



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

WILLIAM DE OLIVEIRA KOST

**FREQUÊNCIA DE DETECÇÃO DE *Leishmania infantum* NO PÂNCREAS E
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ASSOCIADAS EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS**

Rio de Janeiro

2019

Kost, William de Oliveira.

FREQUÊNCIA DE DETECÇÃO DE *Leishmania infantum* NO PÂNCREAS E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ASSOCIADAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS / William de Oliveira Kost. - Rio de Janeiro, 2019.
59 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2019.

Orientador: Rodrigo Caldas Menezes.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Histopatologia. 3. Pâncreas. 4. *Leishmania infantum*. 5. Cães. I. Título.

À minha família pela compreensão e incentivo.

Aos amigos de trabalho pelos ensinamentos.

Aos animais por serem indispensáveis a este estudo.

AGRADECIMENTOS

Abaixo, agradeço a esta minha linda família por todo apoio e compreensão. Aos meus pais Osvaldo e Elisabete, por muitas vezes se sacrificarem para o meu bem. A Érica pelo incentivo, Laura pela alegria, Thiago pela motivação, Renata pelo suporte, avó Glória pelo carinho e ao meu avô Evanyr (*in memorian*) pela maior inspiração, a da Medicina Veterinária. Vocês são, uma grande família e uma excelente base que me sustenta.

Agradeço especialmente ao meu orientador Dr. Rodrigo Caldas Menezes, por abrir as portas desse sonho e por compartilhar tão generosamente seus valiosos conhecimentos. Sem você nada disso seria possível.

Aos amigos de Mestrado e da vida, que fizeram essa jornada ser ainda mais gratificante, meu muito obrigado a Andressa, Gabriela, Juliana, Celeste, Célia, Érica, Flávia, Dra Isabella, Dr. Sandro e tantos outros.

A todos os profissionais do laboratório de Anatomia Patológica por todo suporte e disposição em ajudar.

A todos do laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses, por tornarem os dias leves, com tanta alegria e amizade, além de cada ensinamento passado.

Agradeço a meus animais, Chiquinho (*in memorian*), Garfield, Leopoldo e Branquinho, por toda a inspiração que sigo na vida acadêmica. A outros animais muito especiais, como Cacildo, Sashimi (*in memorian*), Sushi, Lucky, Valentina, Jhaique (*In memorian*). Tê-los em minha vida é sinônimo de aprendizado.

Agradeço aos animais deste estudo, por todo aprendizado. Sem vocês, de forma alguma, seria possível a conquista deste sonho.

Agradeço ao programa CAPES/PROAP pelo financiamento desta pesquisa.

Agradeço a Fundação Oswaldo Cruz pela maravilhosa oportunidade e pelo suporte financeiro.

"É a grande glória, bem como a grande ameaça da ciência, que tudo o que é em princípio possível pode ser feito se a intenção de fazê-lo for suficientemente resoluto".

(Peter Brian Medawar)

KOST, W.O. Frequência de detecção de *Leishmania infantum* no pâncreas e alterações histológicas associadas em cães naturalmente infectados.

59f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2019.

