al., 2005).

### 2.1.9 Tratamento

O tratamento da LVC canina não é permitido no Brasil, por se tratar de um país com múltiplas áreas endêmicas que têm aumentado conforme o passar dos anos em quantidade e em número de casos por área, já que não há evidências de que o tratamento canino resulte na diminuição da carga parasitária e na retirada do estado de portador. Ou seja, não há comprovações de que o tratamento elimine a capacidade do cão de, quando picado por um flebotomíneo, transmitir o protozoário ao vetor (MIRÓ, 2008). Recentemente, O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicou a Portaria Interministerial MS/MAPA Nº 1.426, de 11 de julho de 2008 que proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos

de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Em outros países é permitida a utilização de protocolos terapêuticos baseados em drogas únicas ou associadas como antimoniato de meglumina, alopurinol e anfotericina B, entretanto, todos os protocolos têm um custo alto (ALVAR et al. 1994). É importante ressaltar que, mesmo utilizando-se esquemas terapêuticos rígidos e realizando o acompanhamento sistemático do animal por um médico veterinário especialista, o tratamento não alcança grande sucesso, podendo causar, no cão, exacerbação dos sinais clínicos e recidiva pós-tratamento. Outro fator implicante é o risco de seleção de cepas de *Leishmania* resistentes ao medicamento a partir da utilização em cães (LUNA, 2005).

#### 2.1.10 Correlação da LVC com a Ehrliquiose

Por tratar-se de uma doença crônica e que induz forte estímulo antigênico, a ehrliquiose pode apresentar alguns sinais e sintomas clínicos e alterações laboratoriais semelhantes aos observados na LVC. A ehrliquiose canina é uma doença crônica causada por bactérias do gênero *Ehrlichia* e transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (GROVES et al., 1975; WOODY e HOSKINS, 1991; RIKIHISA, 1991; NEER, 1998; BREITSCHWERDT, 2000). Sua apresentação clínica divide-se em aguda, subclínica e crônica de acordo com a resposta do hospedeiro ao parasita (BREITSCHWERDT, 2000).

A sintomatologia clínica da ehrliquiose canina na fase aguda inclui febre, anorexia, perda de peso, edema de membros, vômitos, linfadenopatia, epistaxe, edema de membros e escroto, perda de peso acentuada, equimoses no abdome, petéquias em mucosas, melena e hifema (NEER e HARRUS, 2006). Já na fase subclínica, os animais não costumam apresentar sintomatologia evidente (ALMOSNY e MASSARD, 2002). Na fase crônica os sinais e sintomas da fase aguda podem estar presentes podendo ainda ocorrer infecções secundárias como pneumonia, glomerulonefrite, insuficiência renal, artrite, polimiosite e ataxia. (ALMOSNY, 1998).

Laboratorialmente a ehrliquiose causa alterações hematológicas como anemia, trombocitopenia e hiperglobulinemia. (KUEHN e GAUNT, 1985). Monocitose

persistente, assim como linfocitose, trombocitopenia e anemia não regenerativa são características proeminentes (HOSKINS, 1991). Pode ocorrer pancitopenia geralmente por hipoplasia da medula óssea na fase crônica acentuada (WOODY e HOSKINS, 1991; NEER, 1998).

Os cães com ehrliquiose apresentam, em sua maioria, hiperproteinemia, associada, geralmente, à hiperglobulinemia (MEYER e HARVEY, 2004), que pode ser atribuída à gamopatia policlonal encontrada na ehrliquiose, que induz um forte estímulo antigênico. Entretanto, alguns animais com ehrliquiose podem apresentar gamopatia monoclonal, devido à intensa proliferação de plasmócitos (BREITSCHWERDT, 2000). Pode haver hipoalbuminemia geralmente atribuída à inflamação, já que a albumina é uma proteína de fase aguda negativa, à baixa ingestão, nos casos de animais em anorexia ou à perda, nos casos de animais com nefropatia. Entretanto, alguns animais podem apresentar níveis séricos de albumina normais. (WERNER et al., 2004). No perfil eletroforético, além das gamopatias, podemos observar aumento nas bandas das  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas, devido à resposta inflamatória aguda induzida pela ehrliquiose (RIKIHISA et al, 1994).

Em relação às proteínas de fase aguda (PFA's), Rikihisa et al. (1994) observaram um aumento de proteína C reativa (CRP) a partir do segundo até o 22º dia após infecção experimental por *Ehrlichia canis*. O ápice deste aumento ocorreu no quarto dia de infecção, no qual a CRP aumentou quatro vezes acima dos valores de referência. Os estudos realizados mostram que algumas PFA's podem ser ferramentas úteis na caracterização da ehrliquiose como clínica ou subclínica, além de auxiliarem na determinação do prognóstico e na avaliação da remissão dos sinais clínicos, quando submetidos ao tratamento. (NEER e HARRUS, 2006).

## 2.2 PROTEÍNAS SÉRICAS

As proteínas séricas consistem em centenas de proteínas diferentes, com variadas funções e estruturas (THOMAS, 2000). Algumas delas estão associadas a outras substâncias, formando as lipoproteínas e as glicoproteínas. A diferença entre as proteínas plasmáticas e as proteínas séricas encontra-se no consumo do fibrinogênio e alguns fatores de coagulação de estrutura protéica durante a coagulação acarretando na diminuição destes componentes no soro (STOCKHAM e

SCOTT, 2002). As proteínas séricas são divididas em albumina e em  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$  globulinas, baseado nos princípios da eletroforese. Na faixa das  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas, encontramos proteínas como o fibrinogênio e outras proteínas de fase aguda, além de componentes do sistema complemento, fatores da coagulação, entre outras. Já as  $\gamma$  globulinas são representadas pelas imunoglobulinas. (KANEKO, 1997). Com exceção das imunoglobulinas que são produzidas nos órgãos linfóides (THOMAS, 2000), as proteínas são produzidas no fígado. Dentre as funções mais importantes, estão a manutenção da pressão oncótica do sangue, e o transporte de íons, nutrientes, hormônios e produtos do metabolismo, além de realizarem um importante papel durante as reações de defesa do organismo, como no caso das imunoglobulinas e proteínas de fase aguda (MEYER e HARVEY, 2004).

### 2.2.1 Albumina

A albumina é a principal constituinte das proteínas séricas, por ser a proteína presente em maior quantidade no soro. A albumina é a menor das moléculas de proteínas e sua principal função é a manutenção da pressão oncótica do sangue, que evita o extravasamento do líquido de dentro dos vasos para os tecidos (MEYER e HARVEY, 2004). Além disso, a albumina também é uma proteína carreadora e possui um papel importante no transporte plasmático de ácidos graxos livres, ácidos biliares, bilirrubina indireta, cálcio, hormônios e drogas. A albumina é sintetizada pelo fígado, liberada no sangue, onde desempenha suas funções e é catabolizada por vários tecidos. Sua vida-média é de aproximadamente oito dias nos cães (LASSEN, 2004).

A diminuição da concentração sérica de albumina denomina-se hipoalbuminemia e pode ocorrer devido ao excesso de hidratação, por perda de albumina pelo organismo, através de hemorragias, perdas renais, enteropatias parasitismo gastrointestinal ou exsudação profunda como no caso de queimaduras cutâneas extensas (MEYER e HARVEY, 2004). Outras causas de hipoalbuminemia incluem a perda para o terceiro espaço ou para o tecido subcutâneo, diminuição da síntese de albumina pelo fígado, em casos de insuficiência hepática ou diminuição da ingestão, digestão ou absorção protéicas (LASSEN, 2004).

Já a hiperalbuminemia, aumento da concentração sérica de albumina, ocorre somente em casos de desidratação, quando há diminuição da parte aquosa do sangue por perdas, há por consequência concentração de albumina (LASSEN, 2004).

### 2.2.2 Globulinas

As globulinas são um grupo heterogêneo de proteínas que variam em tamanho, sendo sempre maiores que a albumina. Neste grupo encontram-se os diversos tipos de anticorpos, proteínas do sistema complemento, fatores de coagulação, enzimas, e proteínas carreadoras de lipídeos, vitaminas, hormônios, hemoglobina e íons metálicos como o cobre e o ferro (ECKERSALL, 2008).

A diminuição da concentração sérica das globulinas é denominada hipoglobulinemia e pode ocorrer nas mesmas situações nas quais ocorre a hipoalbuminemia por perda, como nas hemorragias, perdas renais, enteropatias, parasitismo gastrointestinal ou exsudação cutânea profunda. A hipoglobulinemia sem hipoalbuminemia ocorre apenas em situações em que há diminuição de  $\beta$  ou  $\gamma$  globulinas, já que a diminuição das  $\alpha$  globulinas somente não é capaz de diminuir a concentração das globulinas como um todo. As causas de diminuição da concentração de  $\gamma$  globulinas são a falha na transferência passiva pelo colostro ou em casos de doenças imunossupressoras (MEYER e HARVEY, 2004).

A hiperglobulinemia, ou seja, o aumento da concentração sérica das globulinas ocorre por desidratação, normalmente acompanhada do aumento de albumina. A hiperglobulinemia associada à concentração sérica de albumina normal ou diminuída pode ocorrer por diversas causas, dependendo da faixa de globulinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) causadora do aumento. Em casos de aumento na concentração de  $\alpha$  globulinas, a causa mais comum é a presença de um quadro inflamatório, já que as proteínas de fase aguda haptoglobina, ceruloplasmina e  $\alpha_2$  macroglobulina estão presentes nesta faixa de proteínas. As  $\beta$  globulinas também costumam aumentar seus níveis sérios em condições inflamatórias. Mas, também aumentam em outras situações como na síndrome nefrótica, na doença hepática aguda, e nas respostas imunes. O aumento dos níveis séricos das  $\gamma$  globulinas é denominado gamopatia. As gamopatias são classificadas em monoclonal ou policlonal, de acordo com o tipo de

resposta imune estabelecida pelo organismo frente a cada estímulo (ECKERSALL, 2008).

As gamopatias policlonais representam um aumento heterogêneo na produção de anticorpos, ou seja, imunoglobulinas produzidas por uma população mista de linfócitos B e plasmócitos. Esta alteração é observada no traçado eletroforético como um aumento com vários ápices ou com apenas um ápice de base larga na região das  $\gamma$  globulinas e podem ocorrer em doenças que acarretam em forte estímulo antigênico crônico, como piodermatite, dirofilariose, ehrliquiose, neoplasias linfóides ou distúrbios imunomediados. Já as gamopatias monoclonais representam um aumento homogêneo da produção de anticorpos, ou seja, aumento de apenas um tipo de imunoglobulinas, produzida por apenas um clone de linfócito B ou plasmócito. Esta alteração é descrita na eletroforese de proteínas através do aumento de  $\gamma$  globulinas com apenas um ápice longo e comprido. A maioria das gamopatias monoclonais é consequência de uma proliferação neoplásica de linfócitos da linhagem B, como mieloma múltiplo, plasmocitoma, linfoma e leucemia linfocítica crônica (MEYER e HARVEY, 2004). Porém, há relatos de ocorrência de gamopatia monoclonal em animais com afecções não-neoplásicas que levem à intensa proliferação de plasmócitos, como no caso de ehrliquiose, leishmaniose e gastroenterocolite plasmocitária no cão (FONT, 1996; GIRAUDEL et al., 2002; LASSEN, 2004).

### 2.3 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS

A eletroforese de proteínas é a técnica mais comumente utilizada para o fracionamento completo das proteínas séricas. Este fracionamento é importante, pois reflete as várias mudanças que ocorrem nas proteínas séricas em cada doença. Poucas alterações no perfil eletroforético podem servir de diagnóstico específico para algumas doenças (KANEKO, 1997), entretanto, a eletroforese de proteínas séricas é uma informação extremamente útil na medicina veterinária, como em casos de aumento de proteína sérica total. Com exceção da desidratação, um aumento nos valores de proteína sérica total, geralmente, indica aumento na concentração de imunoglobulinas. Já que, mesmo quando as  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas aumentam significativamente, esse aumento não possui magnitude suficiente para

aumentar a concentração de proteínas totais no soro. Portanto, a eletroforese é um bom instrumento para detectar esses aumentos além de ser de grande utilidade na classificação das hipergamaglobulinemias. (MEYER e HARVEY, 2004). Entretanto, se for necessário, outros métodos de detecção individual das diferentes proteínas podem ser utilizados (THOMAS, 2000).