RESUMO

A leishmaniose visceral zoonótica possui elevada gravidade e alto índice de letalidade em humanos e animais além de crescimento expansivo por todo o Brasil. O agente etiológico é o protozoário *Leishmania infantum* e o cão doméstico é o principal reservatório em áreas urbanas. Alterações histológicas e ocorrência de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no pâncreas de cães são pouco estudadas. Portanto, os objetivos deste estudo foram avaliar a frequência de infecção por *L. infantum* e as alterações histológicas associadas em pâncreas de cães domésticos naturalmente infectados. Foram estudados 143 cães com sorologia positiva para anticorpos *anti-L. infantum* concomitantemente nos testes de ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunocromatografia de duplo percurso (DPP®) e provenientes do município de Barra Mansa. Os cães foram examinados clinicamente, submetidos à eutanásia e necropsiados entre 2013 e 2014. À necropsia foram coletados fragmentos de pâncreas para realização das técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ). Foram detectadas formas amastigotas pela IHQ em 22 animais (15,4%). Caquexia/magreza foram os sinais clínicos associados à infecção do pâncreas por *Leishmania* spp., sendo encontrados em nove (40,9%) cães com pâncreas infectado. A mediana da carga parasitária em pâncreas foi de 1,4 macrófagos infectados/mm² e os cães com quadro de caquexia/magreza apresentaram a maior carga parasitária, igual a 3,8 macrófagos infectados/mm². O pâncreas apresentou alterações histológicas em 80 (55,9%) dos cães, sendo a pancreatite granulomatosa a mais frequente em 40 (50%), seguida por pancreatite linfoplasmocitária em 34 (42,5%), degeneração vacuolar em sete (8,8%), fibrose em seis (7,5%), hemorragia em três (3,8%), pancreatite eosinofílica em um (1,2%), pancreatite supurativa em um (1,2%) e necrose em um (1,2%). A intensidade do infiltrado inflamatório no pâncreas foi maior nos cães com maior carga parasitária nesse órgão. A correlação apresentou valor de 0.048, tendo o p. valor =0.672. Caquexia/magreza não foram associadas a pancreatite. Esses resultados demonstram que a *L. infantum* é um dos agentes etiológicos da pancreatite crônica em cães, porém a frequência de positividade e carga parasitária desse parasito no pâncreas foram baixas. A associação de caquexia/magreza com uma maior ocorrência do parasito no pâncreas e ausência de associação desses sinais clínicos com pancreatite sugerem um não comprometimento de porção significativa do órgão por esse parasito e que esses sinais clínicos se manifestam junto a uma maior disseminação do parasito para as vísceras.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; Histopatologia; Pâncreas; *Leishmania infantum*; Cães.

KOST, W.O. Frequency of *Leishmania infantum* detection and associated histological changes in pancreas of naturally infected dogs.

59f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2019.

ABSTRACT

Zoonotic visceral *Leishmaniasis* has a high severity and high lethality rate in humans and animals, as well as expansive growth throughout Brazil. The etiological agent is the protozoan *Leishmania infantum* and the domestic dog is the main reservoir in urban areas. Histological changes and occurrence of amastigote forms of *Leishmania* spp. in the pancreas of dogs are poorly studied. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the frequency of infection by *L. infantum* and associated histological changes in pancreas of naturally infected domestic dogs. One hundred and forty-three dogs with positive serology for anti-*L. infantum* antibodies in the immunoenzymatic assay (ELISA) and double-stranded immunochromatography (DPP®) from the municipality of Barra Mansa were studied. The dogs were clinically examined, submitted to euthanasia and necropsied between 2013 and 2014. In the necropsy, fragments of pancreas were collected for histopathology and immunohistochemistry (IHC) techniques. Amastigote forms were detected by IHC in 22 animals (15.4%). Cachexia / thinness were the clinical signs associated with the infection of the pancreas by *Leishmania* spp., being found in nine (40.9%) dogs with infected pancreas. The median parasite load in the pancreas was 1.4 infected macrophages/mm² and the dogs with cachexia / thinness presented the highest parasite load, equal to 3.8 infected macrophages / mm². The pancreas had histological changes in 80 (55.9%) of the dogs, with granulomatous pancreatitis being the most frequent in 40 (50%), followed by lymphoplasmacytic pancreatitis in 34 (42.5%), and vacuolar degeneration in seven (8.8 %), fibrosis in six (7.5%), hemorrhage in three (3.8%), eosinophilic pancreatitis in one (1.2%), suppurative pancreatitis in one (1.2%) and necrosis in one (1.2%). The intensity of inflammatory infiltrate in the pancreas was higher in dogs with higher parasitic load in this organ. The correlation presented value of 0.048, with p.value = 0.672. Cachexia / thinness were not associated with pancreatitis. These results demonstrate that *L. infantum* is one of the etiologic agents of chronic pancreatitis in dogs, but the frequency of positivity and parasitic load of amastigote forms in the pancreas of dogs were low. The association of cachexia / thinness with a higher occurrence of the parasite in the pancreas and absence of association of these clinical signs with pancreatitis suggest a non-involvement of a significant portion of the organ by this parasite and that these clinical signs are manifested together with a greater dissemination of the parasite to visceral organs.

Keywords: Visceral *Leishmaniasis*; Histopathology; Pancreas; *Leishmania infantum*; Dogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida da *L. infantum*. Promastigotas metacíclicas são transferidos para o hospedeiro vertebrado durante repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea. As promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos/neutrófilos e dentro do vacúolo (fagossomo) se transformam em amastigotas. As formas amastigotas se multiplicam por divisão binária. As amastigotas são liberadas do macrófago, infectando novos macrófagos. O vetor se alimenta de sangue do hospedeiro vertebrado infectado e ingere macrófagos parasitados. No tubo digestivo do vetor as amastigotas se transformam em promastigotas, aderidos ao epitélio intestinal do vetor passam por diferenciação terminal e evolui para a forma metacíclica e o ciclo se completa. Fonte:

http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmanios_e_viscerar_canina.html.....3

Figura 2 : Casos de LV por município de infecção. Brasil, 2017. Fonte: SVS/MS....4

Figura 3: Casos de Leishmaniose Visceral no Brasil 1980 a 2017. Fonte: SVS/MS..5

Figura 4: Anatomia do pâncreas e sistema de ductos pancreáticos. Fonte: CORNELL; FISCHER, 2003).....8

Figura 5: Estrutura de um ácino pancreático. Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011).....10

Figura 6: Corte histológico de pâncreas normal de cão. Ácinos pancreáticos, ilha de Langehans e ducto interlobular. HE. Fonte: Lapclin-Dermzoo, INI, 2012.....10

Quadro 1: Integrantes da secreção pancreática exócrina. (Fonte: STEINER, 2008).....12

Figura 7: Cão, fêmea, adulta, SRD, soropositivo para anticorpos anti-*Leishmania infantum*. Animal apresentando diversos sinais clínicos compatíveis com LVC como onicogribose, úlceras, alopecia generalizada, pelo opaco, caquexia/magreza. Proveniência: Município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, 2013.....23

Figura 8 Corte histológico de pâncreas de cão infectado por *Leishmania* spp. mostrando pancreatite com infiltrado inflamatório granulomatoso intersticial difuso, moderado e composto principalmente por macrófagos, havendo também linfócitos e plasmócitos. HE.....26

Figura 9 Corte histológico de pâncreas de cão infectado por *Leishmania* spp. mostrando pancreatite com infiltrado inflamatório granulomatoso intersticial difuso, moderado e composto principalmente por macrófagos. Visualiza-se a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. (Seta) (HE).....27

Figura 10 Corte histológico de pâncreas corado pela técnica de HE de cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania infantum*, mostrando quatro diferentes tipos de pancreatite. (A) Pancreatite granulomatosa, difusa, moderada e composta principalmente por macrófagos, havendo linfócitos, plasmócitos e eosinófilos em menor número. Visualiza-se a presença de larva de nematoide no parênquima (cabeça de seta). (B) Pancreatite linfoplasmocitária intersticial, acentuada, constituída principalmente por linfócitos e plasmócitos. (C) Pancreatite eosinofílica perivascular, constituída principalmente por eosinófilos, havendo linfócitos e plasmócitos em menor número. (D) Pancreatite supurativa, perivascular, constituída principalmente por neutrófilos, havendo também muitos linfócitos e plasmócitos e macrófagos em menor número.....28

Figura 11: Relação da carga parasitária de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no pâncreas encontrada na técnica de IHQ com a intensidade do infiltrado inflamatório, em cães soropositivos anti-*Leishmania* spp. provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, no período de 2012 e 2013.....30

Figura 12: Comparação entre intensidade do infiltrado inflamatório nos cães positivos e negativos para *Leishmania* spp. no pâncreas, de acordo com a técnica de

IHQ, provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, no período de 2012 e 2013.....31

Figura 13: Corte histológico de pâncreas corado pela técnica de HE de cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania infantum*, mostrando quatro tipos de alterações histológicas. (A) Degeneração vacuolar e difusa de ácinos pancreáticos. (B) Fibrose no parênquima (C) Extensa área de hemorragia com presença de hemossiderina no parênquima (D) Discreto foco de necrose no parênquima (asterisco).....32