O princípio da separação de proteínas pela eletroforese é baseado na migração das proteínas no gel de acordo com a sua carga elétrica durante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico. A direção e a taxa de migração das partículas baseia-se no tipo de carga da proteína (positiva ou negativa), no seu peso molecular ou tamanho, na intensidade do campo magnético e no tipo de meio utilizado, pelo qual as partículas proteicas são induzidas a migrar (KANEKO, 1997). No soro dos animais domésticos, a albumina é a proteína capaz de migrar até o ponto mais distante, devido ao seu baixo peso molecular e sua carga extremamente negativa (STOCKHAM e SCOTT, 2002). As globulinas são grupo heterogêneo de proteínas de carga fracamente negativa. Elas migram numa taxa menor que a albumina, e geralmente se agrupam em três regiões diferentes, das  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$  globulinas. A região das  $\alpha$  globulinas é mais distante, a das  $\beta$  globulinas, uma região intermediária, e a das  $\gamma$  globulinas, a região mais próxima à origem (JAIN, 1993).

Existem vários métodos de eletroforese que se distinguem apenas pelo tipo de meio de suporte utilizado (KANEKO, 1997). Em meados do século XX o meio mais comumente utilizado para esta finalidade era a membrana de acetato de celulose (KOHN, 1957). Já nos anos 90, a técnica de eletroforese em gel de agarose foi implementada e tornou-se mais popular junto aos laboratórios de diagnóstico. Há ainda outra técnica baseada no gel de poliacrilamida como meio de separação (ECKERSALL, 2008). Com o passar dos anos, outras técnicas foram desenvolvidas. Com o advento da eletroforese bidimensional associada às técnicas proteômicas é possível separar as proteínas não apenas em bandas ou grupos, mas, identificando centenas delas individualmente. Entretanto, esta metodologia ainda é bastante recente, necessitando de maior validação para as espécies animais. O meio mais comumente utilizado em medicina veterinária é o gel de agarose, derivado de algas marinhas, já que é relativamente fácil de usar e oferece resultados confiáveis (MATTHEWS, 1982, BAKER e VALLI, 1988). Além de sofrer interferência do meio de suporte, a taxa de migração sofre interferência do pH, da osmolaridade e da

composição iônica do tampão utilizado, além da força do campo magnético aplicado ao tampão onde se localiza o gel (THOMAS, 2000). A eletroforese é normalmente realizada sob pH alcalino, no qual a maioria das proteínas adquire carga negativa. As moléculas de maior carga negativa movem-se em direção ao anodo (pólo positivo) quando a corrente elétrica passa através da solução (ECKERSALL, 2008).

## 2.4 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

A resposta inflamatória aguda é uma reação inespecífica do hospedeiro que ocorre rapidamente após a uma injúria tecidual de causa inflamatória, infecciosa, imune, neoplásica ou traumática. O propósito desta resposta é restabelecer a homeostase e remover a causa do distúrbio presente. Compõe o sistema de defesa do organismo, sendo responsável pela sobrevivência do animal nos estágios iniciais de uma inflamação, ou seja, antecedendo a resposta imune. As proteínas de fase aguda são apenas um dos efeitos causados pela resposta inflamatória aguda, que incluem também febre, leucocitose, aumento do cortisol sangüíneo, diminuição das concentrações de tiroxina, alterações metabólicas, como lipólise, gliconeogênese e catabolismo muscular e diminuição das concentrações séricas de ferro e zinco (CÉRON et al., 2005).

A lesão tecidual leva à liberação de citocinas inflamatórias como interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Estas citocinas agem no fígado estimulando a produção e a liberação das chamadas proteínas de fase aguda (PFA) positivas, o que conseqüentemente, leva a um aumento da concentração sérica das mesmas. Outras proteínas como a albumina e a transferrina são consideradas PFA's negativas, por diminuírem durante a resposta inflamatória aguda (THOMAS, 2000). Dentre as PFA's positivas estão o fibrinogênio, a haptoglobina, a ceruloplasmina, o amilóide A sérico, a proteína C reativa, a  $\alpha$ -2 macroglobulina e a glicoproteína ácida  $\alpha$ -1 (MEYER e HARVEY, 2004).

No início de doenças inflamatórias e infecciosas, as PFA's positivas se elevam no soro, se mantêm elevadas no decorrer da doença e diminuem seus níveis em resposta ao tratamento. Portanto, são bons marcadores de diagnóstico, prognóstico e de monitorização do tratamento (MARTÍNEZ-SUBIELA, et al. 2003). Há relatos de aumento das PFA's positivas também após a vacinação (GRUYS et al., 2005).

Em cada uma das espécies animais, as PFA's positivas possuem repostas discretas, moderadas e intensas. As PFA's de resposta intensa possuem concentrações baixas no soro de animais normais e elevam-se cerca de 100 a 1000 vezes acima deste valor quando há algum estímulo inflamatório, alcançando seu pico máximo de resposta em 24 a 48 horas após o estímulo e diminuindo rapidamente durante a convalescência. No cão, as PFA's de resposta intensa são a proteína C reativa e o amiloide A sérico. Já as PFA's de resposta moderada são aquelas que estão presentes no soro de animais normais e elevam-se cerca de 5 a 10 vezes acima deste valor quando há algum estímulo inflamatório, alcançando seu pico máximo de resposta em dois a três dias após o estímulo e diminuindo seus níveis de maneira mais suave do que as PFA's de resposta intensa. Exemplos de PFA's de resposta moderada no cão são a glicoproteína ácida  $\alpha$ -1, a haptoglobina e a ceruloplasmina. No caso das PFA's de resposta discreta, a elevação nos níveis séricos frente a algum estímulo inflamatório ocorre gradualmente e a elevação é apenas de 50 a 100% do seu valor basal (ECKERSALL, 2008).

Várias proteínas de fase aguda já foram descritas nos cães como a ceruloplasmina, a haptoglobina, o amiloide A sérico, a glicoproteína ácida  $\alpha$  1 e a proteína C reativa (CÉRON et al., 2005).

Há vários métodos disponíveis para a determinação da atividade sérica das proteínas de fase aguda (CÉRON et al., 2005). Algumas delas, como a haptoglobina e a ceruloplasmina podem ser determinadas através de métodos colorimétricos por espectrofotometria, o que facilita sua determinação já que não há a necessidade da utilização de anticorpos espécie-específicos (SOLTER et al., 1991). Já outras proteínas de fase aguda como o amiloide A sérico e a CRP não possuem testes colorimétricos desenvolvidos para a determinação de sua atividade sérica. Há apenas testes imunológicos envolvendo a utilização de anticorpos espécie-específicos como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), o ensaio imunoturbidimétrico e a aglutinação passiva em látex (ECKERSALL et al., 1991; PARRA et al., 2006). Entretanto, não há disponibilidade comercial da maioria destes testes no Brasil e, quando existe esta disponibilidade, o custo da importação destes "kits" é muito alto, inviabilizando sua utilização para a rotina clínica. Há ainda, disponíveis no Brasil, testes imunológicos variados para a determinação das proteínas de fase aguda humanas, contudo, sua utilização para a maioria das espécies animais não é recomendada, já que há diferenças estruturais entre tais

proteínas animais e humanas, causando reações cruzadas com outras proteínas e, conseqüentemente, alterando a especificidade do teste.

#### 2.4.1 Haptoglobina

A haptoglobina é uma glicoproteína com peso molecular de 81 kD no cão. É composta por quatro subunidades, duas  $\alpha$  e duas  $\beta$ , formando uma cadeia com a seguinte conformação  $\beta-\alpha-\alpha-\beta$ . É o maior componente das  $\alpha_2$  globulinas identificadas por eletroforese (CERÓN et al., 2005). Seu papel no organismo animal é de ligação com a hemoglobina livre no sangue em casos hemolíticos intravasculares, impedindo sua ação tóxica nos túbulos renais e indisponibilizando o ferro contido na hemoglobina para o crescimento bacteriano (EATON et al., 1982). A haptoglobina previne também as lesões oxidativas teciduais ao ligar-se à hemoglobina livre, já que a hemoglobina possui grande capacidade oxidativa (YANG et al., 2003). O complexo formado pela haptoglobina ligada à hemoglobina é reconhecido rapidamente pelo sistema monocítico fagocitário através do receptor CD163 dos macrófagos, que remove o complexo da circulação (GRAVERSEN et al., 2002). Além disso, inibe os processos de fagocitose e quimiotaxia dos neutrófilos, atuando como um modulador da resposta inflamatória (MEYER e HARVEY, 2004). Segundo Murata e Miyamoto (1993), a haptoglobina pode estar associada a efeitos imunomodulares, inibindo a blastogênese dos linfócitos.

Em cães, o aumento dos níveis séricos de haptoglobina está relacionado às hepatites crônica e aguda, administração de cortisol exógeno, além de doenças inflamatórias, neoplásicas e auto-imunes. A diminuição da haptoglobina no cão ocorre em cirrose terminal, hemólise aguda e formação de hematomas (THOMAS, 2000; CERÓN et al., 2005). A mensuração da haptoglobina no cão é um parâmetro mais sensível do que a dosagem de fibrinogênio plasmático e a contagem de leucócitos em relação à avaliação da resposta inflamatória aguda (SOLTER et al., 1991).

A determinação de haptoglobina canina pode ser realizada através de metodologias que envolvem uma reação antígeno-anticorpo, como a imunofluorometria, desenvolvida para a determinação da atividade sérica da haptoglobina, mas também se aplica ao sangue total e à saliva (PARRA et al.,

2005). Já outras técnicas como o “immunoblotting” associado à incidência isoelétrica a partir da eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida também são capazes de identificar e determinar a concentração da haptoglobina canina (ANDERSON e SEVELLIUS, 2001). Entretanto, o teste mais difundido e mais comumente utilizado para a determinação da atividade sérica da haptoglobina, apesar da pouca estabilidade dos reagentes e do tempo longo de realização do teste, é o teste colorimétrico já que não necessita de um anticorpo específico contra a haptoglobina canina. O princípio do teste baseia-se na capacidade da haptoglobina ligar-se à hemoglobina, formando um complexo que altera a absorvância inicial da hemoglobina livre na mesma proporção da quantidade de haptoglobina presente na amostra de soro (ECKERSALL et al., 2008). A técnica foi descrita por Elson (1974) para a determinação no soro de pacientes humanos e validada por Harvey (1986) para a utilização no soro de pacientes da espécie canina.

#### 2.4.2 Ceruloplasmina

A ceruloplasmina é uma glicoproteína componente das  $\alpha_2$  globulinas (MEYER e HARVEY, 2004). Não há relatos de sua estrutura molecular nos cães, mas nos seres humanos, possui um peso molecular de 151kD (CERÓN et al., 2005). Sua função principal no organismo animal é o transporte de cobre no sangue, além disso, a ceruloplasmina possui uma atividade de ferroxidase, facilitando a oxidação do ferro da forma ferrosa ( $Fe^{+2}$ ) para a forma férrica ( $Fe^{+3}$ ), importante na mobilização do ferro dos estoques teciduais (MEYER e HARVEY, 2004). A ceruloplasmina também possui outro papel antioxidante importante em situações inflamatórias, protegendo os tecidos do oxigênio tóxico liberado no metabolismo das células fagocíticas durante os quadros inflamatórios (CÉRON e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2004).

No cão, o aumento dos níveis séricos de ceruloplasmina está relacionado à inflamação e ao trauma tecidual, já em bovinos, sua diminuição pode estar associada à deficiência de cobre decorrente de deficiência nutricional (THOMAS, 2000). Em cães com diversas condições espontâneas, o aumento sérico da concentração de ceruloplasmina foi mais sensível do que a determinação do fibrinogênio plasmático e do que a contagem de leucócitos, porém, foi menos

sensível do que a mensuração dos níveis séricos de haptoglobina na detecção de doenças inflamatórias diversas (SOLTER et al., 1991).