Figura 14 Corte histológico de pâncreas de cão mostrando formas amastigotas de *Leishmania* spp. coradas em castanho no citoplasma de macrófagos no tecido intersticial. Imuno-histoquímica.....33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Frequência de sinais clínicos em 143 cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* spp., provenientes do município de Barra Mansa, no período de 2012 e 2013.....23
- Tabela 2.** Alterações histológicas observadas em 80 amostras de pâncreas de cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* provenientes de Barra Mansa, Rio de Janeiro, no período de 2012 a 2013.....24
- Tabela 3.** Frequência de alterações histológicas em pâncreas de acordo com resultado da técnica de IHQ para diagnóstico de *Leishmania* spp., provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro no período de 2012 e 2013.....25
- Tabela 4.** Frequência de alterações histológicas em pâncreas de cães com e sem sinal clínico de caquexia, provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro no período de 2012 e 2013.....25
- Tabela 5.** Avaliação de raça, sexo e idade em animais de acordo com a presença de alterações histológicas pela técnica de HE, em cães provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro no período de 2012 e 2013.....29
- Tabela 6-** Frequência de sinais clínicos em cães de acordo com o resultado da técnica de IHQ para diagnóstico de *Leishmania* spp., provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro no período de 2012 e 2013.....34
- Tabela 7** – Avaliação de raça, sexo e idade em cães de acordo com o resultado da técnica de IHQ para diagnóstico de *Leishmania* spp. no pâncreas, provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, no período de 2012 e 2013.....35

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Fiocruz) – Número LW-038/08.....	53
Anexo B - Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Fiocruz) – Número LW-054/13.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

α – Alpha (Alfa)

β - Beta

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

cPLI – Canine pancreatic immunoreactivity

DM - Diabetes melito

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DPP® - Imunocromatografia de Duplo Percurso

ELISA - Teste de Ensaio Imunoenzimático

Fiocruz- Fundação Oswaldo Cruz

HE- Hematoxilina-eosina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana/Human Immunodeficiency vírus

IC – Intervalo de confiança

IHQ – Imuno-histoquímica

IPE – Insuficiência pancreática exócrina

INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

LV- Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

LVZ - Leishmaniose Visceral Zoonótica

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

μm – Micrometro

mm - Milímetro

MS- Ministério da Saúde

NNN – Meio de Cultura Schneider

p.p – Pontos percentuais

PSTI – Inibidor da secreção da tripsina pancreática

RNA – Ácido ribonucleico

WHO – Organização Mundial de Saúde / World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL ZONÓTICA	1
1.2 CICLO BIOLÓGICO	1
1.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	3
1.4 SINAIS CLÍNICOS NO CÃO	5
1.5 PATOGENIA NO CÃO	6
1.6 PÂNCREAS NO CÃO	7
1.6.1. <i>Fisiologia e anatomia do pâncreas no cão</i>	7
1.6.2. <i>Alterações pancreáticas em cães</i>	12
1.7 PANCREATITE, CAQUEXIA E LVC	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVO GERAL	17
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5 METODOLOGIA	18
5.1 AMOSTRA	18
5.2 HISTOPATOLOGIA E IMUNO – HISTOQUÍMICA	19
5.3 CULTURA PARASITOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	20
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
6 ASPECTOS ÉTICOS	21
7 RESULTADOS	22
7.1 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	24
7.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA	33
7.3 PARASITOLÓGICO	35
8 DISCUSSÃO	36
9 CONCLUSÕES	43
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	57
ANEXO A – LICENÇA DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/FIOCRUZ)	58
ANEXO B – LICENÇA DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/FIOCRUZ)	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL ZONÓTICA