A determinação da ceruloplasmina pode ser realizada a partir da capacidade de ferroxidase desta proteína (CÉRON e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2004). Vários substratos foram utilizados na medicina humana com esta finalidade como a parafenilendiamina (SUNDERMAN e NOMOTO, 1970; HENRY et al, 1960), e dicloridrato de ortodianisidina (SCHOSINSKY et al., 1974). Entretanto, apenas a metodologia baseada na capacidade de oxidação da parafenilendiamina pela ceruloplasmina foi modificada e adaptada à determinação da ceruloplasmina em soros de animais da espécie canina (SOLTER et al., 1991). O princípio deste método baseia-se na capacidade da ceruloplasmina catalisar a oxidação da parafenilendiamina formando um componente de coloração lilás. A intensidade da coloração formada é proporcional à concentração de ceruloplasmina na amostra (SUNDERMAN e NOMOTO, 1970).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM

Foram utilizadas amostras sanguíneas de 95 animais da espécie canina divididos em dois grupos. O grupo I era composto por 75 cães de raças variadas que apresentaram anticorpos IgG para *Leishmania* sp., no qual foram consideradas sororreatoras as amostras que apresentaram fluorescência em diluições iguais ou maiores que 1:40 pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). A RIFI foi realizada no Serviço de Parasitologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) – da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), segundo as especificações do fabricante (Biomanguinhos/ FIOCRUZ/MS). O grupo II foi composto por 20 animais sadios de raças variadas apresentando sorologia negativa para Leishmaniose pelo método da RIFI. Como a RIFI realizada detecta anticorpos IgG contra *Leishmania*, tanto animais sororreatores para *L. (L.) chagasi* como para *L.(V.) brasiliensis* podem ser detectados. Entretanto, a região estudada possui raros casos de LTA (MADEIRA et al, 2006), além de ser este teste o preconizado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC

Os cães do grupo I eram provenientes de inquérito sorológico para Leishmaniose Visceral realizado no município do Rio de Janeiro, pela Secretaria Municipal de Saúde. Os animais foram submetidos à rotina clínica no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Pequenos Animais – IPEC – Fiocruz conforme o protocolo “Avaliação Parasitológica de Leishmaniose Canina”.

Os cães do grupo II eram provenientes de um arquivo de soros de animais doadores de sangue de um banco de sangue comercial do Rio de Janeiro. Os animais apresentavam-se sadios ao exame clínico no momento da coleta e apresentavam exames laboratoriais hematológicos e bioquímicos séricos de uréia, creatinina, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina dentro dos valores de

normalidade, além de resultado negativo para o teste sorológico para a detecção do antígeno de *Dirofilaria immitis* e dos anticorpos contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* e *Ehrlichia canis*, através do kit comercial Canine SNAP 4Dx (IDEXX, Westbrook, maine USA).

O estudo foi aprovado e conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisas da Fiocruz (CEUA – Fiocruz) P.0195/03 e aguarda o parecer do Comitê de ética de Pesquisa com Animais da Universidade Federal Fluminense (CEPA - UFF), sob o protocolo 007409.

### 3.2 COLETA DE MATERIAL

As amostras de sangue foram obtidas com os cães tranqüilizados com Tiopental Sódico na dose de 12,5mg/kg através de venopunção jugular utilizando sistema de coleta a vácuo evitando-se o garroteamento prolongado e as múltiplas punções, para realização dos seguintes exames laboratoriais:

#### 3.2.1 Hemograma e Reação em cadeia da polimerase para *Ehrlichia* sp.

Foi coletado sangue total em tubos de plástico com capacidade total para 4mL contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%. Após o processamento do hemograma, a amostra de sangue total foi centrifugada a 1.006g por 10 minutos com o objetivo de separar o plasma do material celular sanguíneo. Ambas as parte foram transferidas para frascos tipo eppendorff® e estocadas em temperatura de congelamento a -20°C até a o momento do processamento.

#### 3.2.2 Determinação da concentração sérica de proteínas totais, albumina, globulinas, eletroforese de proteínas, haptoglobina e ceruloplasmina

Foi coletado sangue em tubos de vidro com capacidade total para 10mL sem anticoagulante. Os tubos contendo o sangue foram mantidos à temperatura ambiente até que ocorresse a coagulação sanguínea e retração do coágulo. Em

seguida, os tubos foram centrifugados a 1.006g por 10 minutos para a obtenção do soro sanguíneo. O soro de cada animal foi aliquoteado em quatro frascos tipo eppendorff<sup>®</sup> de acordo com o volume necessário para a realização de cada determinação, evitando-se o congelamento e descongelamento consecutivos da amostra. Em seguida, as amostras foram estocadas em temperatura de congelamento a -20°C até a o momento do processamento.

### 3.3 EXAMES LABORATORIAIS

#### 3.3.1 Hemograma

O hemograma foi realizado no Laboratório Clínico Veterinário de Universidade Federal Fluminense utilizando o contador automático de células Coulter<sup>®</sup> modelo T-890. O hematócrito foi realizado através do método do microhematócrito, a partir do qual também foi obtido o plasma para a determinação das proteínas plasmáticas totais por refratometria. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo de sangue periférico corado por Giemsa segundo técnica descrita por Jain (1993).

#### 3.3.2 Concentrações séricas de proteína total, albumina e globulina

A determinação das concentrações séricas das proteínas totais e da albumina foi realizada no Laboratório Clínico Veterinário de Universidade Federal Fluminense. A concentração sérica das proteínas totais foi determinada através do método colorimétrico do Biureto, utilizando o kit da Labtest<sup>®</sup> (catálogo 99). A leitura das absorbâncias foi realizada no espectrofotômetro semi-automático Bio 200<sup>®</sup>, utilizando comprimento de onda 546nm. A dosagem de albumina sérica foi realizada através do método colorimétrico de ligação ao Verde de Bromocresol utilizando o kit da Labtest<sup>®</sup> (catálogo 19). A leitura das absorbâncias foi realizada no espectrofotômetro semi-automático Bio 200<sup>®</sup>, utilizando comprimento de onda 620nm. O valor das globulinas foi obtido a partir da diferença entre as concentrações séricas das proteínas totais e a da albumina.

### 3.3.3 Eletroforese das proteínas séricas totais

O fracionamento das proteínas séricas totais foi realizado no Setor de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) utilizando o sistema para eletroforese FEA-250 CELM<sup>®</sup> através da técnica de eletroforese em gel de agarose geral (Celmigel – CELM<sup>®</sup>) em tampão TRIS pH 9,5. O fracionamento protéico ocorreu sob 100V em 20 minutos. Após esta etapa, o gel foi retirado da cuba de eletroforese e foi então corado em Negro de amido a 0,1% em ácido acético a 5% por 5 minutos e descorado com ácido acético a 5% por 5 minutos (figura 1). O gel sofreu o processo de secagem com ar quente, permitindo sua posterior leitura por densitometria. A leitura foi realizada utilizando o software para densitometria (SDS-60 CELM<sup>®</sup>), para realizar a leitura, foi necessária a utilização de um “scanner” de mesa Canon 3000EX.

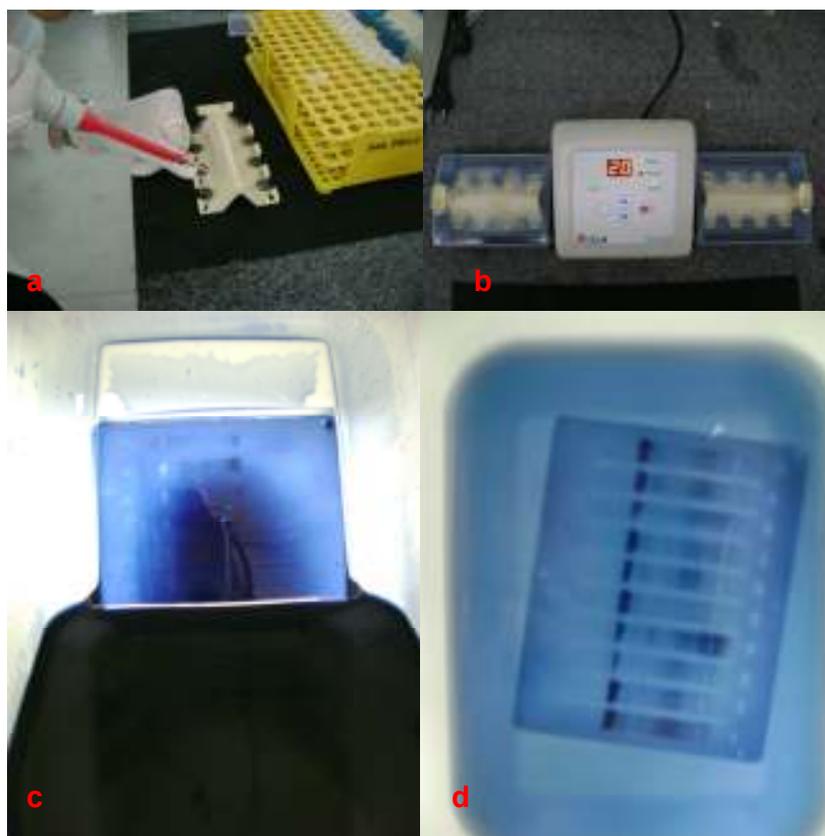


Figura 1 – a. Aplicação da amostra do gel de agarose; b. Início do fracionamento protéico; c. coloração do gel; d. descoloração do gel.

Para a avaliação dos perfis eletroforéticos quando houve aumento da banda das  $\gamma$  globulinas e classificação das gamopatias em monoclonal ou policlonal foi utilizado o critério proposto por Lassen (2004) que classifica o aumento de  $\gamma$  globulinas como gamopatia policlonal quando a base da curva de  $\gamma$  globulinas é maior que a base da curva de albumina ou ainda quando a altura do pico de  $\gamma$  globulinas é menor que o quádruplo da largura da base da curva de  $\gamma$  globulinas.

#### 3.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do genoma de *Ehrlichia* sp.

A PCR foi realizada no Laboratório de Bactérias Enteropatógenicas e Microbiologia de Alimentos do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense. A extração do DNA foi realizada em câmara de fluxo laminar vertical contínuo (VECO-VLFS 9, Campinas, Brasil) utilizando o “kit” comercial “Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit” GE Healthcare® de acordo com as instruções de uso do fabricante do fabricante. O DNA purificado foi congelado à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da utilização para a PCR.

O DNA extraído de cada amostra foi testado para a presença genética de algumas das espécies da família Anaplasmataceae como *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia ruminantium*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Wolbachia pipientis*, *Neorickettsia sennetsu*, *Neorickettsia risticii*, and *Neorickettsia helminthoeca* utilizando os iniciadores ou “primers” EHR16SR e EHR16SD Invitrogen® que amplificam um fragmento do gene codificador da unidade 16S do RNA ribossomal, originando um produto de 345 pares de bases.

Para o preparo da mistura de reativos foram utilizados 0,2mM de dNTPs (trifosfatos desoxirribonucleosídeos - Amersham Biosciences, Piscataway, EUA), 3mM de  $\text{MgCl}_2$ , 20mM de Tampão Tris-HCl pH 9,0 (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA), 12,5pmol de cada primer, 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA), 100mM de KCl, 14,25 $\mu\text{L}$  de “UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water” (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 2,5 $\mu\text{L}$  da

solução contendo previamente o DNA. A reação foi padronizada em volume final de 25 $\mu$ l. (BROWN et al., 2001)

As amplificações foram realizadas em termociclador programável, modelo PTC-100 (MJ Research <sup>TM</sup>, INC, Waltham, EUA). O programa consistia em: passo inicial de desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Foi utilizado um passo final de extensão por 5 minutos a 72 °C.