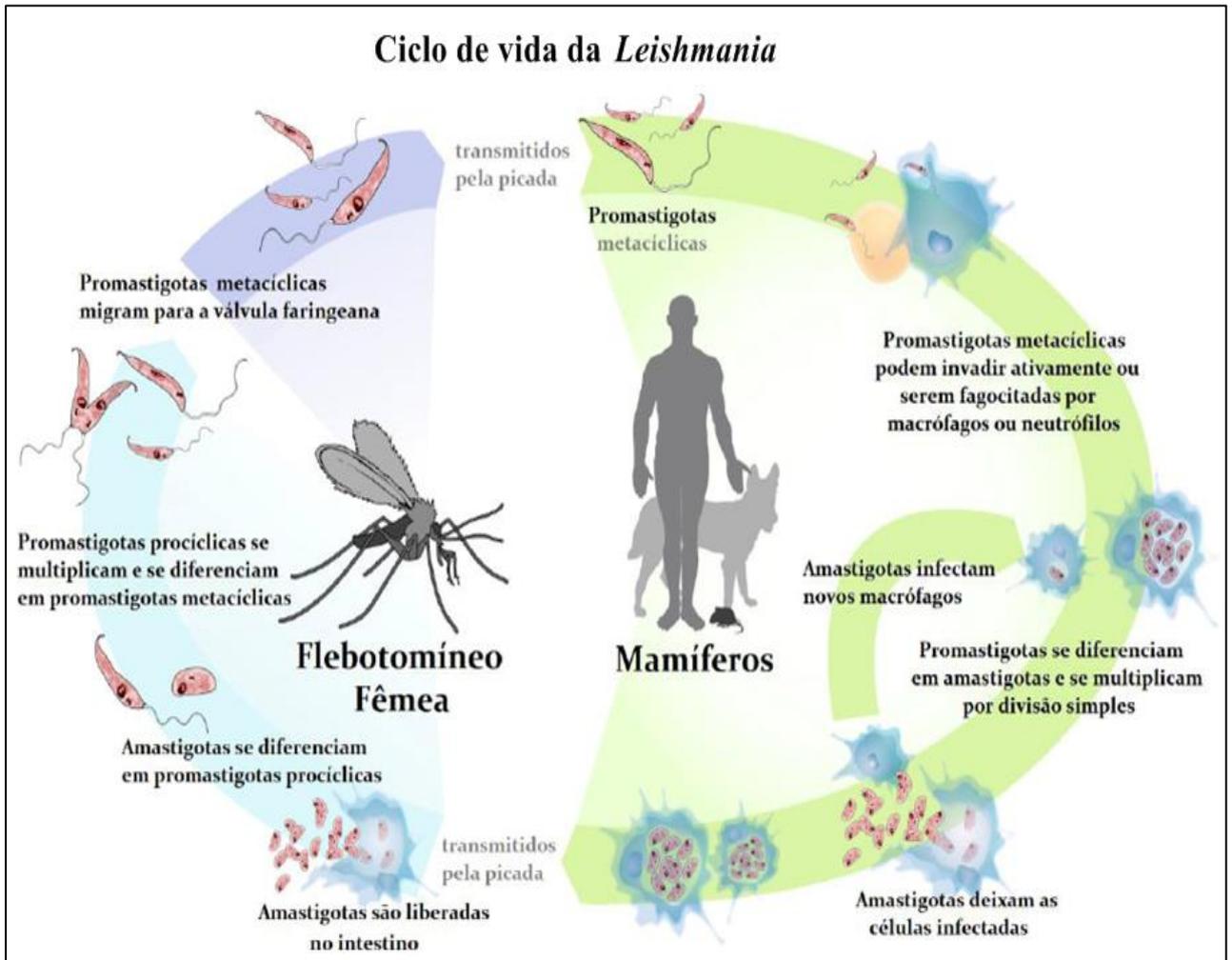
A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é uma doença que afeta humanos e mamíferos domésticos e selvagens. É causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*) (GRAMICCIA & GRADONI, 2005). A principal forma de transmissão é a vetorial, na qual formas promastigotas do protozoário são inoculadas nos hospedeiros vertebrados pelas fêmeas dos insetos flebotomíneos, que são os hospedeiros invertebrados. O principal vetor responsável pela transmissão é a espécie *Lutzomyia longipalpis* (SILVA *et al.*, 2015). O cão doméstico (*Canis familiaris*) é um dos hospedeiros vertebrados e o principal reservatório de *L. infantum* nas áreas urbanas (BURNA *et al.*, 2010; GONTIJO & MELO, 2004). A transmissão venérea também ocorre, pois, a frequência de *Leishmania* spp. no trato genital é alta em ambos sexos e em cães sintomáticos e assintomáticos, sugerindo que não há tropismo de acordo com o sexo e que mesmo os cães infectados assintomáticos têm o potencial de transmissão venérea deste parasita (BOECHAT, *et al.*, 2016). Anteriormente já foi detectado formas viáveis de *L. infantum* no útero de cadelas, indicando a possibilidade de transmissão vertical da leishmaniose visceral canina (LVC) (SILVA, *et al.*, 2009; BOECHAT, *et al.*, 2016)