Para a revelação dos resultados, os produtos obtidos foram acrescidos de 8 $\mu$ L de corante de corrida (solução de azul de bromofenol a 0,25% + glicerol a 60%) e uma alíquota de 10 $\mu$ L desta solução (corante + DNA amplificado) foi adicionada em gel de agarose a 1% e submetida à eletroforese por aproximadamente 60 minutos a 115V em cuba horizontal (CBS Scientific Company Inc. Del mar, EUA). O tampão de corrida era composto por uma solução de Tris a 0,5M – Borato a 0,045M – EDTA a 1mM e pH 8,2 (TBE 1X). Para revelação, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo 0,01% (Introvigen, Brasil) e visualizado em transluminador Ultra-Violeta (Vilber Lourmat modelo TCX20 – M).

Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 1000 pares de base (1 Kb plus). Foram utilizadas amostras controle positivo e negativo para comprovação da eficácia da PCR, evitando um possível erro por contaminação durante o processo. Para o controle positivo foi utilizada amostra de DNA genômico obtido de um cão naturalmente infectado por *A. platys*. Para o controle negativo foi utilizada a mistura de reativos, sem o acréscimo final do DNA. A extração do DNA, a amplificação e a corrida em gel de eletroforese ocorreram em ambientes diferentes a fim de se evitar problemas com contaminação.

### 3.3.5 Determinação da concentração sérica da haptoglobina

A determinação da concentração sérica da haptoglobina foi realizada no Laboratório Didático Multidisciplinar do Hospital Antônio Pedro (HUAP) da Universidade Federal Fluminense através da leitura por espectrofotometria do complexo formado pela ligação da haptoglobina com a hemoglobina no soro sanguíneo, em pH 3,7 e comprimento de onda 407nm, conforme a técnica padronizada por Elson (1974). As soluções foram preparadas utilizando medidor de

pH digital de bancada BEL Engineering® modelo W3B. Para a determinação das absorbâncias foi utilizado o espectrofotômetro Instrutemp® ITUV 1000A (figura 2b) utilizando cubetas de cristal.

A técnica de determinação da haptoglobina consistiu em duas etapas que precediam a etapa de reação. A primeira delas foi o preparo de uma solução de cianometahemoglobina a 60mg/dL a partir de uma amostra de sangue total com EDTA da espécie canina. Para isso, foi necessário centrifugar a 1.006g por 10 minutos cerca de 5mL do sangue com o objetivo de separar o plasma do material celular sanguíneo. O plasma e a camada de leucócitos e plaquetas foram descartados e a papa de hemácias foi lavada três vezes com solução salina tamponada, pH 7,4. As hemácias foram lisadas adicionando água destilada até obter 5mL e 1mL de clorofórmio. Esta mistura foi homogeneizada vigorosamente e, em seguida, centrifugada a 1.006g por 10 minutos para retirar restos de estroma. O material hemolisado foi levado ao “freezer” por três vezes, aguardando o processo de congelamento e descongelamento. Foi realizada a dosagem de hemoglobina do hemolisado utilizando 10mL do reagente de Drabkin ao qual foi adicionado 100µL do hemolisado. Foi realizada a leitura por espectrofotometria a 540nm no espectrofotômetro semi-automático Bio 200® e a concentração da hemoglobina foi calculada utilizando o coeficiente de extinção 1/4mM de 10,7 e peso molecular da hemoglobina de 64,458. A concentração de hemoglobina do hemolisado foi de 61,224g/L. Desta forma, para se obter uma solução a 60mg/dL, foi necessário diluir 0,98mL do hemolisado com água destilada até completar 100mL. Como a dosagem de haptoglobina foi realizada por etapas, o hemolisado foi separado em alíquotas de 0,98mL em frascos tipo eppendorff® e estocado em temperatura de congelamento a -20°C até a o momento da realização das dosagens, quando o hemolisado foi, então descongelado e diluído em água destilada para fazer a solução de cianometahemoglobina a 60mg/dL.

A segunda etapa da técnica de determinação da haptoglobina foi o preparo da solução tampão formato pH 3,5, utilizando solução de ácido fórmico 1M e solução de hidróxido de sódio 1M. Ajustando o pH para 3,5 com o auxílio do medidor de pH. A solução final manteve a molaridade do ácido fórmico e do hidróxido de sódio em respectivamente 0,50 M e 0,25 M.

Para a realização da reação, foi necessário utilizar também solução salina fisiológica (NaCl 0,9%). Para cada amostra a ser dosada, foi necessário utilizar dois

tubos de ensaio, um identificado como “Amostra” (A) e o outro como “Branco” (B). No tubo A foi adicionado 900 $\mu$ L de solução salina fisiológica e 100 $\mu$ L da amostra de soro. No tubo B apenas foi adicionado 900 $\mu$ L de solução salina fisiológica. Ambos os tubos foram homogeneizados e colocados em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Aos dois tubos foram, então, adicionados 500 $\mu$ L de solução de cianometahemoglobina a 60mg/dL. Ambos os tubos foram novamente homogeneizados e recolocados em banho-maria a 37°C por mais 10 minutos. Foi adicionado 1000 $\mu$ L de tampão formato pH 3,7 em ambos os tubos, no tubo B foi, ainda, adicionado 100 $\mu$ L da amostra de soro. Ambos os tubos foram homogeneizados e retirados do banho-maria, aguardando a temperatura ambiente por uma hora até o momento da leitura das absorbâncias (figura 2a).

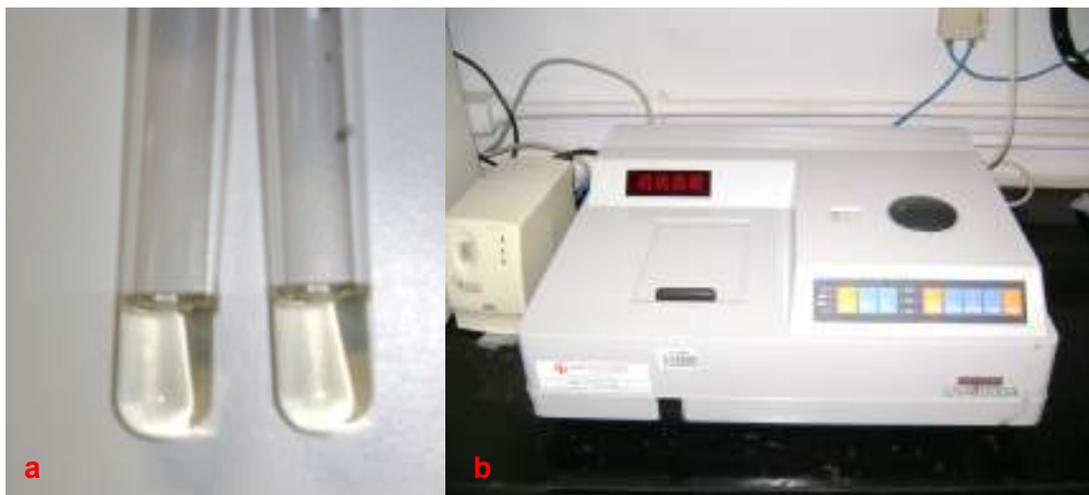


Figura 2 – a. Tubos Branco (esquerda) e Amostra (direita) da Haptoglobina no momento da realização da leitura dos comprimentos de onda; b. Espectrofotômetro Instrutemp<sup>®</sup> ITUV 1000<sup>a</sup>.

Para determinar os comprimentos de onda da leitura, foi necessário realizar a varredura das soluções Branco e Amostra. Para realizar tal varredura foi executada toda a técnica descrita acima utilizando como amostra de soro um “pool” de soros de cinco animais da espécie canina sadios. A leitura foi realizada no espectrofotômetro, determinando a absorbância do branco e da amostra desde o comprimento de onda 350nm até o 410nm, com intervalos de 2nm. O comprimento de onda no qual foi realizada a primeira leitura foi o comprimento de onda de maior absorbância de ambas as soluções (branco e amostra). O ponto onde as curvas das duas soluções

se cruzaram é o ponto isosbético, comprimento de onda da segunda leitura. A partir desta varredura, obteve-se o comprimento de onda de 404nm para a primeira leitura e de 384nm para a segunda leitura.

Foi realizada a leitura da absorbância dos dois tubos em 404nm e em 384nm contra um branco de água destilada. O valor da concentração de haptoglobina é expresso em miligramas de capacidade de ligação da cianometahemoglobina por decilitro (mgHBC/dL). Para converter os valores de absorbância em mgHBC/dL foi necessário multiplicar a diferença das absorbâncias da amostra pelo branco em 404nm diminuída pela diferença das absorbâncias da amostra pelo branco em 384nm pelo fator de correção de 455. O fator de correção é utilizado devido à ausência de um padrão de haptoglobina canina de concentração conhecida. O fator é calculado utilizando-se o coeficiente de extinção diferencial da cianometahemoglobina de 0,011.

$$\text{Haptoglobina (mgHBC/dL)} = 455 \times (\Delta A_{404\text{nm}} - \Delta A_{384\text{nm}}),$$

onde:  $\Delta A_{404\text{nm}}$  = Absorbância da amostra - Absorbância do branco em 404nm

$\Delta A_{384\text{nm}}$  = Absorbância da amostra - Absorbância do branco em 384nm

### 3.3.6 Determinação da concentração sérica da ceruloplasmina

A determinação da concentração sérica da ceruloplasmina foi realizada no Laboratório Didático Multidisciplinar do Hospital Antônio Pedro (HUAP) da Universidade Federal Fluminense através da determinação da taxa de oxidação do p-fenilenodiamino a 37°C em pH 6,0 sob espectrofotometria à 530nm, conforme a técnica padronizada por Sunderman e Nomoto (1970) e modificada para a espécie canina por Solter et al. (1991). As soluções foram preparadas utilizando medidor de pH digital de bancada BEL Engineering® modelo W3B. Para a determinação das absorbâncias foi utilizado o espectrofotômetro Instrutemp® ITUV 1000A, utilizando cubetas de cristal.

A técnica de determinação da ceruloplasmina consistiu em três etapas que precediam a etapa de reação. A primeira delas foi o preparo de uma solução tampão acetato 0,1M, pH 5,7 a partir de 28mL de solução de ácido acético 0,1M e 172mL de solução de acetato de sódio 0,1M.

A segunda foi o preparo de uma solução de azida sódica 0,2mol/L em tampão acetato, adicionando 0,975g de azida sódica em 10mL de tampão acetato. A solução foi estocada em frasco âmbar em temperatura de refrigeração a 4°C.

A terceira etapa consistiu no preparo de uma solução de p-Fenilenodiamina.2HCl 0,25% em tampão acetato, dissolvendo 0,5g de p-Fenilenodiamina em 75,0mL de tampão acetato. O pH foi ajustado para 5,7 adicionando NaOH 1N gota a gota com auxílio do medidor de pH. A solução foi estocada em frasco âmbar e utilizada em até 3 horas após o preparo.

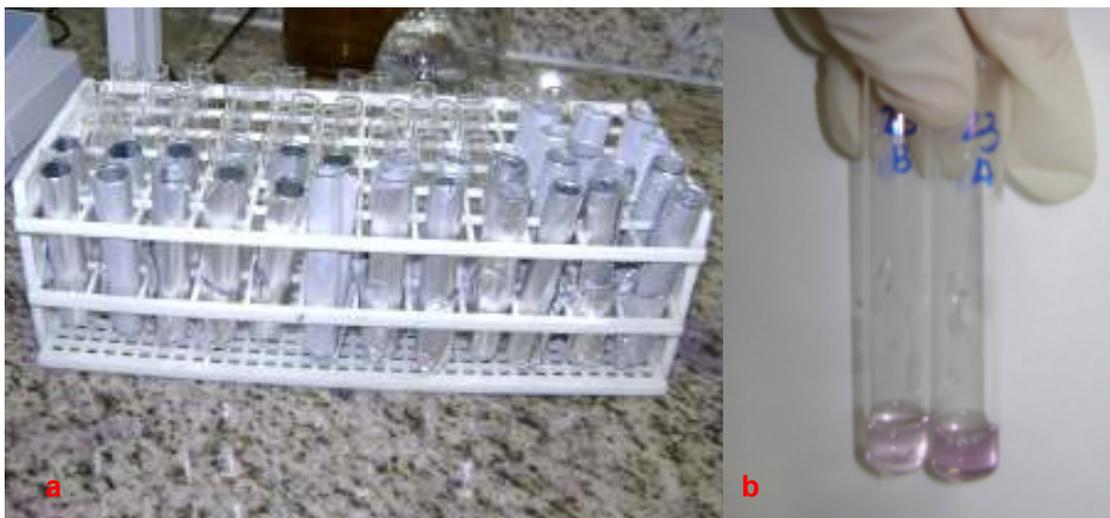


Figura 3 – a. Preparação da proteção contra a luz nos tubos utilizados para a determinação da ceruloplasmina; b. Tubos Branco (esquerda) e Amostra (direita) da Ceruloplasmina no momento da realização da leitura dos comprimentos de onda.

Para a realização da reação, foi necessário utilizar tubos de ensaio protegidos da luz e para isso, cada tubo foi envolvido individualmente em papel laminado (figura 3a). Para cada amostra a ser dosada, foi necessário utilizar 2 tubos de ensaio, um identificado como “Amostra” (A) e o outro como “Branco” (B). Primeiramente, foi adicionado em ambos os tubos 1000 $\mu$ L de tampão acetato 0,2mol/L pH 5,7 e 50 $\mu$ L de amostra de soro. Os tubos foram homogeneizados e colocados em banho-maria a 37°C por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 500 $\mu$ L de solução de p-Fenilenodiamina.2HCl 0,25% em tampão acetato em ambos os tubos que foram novamente homogeneizados e colocados em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Ao tubo B foram, então, adicionados 25 $\mu$ L de solução de azida sódica 0,2mol/L em

tampão acetato. Ambos os tubos foram novamente homogeneizados e recolocados no banho-maria por 30 minutos. Na etapa final, foram adicionados 25 $\mu$ L de solução de azida sódica 0,2mol/L em tampão acetato no tubo A. Ambos os tubos foram homogeneizados e levados ao espectrofotômetro para a determinação das absorbâncias a 530nm contra um branco de água destilada. A reação produz uma cor púrpura mais fraca no tubo Branco e mais intensa no tubo Amostra (figura 3b)

O valor da concentração de ceruloplasmina é expresso em unidades internacionais por litro (UI/L). Para converter os valores de absorbância em UI foi necessário multiplicar a diferença das absorbâncias da amostra pelo branco pelo fator de correção de 87,17.

$$\text{Ceruloplasmina (UI/L)} = 87,17 \times \Delta A,$$

onde:  $\Delta A = \text{Absorbância da Amostra} - \text{Absorbância do Branco em 530nm}$

O fator de correção é utilizado devido à ausência de um padrão de ceruloplasmina canina de concentração conhecida. O fator é calculado utilizando-se um composto denominado base de Bandrowski de espectro de absorção idêntico ao do composto formado pela oxidação da parafenilenodiamina de acordo com a técnica proposta por Rice (1962).

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do programa SAS<sup>®</sup> (SAS Institute Inc., North Carolina, EUA, 1985).

Foram calculados as médias e os desvios-padrão para todas as variáveis no grupo I e no II quando possível: Eritrograma, leucograma, plaquetometria, proteínas séricas totais, pré-albumina, albumina,  $\alpha$ 1 globulina,  $\alpha$ 2 globulina,  $\beta$  globulina,  $\gamma$  globulina, haptoglobina e ceruloplasmina.

As variáveis do eritrograma, plaquetometria, haptoglobina e ceruloplasmina foram submetidas à análise de variância (ANOVA) com significância estatística ao nível de 5 % entre os grupos I e II.

A associação entre as variáveis leucócitos, segmentados, haptoglobina e ceruloplasmina foi observada através do coeficiente de correlação de Pearson r.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados a seguir referem-se apenas a 71 animais sororretores para *Leishmania* sp., já que quatro animais apresentaram PCR positiva para *Ehrlichia* sp. Os resultados das variáveis dos animais coinfectados por *Ehrlichia* sp serão apresentados no item 4.4 apenas sob a forma descritiva.

### 4.1 HEMOGRAMA

Os resultados do hemograma foram divididos em eritrograma, leucograma e plaquetometria. Dos 71 animais do grupo I, apenas 67 animais têm resultados de hemograma, já que nestes quatro animais restantes não foi possível utilizar a amostra de sangue total devido à coagulação da mesma.

#### 4.1.1 Eritrograma

As médias dos valores da contagem de hemácias, hemoglobina e hematócrito mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os animais do grupo I e II como mostra a tabela 1. Além disso, 47 (70%) dos 67 animais apresentavam valores abaixo dos valores de referência propostos por Jain (1993). A partir da análise destes dados, é possível concluir que uma elevada porcentagem desses animais apresentava anemia.

As médias dos índices hematimétricos volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) nos animais do grupo I foram respectivamente 76,32fL e 29,78%. Já no grupo II, estes valores foram 70,29fL e 34,10%. Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre estes valores,

entretanto, quando comparados aos valores de referência propostos por Jain (1993), observamos que o valor da média do VGM do grupo I encontra-se próxima ao valor máximo de normalidade de 77fL, já o CHGM encontra-se abaixo do mínimo de normalidade de 32%. A partir destes dados pode-se concluir que a anemia apresentada é do tipo normocítica e hipocrômica. Dentre as causas de hipocromia, podemos citar a deficiência de ferro como a principal que pode ocorrer devido a alguma deficiência nutricional, presença de endoparasitas ou deficiência na absorção intestinal (WASTON e CANFIELD, 2000). Entretanto, não se pode descartar outras hipóteses como a anemia da doença inflamatória; a anemia devido à perda por sangramento gastrointestinal ou epistaxe que pode ocorrer em casos de trombocitopenia intensa; a anemia por supressão da medula óssea e a anemia por deficiência de eritropoietina na insuficiência renal (KONTOS e KOUTINAS, 1993). Estes resultados são semelhantes aos descritos por Ciaramella et al. (1997) que observaram anemia arregenerativa normocítica e normocrômica em 60% de 150 cães positivos para *L. (L.) infantum* pelo método da RIFI num experimento realizado na Itália. Já Koutinas et al. (2001) num estudo na realizado na Grécia que avaliava o tratamento com alopurinol encontraram anemia em 68,9% dos 45 cães positivos para *L. (L.) infantum* pelo método da RIFI e por PCR de medula óssea para o mesmo agente, no momento anterior ao tratamento.

Tabela 1 – Valores de média e desvio-padrão do eritrograma dos animais do grupo I (sororretores para *Leishmania* sp.) e do grupo II (animais sadios).

Variáveis	Grupo I (n=67) Média (desvio-padrão)	Grupo II (n=20) Média (desvio-padrão)	Valores de Referência
Hemácias (x 10 <sup>6</sup> /μL)	4,21 (1,03) <sup>a</sup>	6,27 (0,54) <sup>b</sup>	5,5 - 8,5
Hemoglobina (g/dL)	9,56 (2,59) <sup>a</sup>	15,04 (1,61) <sup>b</sup>	12 - 18
Hematócrito (%)	31,97 (8,14) <sup>a</sup>	44,15 (4,39) <sup>b</sup>	37 - 55

\* Letras diferentes mostram significância a 5%

#### 4.1.2 Leucograma

As médias e desvios-padrão dos valores da leucometria global, e da leucometria específica dos animais do grupo I e II estão representados na tabela 2. Não foram observadas variações das médias dos valores da leucometria global, e da leucometria específica do grupo I em relação aos valores de referência descritos por

Jain (1993). Entretanto, foi observada leucocitose em nove (13,4%) dos animais do grupo I e leucopenia em quatro (5,9%) dos animais do mesmo grupo. Na leucometria específica, o achado mais consistente foi a linfopenia observada em 37 (55,2%) dos animais do grupo I. A neutrofilia foi observada em 17 (25,4%) dos animais do mesmo grupo. Outros achados ocasionais foram eosinofilia (14,9%), eosinopenia (10,4%), monocitose (11,9%) e monocitopenia (4,5%).

Tabela 2 – Valores de média e desvio-padrão do leucograma dos animais do grupo I (sororretores para *Leishmania* sp.) e do grupo II (animais sadios).

Variáveis	Grupo I (n=67) Média (desvio-padrão)	Grupo II (n=20) Média (desvio-padrão)	Valores de Referência
Leucócitos (/μL)	12.292,5 (4.463,4)	11.990 (3.099,6)	6 - 17
Basófilos (/μL)	1,8 (14,78)	0 (0)	0
Eosinófilos (/μL)	693,8 (625,0)	1.205,5 (635,2)	100 - 1250
Bastões (/μL)	43,65 (96,0)	0 (0)	0 - 300
Segmentados (/μL)	9.631,0 (3715,5)	7.170,2 (1.880,2)	3000 - 11500
Linfócitos (/μL)	1.151,9 (805,2)	2989,1 (1.449,5)	1000 - 4800
Monócitos (/μL)	770,4 (547,45)	625,2 (435,0)	150 - 1350

Estes resultados são em parte semelhantes aos descritos por Koutinas et al. (2001) que avaliando um total de 45 animais com LVC observou leucocitose em 6,7%, leucopenia em 35,6%, neutrofilia em 8,9%, neutropenia em 17,8%, linfopenia em 44,4% e monocitose em 6,7% dos animais avaliados. Ciaramella et al. (1997) também observou neutrofilia em 24% dos 150 animais avaliados. Tryphonas et al. (1977) avaliando um animal com LVC observou leucometria global dentro dos valores de normalidade, linfopenia discreta e monocitose moderada. Como a LVC é uma doença sistêmica, de patogenia abrangente, é capaz de induzir respostas diferentes no leucograma dos diversos animais com a doença. Sendo assim, os valores relatados na literatura disponível são variáveis, mostrando que o leucograma não é um teste sensível como exame de triagem para a LVC. Como a LVC pode se apresentar nas formas aguda, sub-clínica, ou crônica, a variação nos resultados da leucometria pode estar relacionada ao grau de inflamação existente em cada uma destas fases. Na fase aguda da doença, os cães acometidos podem apresentar um quadro inflamatório mais intenso do que nas outras duas fases exacerbando os sinais clínicos e acarretando em alterações no leucograma como leucocitose neutrofilia e linfopenia (BANETH, 2006; MARZOCHI et al., 1985).

### 4.1.3 Plaquetometria

As médias dos valores da plaquetometria nos animais do grupo I e II mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) como mostra a tabela 3. Comparando os valores obtidos no grupo I com os valores de normalidade descritos por Jain (1993), foi observado trombocitopenia em 41 (61,2%) dos 67 animais avaliados.

A trombocitopenia é um achado comum na LVC, como descrito por Tryphonas et al. (1977), Ciaramella et al. (1997), Valladares et al. (1998) e Koutinas et al. (2001); e pode ocorrer devido à diminuição da produção medular por hipoplasia megacariocítica, aumento do consumo de plaquetas por vasculite ou destruição imunomediada das mesmas (RUSSEL e GRINDEM, 2000). A trombocitopenia na LVC pode ser decorrente ainda de perda de sangue ou de seqüestro esplênico (VALLADARES et al., 1998). Entretanto, no estado do Rio de Janeiro, não há relatos de trombocitopenia causada por infecção por *L. (L.) chagasi* em cães. No presente estudo, o tempo de processamento das amostras foi superior a duas horas, tempo recomendado para a contagem de plaquetas. Sendo assim, a demora no processamento das amostras de sangue pode ter influenciado nos resultados da plaquetometria.

Tabela 3 – Valores de média e desvio-padrão da plaquetometria dos animais do grupo I (sororretores para *Leishmania* sp.) e do grupo II (animais sadios).

Variáveis	Grupo I (n=67) Média (desvio-padrão)	Grupo II (n=20) Média (desvio-padrão)	Valores de Referência
Plaquetas ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	184.044,8 (88.106,8) <sup>a</sup>	376.450,0 (86.675.6) <sup>b</sup>	200 - 700

\* Letras diferentes mostram significância a 5%

## 4.2 PROTEINOGRAMA

### 4.2.1 Concentrações séricas de proteína total, albumina e globulinas por espectrofotometria

As médias e desvios-padrão das variáveis: proteína sérica total, albumina e globulinas determinadas pela metodologia colorimétrica dos animais do grupo I

encontram-se representados na tabela 4. Os animais do grupo II não possuem tais determinações devido à menor quantidade de soro disponível destes animais. Os valores das médias encontram-se abaixo dos valores de normalidade descritos por Kaneko et al. (2008). A partir destes dados, é possível concluir que os animais em questão apresentavam hiperproteinemia com hipoalbuminemia e hiperglobulinemia.