1.2 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo de vida da *Leishmania* spp. apresenta-se em duas formas diferentes, no hospedeiro vertebrado e invertebrado. O ciclo tem início com a inoculação de formas infectantes do parasito (promastigota metacíclico) durante o repasto sanguíneo da fêmea de flebotomíneo no hospedeiro vertebrado (MONTALVO *et al.*,

2012). Existem ainda registros de transmissões acidentais por transfusões sanguíneas (DANTAS-TORRES, 2006). Quando chegam à circulação, as formas promastigotas de *Leishmania* spp. utilizam de mecanismos próprios para escapar à lise celular, ativada pelo sistema complemento. Portanto, o protozoário *Leishmania* spp. sobrevive ao ataque do hospedeiro devido a esse mecanismo protetor e ainda consegue acometer macrófagos através da manipulação de receptores celulares (CAMPOS-PONCE et al., 2005). O ataque de macrófagos é uma estratégia essencial para a sobrevivência da *Leishmania*. Neles há proteção a resposta imune do hospedeiro. As formas promastigotas fagocitadas pelos macrófagos se transformam em formas amastigotas, dentro de um vacúolo parasitóforo (fagossomo) e se multiplicam por divisão binária, levando ao rompimento do macrófago parasitado. Após haver o rompimento celular as formas amastigotas são novamente liberadas e infectam novos macrófagos. Quando o vetor realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ingere macrófagos parasitados pela forma amastigota de *Leishmania* spp.. Já no tubo digestivo do vetor, as formas amastigotas, transformam-se novamente em promastigotas, completando o ciclo, como representado pela figura 1.

Figura 1: Ciclo de vida da *L. infantum*. Promastigotas metacíclicas são transferidos para o hospedeiro vertebrado durante repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea. As promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos/neutrófilos e dentro do vacúolo (fagossomo) se transformam em amastigotas. As formas amastigotas se multiplicam por divisão binária. As amastigotas são liberadas do macrófago, infectando novos macrófagos. O vetor se alimenta de sangue do hospedeiro vertebrado infectado e ingere macrófagos parasitados. No tubo digestivo do vetor as amastigotas se transformam em promastigotas, aderidos ao epitélio intestinal do vetor passam por diferenciação terminal e evolui para a forma metacíclica e o ciclo se completa.



Fonte: http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_viscerar_canina.html

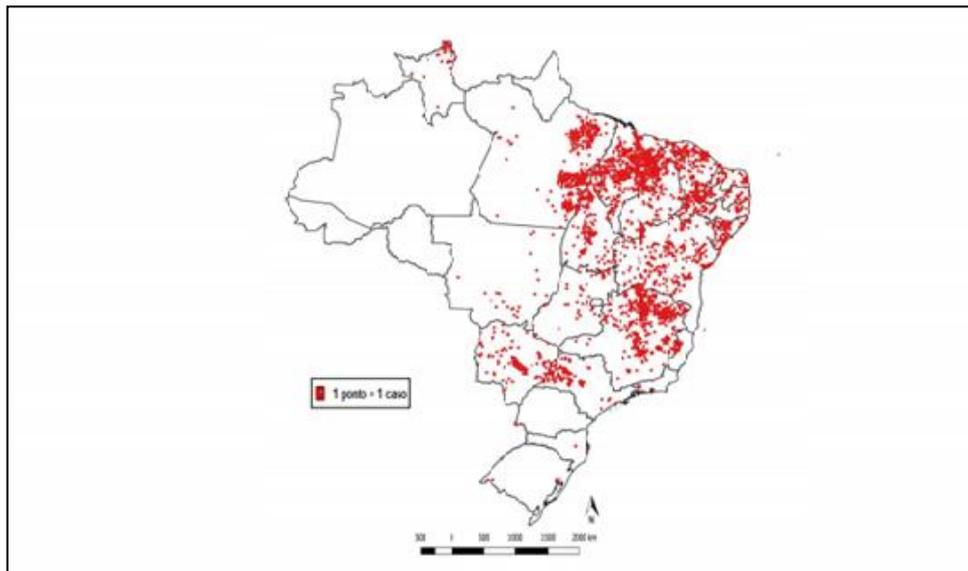
1.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