Avaliando os animais individualmente, foi possível observar hiperproteinemia em 49 (69,0%), hipoalbuminemia em 50 (70,4%) e hiperglobulinemia em 52 (73,2%) dos 71 animais avaliados. A hiperalbuminemia foi observada em quatro (5,6%) dos 71 animais avaliados, sempre associada à hiperproteinemia, e pode ser atribuída a um possível grau de desidratação dos animais avaliados. Estes dados estão de acordo com os observados por Tryphonas et al. (1977) onde ao avaliar o curso da LVC em um cão observaram hiperproteinemia com hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Já Ciaramella et al. (1997) avaliaram 150 cães positivos para *L. (L.) infantum* e observaram hiperproteinemia em 63,3% dos animais, hipoalbuminemia em 68% e hiperglobulinemia em 70,6%. Koutinas et al (2001) avaliando o tratamento com alopurinol em 45 cães positivos para *L. (L.) infantum* encontraram no momento anterior ao tratamento hiperproteinemia em 60,0% dos animais, hipoalbuminemia em 28,8% e hiperglobulinemia em 77,8%. Em um experimento realizado no nordeste do Brasil, Almeida et al. (2005) avaliando dois grupos de cães, um contendo cães com LVC comprovada através da visualização de formas amastigotas em aspirados de medula óssea e outro contendo cães sintomáticos com RIFI positiva observaram intensas hiperproteinemia com hipoalbuminemia e hiperglobulinemia em ambos os grupos.

Tabela 4 – Valores de média e desvio-padrão das concentrações séricas de proteína total, albumina e globulinas por espectrofotometria dos animais do grupo I (sororretores para *Leishmania* sp.)..

Variáveis	Grupo I (n=71) Média (desvio-padrão)	Valores de Referência
Proteínas Totais (g/dL)	8,01 (1,61)	5,7 – 7,1
Albumina (g/dL)	2,22 (0,74)	2,6 – 3,3
Globulinas (g/dL)	5,79 (1,72)	2,7 – 4,4

\* Fonte: KANEKO et al., 2008

#### 4.2.2 Eletroforese de proteínas séricas

As médias e desvios-padrão das variáveis: pré-albumina, albumina,  $\alpha$ 1 globulina,  $\alpha$ 2 globulina,  $\beta$  globulina e  $\gamma$  globulina determinadas pelo fracionamento eletroforético em gel de agarose dos animais do grupo I encontram-se representados na tabela 4. Os animais do grupo II não possuem tais determinações devido à menor quantidade de soro disponível destes animais.

Tabela 4 – Valores de média e desvio-padrão das concentrações séricas de pré-albumina, albumina,  $\alpha$ 1 globulina,  $\alpha$ 2 globulina,  $\beta$  globulina e  $\gamma$  globulina determinadas pela metodologia da eletroforese em gel de agarose dos animais do grupo I (sororretores para *Leishmania* sp.).

Variáveis	Grupo I (n=71) Média (desvio-padrão)	Valores de Referência * Média (desvio-padrão)
Pré-albumina (g/dL)	0,05 (0,04)	-
Albumina (g/dL)	2,35 (0,78)	3,23 (0,29)
$\alpha$ 1 globulina (g/dL)	0,56 (0,20)	0,77 (0,15)
$\alpha$ 2 globulina (g/dL)	0,60 (0,25)	0,54 (0,17)
$\beta$ globulina (g/dL)	2,48 (1,05)	1,38 (0,25)
$\gamma$ globulina (g/dL)	1,99 (1,34)	0,62 (0,19)

\* Fonte: ABATE et al., 2000

Analisando individualmente estes resultados dos animais do grupo I, os achados mais consistentes foram hipoalbuminemia em 52 (73,2%), diminuição da fração  $\alpha$ 1 globulina em 43 (60,6%), aumento da fração  $\alpha$ 2 globulina em 17 (23,9%), aumento da fração  $\beta$  globulina em 59 (83,1%) e aumento da fração  $\gamma$  globulina em 57 (80,3%) dos 71 animais analisados. Ao analisar os traçados eletroforéticos dos 57 animais que apresentaram aumento da fração  $\gamma$  globulina, foi observado que todos os 57 animais apresentavam gamopatias policlonais. Almeida et al. (2005) utilizando a mesma metodologia deste estudo observou hiperproteinemia, associada à hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia, com valores normais da fração  $\alpha$ 1 globulina, e aumento das frações  $\alpha$ 2 globulina,  $\beta$  globulina e  $\gamma$  globulina.

A hiperproteinemia acompanhada de hiperglobulinemia pode ser atribuída à gamopatia policlonal observadas no presente estudo e encontrada freqüentemente na LVC (MEYER e HARVEY, 2004). A gamopatia policlonal ocorre devido à forte

resposta imune humoral causada por esta doença, levando à produção de grande quantidade de diversos anticorpos que muitas vezes fazem um papel não-protetor (FONT, 1996). Entretanto, Font (1996) considera a LVC como um diagnóstico diferencial para as gamopatias monoclonais, que ocorrem mais comumente em neoplasias de plasmócitos e linfócitos B (MEYER e HARVEY, 2004). O aumento das frações  $\alpha_2$  e  $\beta$  globulinas no perfil eletroforético, pode ser explicado pela forte resposta inflamatória induzida pela LVC por parte do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2005), já que nesta faixa de proteínas localizam-se proteínas de fase aguda importantes. O aumento da banda das  $\alpha_2$  globulinas em apenas 23,9% dos animais analisados pode ser explicado pelo tipo de PFA presente nesta faixa de proteínas como a haptoglobina e a ceruloplasmina que são PFA's de resposta moderada no cão, e aumentam seus níveis séricos em quadros inflamatórios em apenas 5 a 10 vezes o valor basal (ECKERSALL, 2008). A hipoalbuminemia associada ao aumento de globulinas na LVC pode ser atribuída à inibição da produção de albumina pelo fígado mediada pela liberação de citocinas inflamatórias, já que a albumina é considerada uma proteína de fase aguda negativa, processo denominado hipoalbuminemia compensatória e que ocorre como uma tentativa do organismo de evitar a hiperviscosidade plasmática já que há um aumento de globulinas (KANEKO, 1997). Entretanto, não podemos deixar de considerar outros fatores concomitantes que contribuem para a hipoalbuminemia como a baixa ingestão protéica, nos casos de animais em anorexia ou má-nutrição prolongadas, a perda, nos casos de animais com nefropatia ou a deficiência na produção, nos casos de animais com insuficiência hepática (ECKERSALL, 2008).

#### 4.3 HAPTOGLOBINA E CERULOPLASMINA

Os valores médios das concentrações séricas de haptoglobina e ceruloplasmina mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os animais do grupo I e II como mostra a tabela 5. Dos 71 animais do grupo I, apenas 68 animais têm resultados da determinação sérica de haptoglobina, já que nestes três animais restantes não havia volume suficiente de soro para a determinação da haptoglobina.

Os valores médios da haptoglobina no grupo I foram 2,14 vezes maiores do que no grupo II; já no caso da ceruloplasmina, os valores médios no grupo I foram

3,10 vezes maiores do que no grupo II. As figuras 4 e 5 mostram a distribuição dos valores das concentrações séricas de haptoglobina e ceruloplasmina dos animais dos grupos I e II respectivamente. Ao analisar as figuras, é possível observar que os valores do grupo II tanto no caso da haptoglobina, quanto da ceruloplasmina mantiveram-se em uma faixa de valores anterior à do grupo I, mostrando que os valores de haptoglobina e ceruloplasmina aumentam nos animais sororretores para *Leishmania* sp. em relação aos animais sadios.

Tabela 5 – Valores de média e desvios-padrão das concentrações séricas de haptoglobina e ceruloplasmina dos animais do grupo I (sororretores para *Leishmania* sp.) e do grupo II (animais sadios).

Variáveis	Grupo I		Grupo II	
	Média (desvios-padrão)		Média (desvios-padrão)	
Haptoglobina (mgHBC/dL)	93,56 (55,98) <sup>a</sup>	n =68	43,52 (28,31) <sup>b</sup>	n=20
Ceruloplasmina (UI/l)	6,02 (3,09) <sup>a</sup>	n =71	1,95 (1,56) <sup>b</sup>	n =20

\* Letras diferentes mostram significância a 5%

O aumento das concentrações séricas de haptoglobina e ceruloplasmina tem sido relatado em diversas condições inflamatórias e infecciosas em cães, como em situações pós-operatórias (CONNER et al., 1988), em cães com poliartrite (ECKERSALL et al., 1999) e com gastroenterite hemorrágica (KOGIKA et al., 2003). Em cães com babesiose, apenas a ceruloplasmina mostrou-se elevada, já que a haptoglobina mostrou-se diminuída devido ao quadro hemolítico que ocorre frequentemente nesta doença (ULUTAS, et al., 2005). Os resultados apresentados no presente estudo estão de acordo com os observados por Matínez-Subiela et al. (2002) que, avaliando 30 cães com ELISA positivo para *L. (L.) infantum* na Espanha, observaram que os valores médios da concentração sérica de haptoglobina em animais com LVC foi 5 vezes maior do valor determinado para os animais sadios. Já a concentração sérica de ceruloplasmina mostrou-se 3,85 vezes acima nos animais com LVC em relação aos animais sadios do mesmo experimento. Para os pesquisadores espanhóis, o aumento dos valores de haptoglobina e ceruloplasmina em animais com LVC indica que o parasito desencadeia uma resposta inflamatória aguda no hospedeiro.

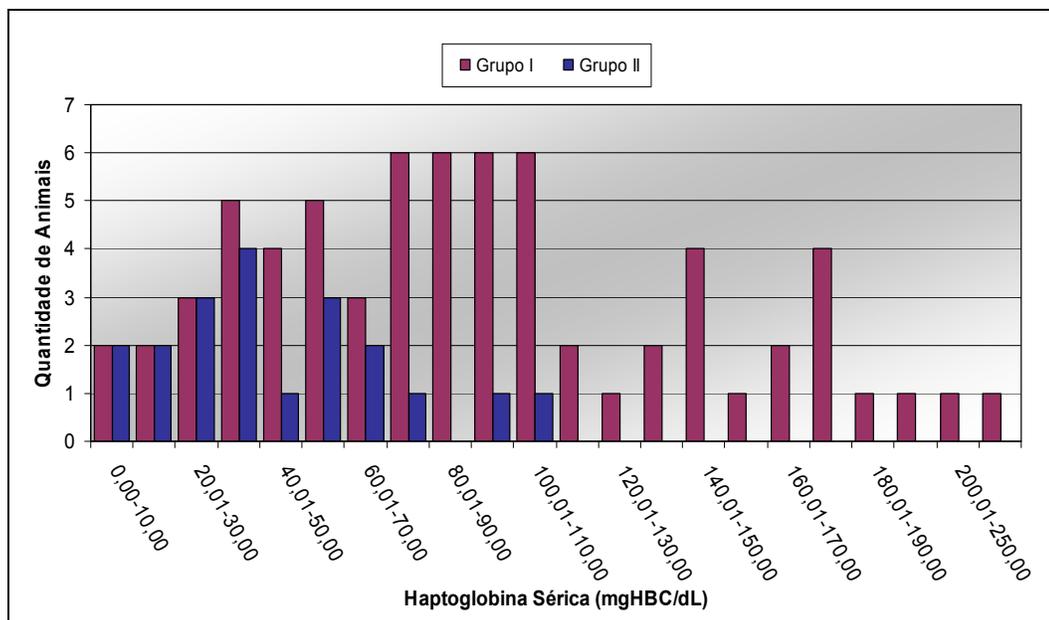


Figura 4. Distribuição em classes dos valores de concentração sérica de haptoglobina nos grupos I e II.

Entretanto, em outro experimento, realizado por Bildik et al. (2004) os valores da concentração sérica de ceruloplasmina em animais com LVC foram menores do que aqueles obtidos em animais sadios. Neste estudo, os pesquisadores defendem a teoria de que por ser uma substância com capacidade antioxidante, a ceruloplasmina é consumida em cães com LVC durante o processo de lesão oxidativa os eritrócitos, com o objetivo de impedir a formação de radicais livres. Assim como o encontrado por Matínez-Subiela et al. (2002), os resultados deste estudo sugerem que as proteínas de fase aguda haptoglobina e ceruloplasmina são sensíveis marcadores de inflamação em cães sorreatores para *Leishmania* sp.

A correlação entre as variáveis leucometria global (LG), neutrófilos segmentados, haptoglobina e ceruloplasmina está representada na tabela 6 e mostra que a haptoglobina e a ceruloplasmina têm correlação positiva entre si. O mesmo ocorre entre as variáveis leucometria global e neutrófilos segmentados. Entretanto, quando cruzamos os dados da leucometria global e neutrófilos segmentados com haptoglobina e ceruloplasmina, não foi observada qualquer correlação entre essas variáveis. A partir destes dados, podemos observar que as PFA's haptoglobina e ceruloplasmina aumentam paralelamente em animais sorreatores para *Leishmania* sp., ou seja, conforme ocorre o aumento da haptoglobina, a ceruloplasmina também

aumenta. Da mesma maneira, as variáveis LG e neutrófilos segmentados aumentam paralelamente, ou seja, na maioria das vezes, quando há leucocitose, há neutrofilia nos animais sorretores para *Leishmania* sp. Como não há correlação positiva entre os dados da leucometria global e neutrófilos segmentados com os dados haptoglobina e ceruloplasmina, podemos verificar que o aumento das proteínas de fase aguda não é acompanhado de leucocitose por neutrofilia, sugerindo uma maior sensibilidade das PFA's haptoglobina e ceruloplasmina em relação à leucometria global e à contagem de neutrófilos segmentados para determinar a reação inflamatória existente em animais sorretores para *Leishmania* sp.

Tabela 6 – Correlação entre as variáveis leucometria global (LG), neutrófilos segmentados, haptoglobina e ceruloplasmina dos animais do grupo I (sorretores para *Leishmania* sp.) e do grupo II (animais sadios).

Variáveis	LG	Segmentados	Haptoglobina	Ceruloplasmina
LG	1	-	-	-
Segmentados	0,91*	1	-	-
Haptoglobina	0,05 <sup>NS</sup>	0,16 <sup>NS</sup>	1	-
Ceruloplasmina	-0,18 <sup>NS</sup>	-0,07 <sup>NS</sup>	0,22*	1

<sup>NS</sup> Correlação não-significativa; \* Correlação positiva

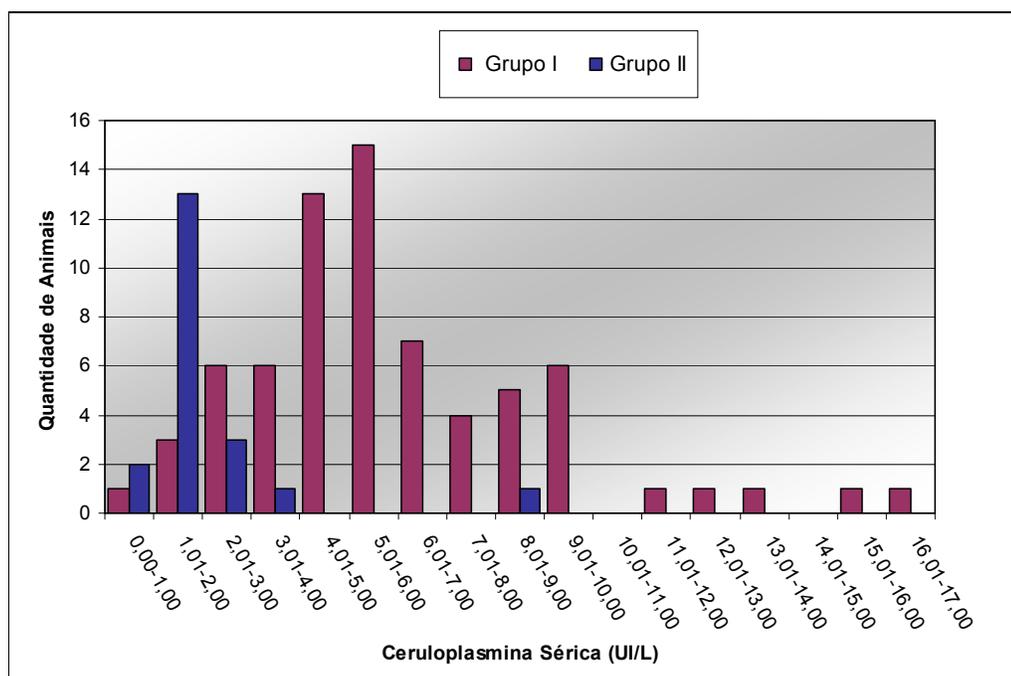


Figura 5. Distribuição em classes dos valores de concentração sérica de ceruloplasmina nos grupos I e II.

#### 4.4 PCR para *Ehrlichia* sp.

Por ser a ehrliquiose uma doença de ocorrência relativamente alta na região sudeste – 20,9% (LABARTHE et al., 2003), de sintomatologia clínica e alterações laboratoriais semelhantes à leishmaniose, foi realizado um teste para o diagnóstico da ehrlichiose canina nos cães do presente estudo, com o objetivo de descartar que as possíveis alterações encontradas fossem causadas pela ehrlichiose.

A PCR para a amplificação do genoma de *Ehrlichia* sp. revelou que dos 75 animais sororretores para *Leishmania* sp., quatro apresentavam ehrliquiose concomitantemente. Como esta quantidade de indivíduos não foi suficiente para formar um grupo estatisticamente significativo, não foi possível comparar estes valores com os valores dos animais.

Nestes quatro animais sororretores para *Leishmania* sp. e que também apresentaram ehrliquiose concomitantemente as alterações mais encontradas no hemograma foram anemia em dois animais e trombocitopenia em todos os animais. Um animal apresentou leucocitose e dois neutrofilia. Um animal apresentou linfopenia e outro, linfocitose. Monocitose foi observada em apenas um cão.

Quanto ao proteinograma destes mesmos quatro animais, dois cães apresentaram hiperproteinemia e todos apresentaram hipoalbuminemia com hiperglobulinemia atribuída principalmente ao aumento das frações  $\alpha_2$  globulina e  $\beta$  globulina observadas em todos os indivíduos e da fração  $\gamma$  globulina observada em três dos quatro animais. Ao analisar o traçado eletroforético dos animais com hipergamaglobulinemia, foi constatado gamopatia policlonal nos três animais.

Em relação à determinação das concentrações séricas de haptoglobina e ceruloplasmina, o valor das médias de ambas as proteínas foi 3,95 vezes maior para a haptoglobina e 4,59 vezes para a ceruloplasmina do que o valor das médias do grupo II que continha animais sadios. A dosagem de haptoglobina foi realizada em apenas três destes animais já que um deles não possuía volume de soro suficiente para a realização desta dosagem.

## 5 CONCLUSÕES

1 - Animais da espécie canina sororretores para *Leishmania* sp. apresentam como principais alterações no hemograma anemia normocítica e hipocrômica e linfopenia.

2 – Os cães sororretores para *Leishmania* sp. apresentam hiperproteinemia com hipoalbuminemia e hiperglobulinemia.

3 – Em cães sororretores para *Leishmania* sp. a hiperglobulinemia pode ser ocasionada por aumento individual das frações  $\alpha_2$  globulina,  $\beta$  globulina ou  $\gamma$  globulina ou por uma combinação destas, sendo a gamopatia policlonal a principal alteração dentre os animais que apresentaram hipergamaglobulinemia.

4 – Em cães sororretores para *Leishmania* sp. os níveis séricos de haptoglobina elevam-se cerca de duas vezes e os de ceruloplasmina cerca de três vezes. em relação aos níveis séricos dessas proteínas em animais sadios.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, O.; ZANATTA,R.; MALISANO, T.; DOTTA, U. Canine serum proteins patterns using high-resolution electropjoresis (HRE). *The Veterinary Journal*, v. 159, p.154-160, 2000.

ALEXANDRE-PIRES, G.; PAIS, D.; CORREIA, M.; PINA, J.A. Leishmaniosis – a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microscopy Research and Technique*, v.69, p.227–235, 2006.

ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUZA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, v.127, p.227-232, 2005.

ALMOSNY, N. R. P. Ehrlichia canis (Donatien & Lestoquard, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. Seropédica, 1998. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração: Parasitologia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N.R.P. (Ed.) *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. 135 p., cap. 1, p. 13-56.

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRES, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZALES, F.; SAN ANDRES, M. D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SAINZ, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.88, p.371-378, 1994.

ANDERSON, M.; SEVELIUS, E. Abnormal microheterogeneity of haptoglobin in serum from dogs with various diseases. *The Veterinary Record*, v. 148, p.17-17, 2001.

BAKER, R.J.; VALLI, V.E. Electrophoretic and immunoelectrophoretic analyses of feline serum proteins. *Canadian Journal Veterinary Research*, v.52, p.308-314, 1988.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3. ed. Missouri: Saunders Elsevier Inc., 2006. 1387p., cap 73, p. 685-695.

BANETH, G.; DANK, G.; KEREN-KORNBLATT, E.; SEKELES, E.; ADINI, I.; EISENBERGER, C.L.; SCHNUR, L.F.; KING, R.; JAFFE, C.L. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.59, p.722-725, 1998.

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

BILDIK, A.; KARGIN, F.; SEYREK, K.; PASA, S.; OZENSOY, S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral leishmaniasis. *Researchs in Veterinary Science*, v.77, p.63-66, 2004.

BINHAZIM, A.A.; CHAPMAN Jr, W.L.; LATIMER, K.S.; STYLES, M.; COMER, K. Canine leishmaniasis caused by *Leishmania leishmania infantum* in two Labrador retrievers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.4, p.299-305, 1992.

BRAVO, L.; FRANK, L. A.; BRENNEMAN, K. A. Canine leishmaniasis in the United States. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.15, p.699-708, 1993.

BREITSCHWERDT, E. B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.): *Textbook of veterinary internal medicine*. 5. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. 2 v., v. 1, cap. 86, p. 400-407.

BREITSCHWERDT, E.B.; SCHANTZ, P. Canine visceral leishmaniasis in North America. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3. ed. Missouri: Saunders Elsevier Inc., 2006. 1387p., cap.73, p. 695-698.

BROWN GK, MARTIN AR, ROBERTS TK, AITKEN RJ Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal*, v.79, p.554-558, 2001.

CÉRON, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, v.34, p.85-99, 2005.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBRODIO, R., CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, v.22, p.539-543, 1997.

CONNER, J.G.; ECKERSALL, P.D.; FERGUSON, J.; DOUGLAS, T.A. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in veterinary science*, v. 45, p.107-110, 1988.

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

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of Rhipicephalus

sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v.128, p.149–155, 2005

COUTINHO, M.T.Z.; LINARDI, P.M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*, v.147, 320–325, 2007.

DA SILVA, A.V.M.; DE PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: Aspectos epidemiológicos. *Caderno de Saúde Pública*, v. 21, p.324-32, 2005.

DANTAS-TORRES, F. Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: do not forget the law of priority *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, p.117-118, 2006.

EATON, J.W.; BRANDT, P.; MAHONEY, J.R.; LEE, J.T. Haptoglobin: a natural bacteriostatic. *Science*, v.215, p.691-693, 1982.

ECKERSALL, P.D. Proteins, Proteomics and the Disproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6. ed. California: Academic Press, 2008, p.117-155.

ECKERSALL, P.D.; CONNER, J.G.; HARVIE, J. An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Research Communications*, v.15, p.17-24, 1991.

ECKERSALL, P.D.; DUTHIE, S.; SAFI, S.; MOFFATT, D.; HORADAGODA, N.U.; DOYLE, S.; PARTON, R.; BENNETT, D.; FITZPATRICK, J.L. An automated biochemical assay for haptoglobin: prevention of the interference from albumin. *Comparative Haematology International*, v.9, p.117-121, 1999.

ELSON, E.C. Quantitative determination of serum haptoglobin. A simple and rapid method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.62, p.655-663, 1974.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R. W. (Ed.) *Kirk's current veterinary therapy* XI. Philadelphia: WB Saunders, p.266-270, 1992.

FIGUEIREDO, F.B.; GREMIÃO, I.D.F.; PEREIRA, S.A.; FEDULO, L.P.; MENEZES, R.C.; BALTHAZAR, D.A.; SCHUBACH, T.M.P.; MADEIRA, M.F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, V.102, p. 200-201, 2008.

FOGLIAMANZILLO, V.F.; PAGANO, A.; PACIELLO, O.; MUCCIO, T.D.I.; GRADONI, L.; OLIVA, G.V.F. Papular-like glossitis in a dog with leishmaniosis, *Veterinary Record*, v. 156, p. 213-215, 2005.

FONT, A. Consider leishmaniasis in differential for monoclonal gammopathies in dogs (letter). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.208, p.184, 1996.

GAVGANI, A.S.; HODJATI, M.H.; MOHITE, H.; DAVIES, C.R. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniosis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet*, v.360, p.374–379, 2002.

GIRAULDEL, J.M.; PAGES, J.P.; GUELFY, J.F. Monoclonal gammopathies in the dog: A retrospective study of 18 cases (1988-1999) and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.38, p.35-147, 2002.

GRAVERSEN, J.H.; MADSEN, M.; MOESTRUP, S.K. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. The *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.34, p.309-314, 2002

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Ripicephalus sanguineus). *American Journal of Veterinary Research*, v. 36, p. 937-941, 1975.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; UPGARIN, N.; VAN EDEREN, A.M.; ADEWUYI, A.A.; CANDIANI, D.; NGUYEN, T.K.A.; SABECKIENE, B.J. Acute phase

reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. *Journal of Zhejiang University Science*, v.6, p.941-947, 2005.

HARVEY, J.W. Comparison between serum haptoglobin and alpha-2-globulin concentrations in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, v.15, p.4-5, 1986.

HENRY, R.J.; CHIAMORI, N.; JACOBS, S.L.; SEGALOVE, M. Determination of ceruloplasmin oxidase in serum. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.104, p.620-624, 1960.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *The Lancet*, v.354, p.1191-1199, 1999.

HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. *Canine Practice*, v. 16, p. 13-21, 1991.

JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.

JAIN, N.C. The plasma proteins, dysproteinemias, and immune deficiency disorders. In: *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p., p. 349-380.

KANEKO, J.J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5. ed. New York: Academic Press, 1997. 932p., p.117-138.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6. ed. California:Academic Press, 2008, 916p.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H.K.; JOHNSON, A.J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease and clinical pathology. *Veterinary Pathology*, v. 21, p.74-79, 1984.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales*, v.78, p.747-755, 1985.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; PINELLI, E.; DEL REAL, G.; MOLINA, R.; VITUTIA, M.M.; CAÑAVATE, M.C.; NIETO, J. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*, v.1, p.311-318, 1994.

KOGIKA, M.M.; PEREIRA, D.A.; ELIAS, F.; NOTOMI, M.K.; DELAYTE, E.H.; KAWAHARA, R.; HAGIWARA, M.K. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e  $\alpha$ -glicoproteína ácida em cães com gastrenterite hemorrágica. *Ciênci Rural*, v.33, p.513-517, 2003.

KOHN, J. A cellulose acetate supporting médium for zone electrophoresis. *Clinical Chimica Acta*, v.2, p.297-303, 1957

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old world canine leishmaniasis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.15, p.949-960, 1993.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.35, p.376-383, 1999.

KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.; POLIZOPOULOU, Z.; BILLINIS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.; PAPADOPOULOS, O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v.98, p.247-261, 2001.

KOUTINAS, A.F.; SCOTT, D.W.; KONTOS, V.; LEKKAS, S. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Veterinary Dermatology*, v.3, p.121-130, 1993.

KUEHN, N. F.; GAUNT, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 186, p. 355-358, 1985.

LABARTHE, N.; PEREIRA, M.C.; BARBARINI, O.; McKEE, W.; COIMBRA, C.A.; HOSKINS, J. Serologic Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* Infections in Brazil. *Veterinary Therapeutics*, v.4, p.67-75, 2003.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, p.811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.81, p.702-3, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; RYAN, L.; RIBEIRO, R.S.M.; SILVEIRA, F.T. Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) as the vector. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.79, p.223–226, 1985.

LASSEN, E.D. Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. In: THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*, Baltimore:Lippincott Williams & Wilkins, 2004, p.401-416.

LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; DE MELO, M.N.; LUIZ TAFURI, W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*, v.92, p.43–53, 2004.

LUNA, E. Vacina anti-leishmaniose visceral canina Leishmune. In: *Nota Técnica. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde*, 2005.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; PEREIRA, S.A.; FIGUEIREDO, F.B.; BAPTISTA,C.; LEAL, C.A.; MELO, C.X.; CONFORT, E.M.; MARZOCHI, M.C.A. Post mortem parasitological evaluation of dogs sororeactive for Leishmania from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.138, p.366-370, 2006.

MARTINEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTINEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNANDEZ, S. Humoral and cell-mediated immunity and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.48, p.209-220, 1995.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; CÉRON, J.J. Critical differences of acute phase proteins in canine serum samples. *Veterinary Journal*, v.166, p.233-237, 2003.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P.D.; CÉRON, J.J. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *The Veterinary Record*, v.150, p.241-244, 2002.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; TOLEDO, L. M.; GRIMALDI, J. R.; MOMEN, H.; PACHECO, R. S.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; RANGEL, J. R.; TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.80, p.349-357, 1985.

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitology Today*, v.10,p.37-40, 1994.

MATTHEWS, A.G. Serum protein electrophoresis in horses and ponies. *Equine Veterinary Journal*, v.14, p. 322-324, 1982.

MATTOS Jr., D.G.; PINHEIRO, J.M.; MENEZES, R.C.; COSTA, D.A. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, p.119-122, 2004.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. Plasma proteins In: \_\_\_\_\_. *Veterinary Laboratory Medicine Interpretation and Diagnosis*. 3. ed. Missouri: Saunders Elsevier Inc., 2004. 351p., p. 156-168.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2º edição. Série A. normas e manuais técnicos. Editora MS. Brasília, DF. 181p., 2007.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, v.24, p.371-377, 2008.

MURATA, H.; MIYAMATO, T. Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. *The British Veterinary Journal*, v. 149, p. 277-283, 1993.

NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; PEÑA, T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v.133, p.37–47, 2005.

NATAMI, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; BOUDOUMA, M.; GUESSOUSS-IDRRISSI, N.; RHALEM, A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. *Veterinary Research*, v. 31, p. 355-363, 2000.

NEER, M.T.; HARRUS, S. Canine monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettsiosis (*E.canis*, *E. chafeensis*, *E. ruminatum*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* ) infections. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3. ed. Missouri: Saunders Elsevier Inc., 2006. 1387p., p. 685-695.

NEER, T. M.; Ehrlichiosis: canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998. 934p., p. 139-154.

NEVES, V.L.F.C.; SANTUCI, S.G. Leishmaniose Visceral Americana. Área doenças e vetores. Disponível em <http://www.succen.sp.gov.br/doencas/index.htm> Acesso em 17/10/2006.

PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; VLEMMAS, J.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.104, p.227–237, 2005.

PARRA, M.D.; TUOMOLA, M.; CABEZAS-HERRERA, J.; CERÓN J.J. Analytical and clinical validation of a time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. *Veterinary Research Communications*, v.30, p.113-126, 2006.

PARRA, M.D.; VAISANEN, V.; CERON, J.J. Development of a time-resolved fluorometry based immunoassay for the determination of canine haptoglobin in various body fluids. *Veterinary Research*, v. 36, p.117-129, 2005.

PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J., RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *European Journal of Immunology*, v. 25, p.1594-1600, 1995.

REY, L. *Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 2 ed. Guanabara Koogan, 1991. 731 p.

RICE, E.W. Standardization of ceruloplasmin activity in terms of international enzyme units – Oxidase formation of “Bandrowski’s base” from p-phenylenediamine by ceruloplasmin. *Analytical Biochemistry*, v.3, p.452-456, 1962.

RIKIHISA, Y. The tribe Ehlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 4, p. 286-308, 1991.

RIKIHISA, Y.; YAMAMOTO, S.; KWAK, I.; IQBAL, Z.; KOCIBA, G.; MOTT, J.; CHICHANASIRIWITHAYA, J. C-reactive protein and  $\alpha$ -Acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p.912-917, 1994.

RIOUX, J.A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, v.65, p.111-125, 1990.

ROSYPAL, A.C.; ZAJAC, A.M.; LINDSAY, D.S. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v.33, p.921-937, 2003.

RUSSEL, K.E.; GRINDEM, C.B. Secondary Thrombocytopenia. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.1344p., p. 487-495.

RYAN, L.; SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmanial infections in *Lu. longipalpis* and *L. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.78, p.547-548, 1984.

SCHOSINSKY, K.H.; LEHMANN, H.P.; BEELER, W.F. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clinical Chemistry*, v.20, p.1556-1563, 1974.

SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.91, p.671-683, 1996.

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E., ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W B Saunders, 1990. 971p., cap. 79, p. 769-777.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of Comparative Pathology*, v.130, p.7–12, 2004.

SOLTER, P.F.; HOFFMAN, W.E; HUNGERFORD, L.L.; SIEGEL, J.P.; ST. DENIS, S.H.; DORNER, J.L. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.52, p. 1738-1742, 1991.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Proteins In: \_\_\_\_\_. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Iowa: Iowa State Press, 2002. 610p., p. 251-276.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C.L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research*, v. 38, p.547–564, 2007.

SUNDERMAN Jr, F.W.; NOMOTO, S. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clinical Chemistry*, v.16, p.903-910, 1970.

TABOADA, J.; MERCHANDT, S.R. Infecções causadas por protozoários e por outras causas. In: ETTINGER S.J., FELDMAN E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 4. ed. São Paulo: Manole Ltda, 3020p., p.554-572, 1995.

THERAN, P.; LING, G. J. Visceral leishmaniasis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 150, p. 82-88, 1967.

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p., p.891-898.

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

ULUTAS, B.; BAYRAMLI, G.; ULUTAS, P.A.; KARAGENC, T. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 34, p.144-147, 2005.

VALLADARES, J.E.; GOPEGUI, R.R.; RIERA, C.; ALBEROLA, J.; GÁLLEGO, M.; ESPADA, Y.; PORTÚS, M.; ARBOIX, M. Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Research in Veterinary Science*, v.64, p.195-198, 1998.

WANER, T.; HARRUS, S. Anemia of Inflammatory Disease. In: FELDMAN, B.F.; JOSEPH, G.Z.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*, 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p., p. 205-209.

WASTON, A.D.J.; CANFIELD, P.J. Nutricional Deficiency Anemias. In: FELDMAN, B.F.; JOSEPH, G.Z.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*, 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p., p.190-195.

WERNER, L.L.; TURNWALD, G.H.; WILLARD, M.D. Immunologic and Plasma Proteins Disorders. In: WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. 4. ed. Missouri: Saunders Elsevier Inc., 2004. 432p., p. 290-305.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 21, p. 75-98, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a WHO expert committee. *World Health Organization Technical Report Series*, n. 793. Geneva, Switzerland. 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The Leishmaniasis. *World Health Organization Technical Report Series*, n. 701, Geneva, Switzerland. 1984.

YANG, F.M.; HAILE, D.J.; BERGER, F.G.; HERBERT, D.C.; VAN BEVEREN, E.; GHIO, A.J. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood.

*American Journal of Physiology – Lung Cell Molecular Physiology*, v. 284, p.L402-L409, 2003.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)