É uma doença endêmica registrada em mais de 66 países do Velho Mundo e em 22 países do Novo Mundo, sendo concentrada em apenas 6 países, Índia,

Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (WHO, 2014). A leishmaniose está presente em toda a América Latina, sendo o Brasil o país com maior número de novos casos nas Américas (WHO, 2010).

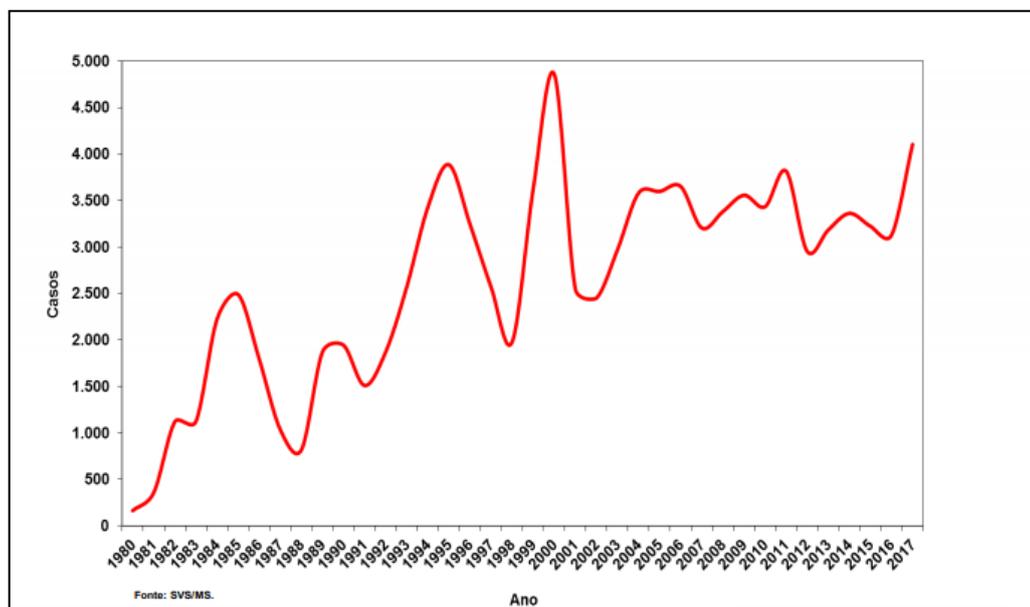
A Leishmaniose Visceral (LV) ocorre em todas as regiões do Brasil (Figura 2), sendo que a maioria dos casos humanos são registrados nas regiões Norte e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No Brasil, há exponencial aumento da expansão da LVZ (Figura 3), havendo relatos de casos em áreas antes consideradas livres da doença (TONINI *et al.*, 2012). A única região livre de casos autóctones da doença era a região Sul. Entretanto, nessa região os primeiros casos de LVZ em cães e humanos foram registrados respectivamente em 2008 e 2009 no município de São Borja (FIGUEIREDO *et al.*, 2012).

Figura 2 : Casos de LV por município de infecção. Brasil, 2017.



Fonte: SVS/MS

Figura 3: Casos de Leishmaniose Visceral no Brasil 1980 a 2017.



Fonte: SVS/MS

Nos últimos anos, apesar de ações de controle envolvendo o cão doméstico serem realizadas rotineiramente em áreas endêmicas do estado do Rio de Janeiro, cada vez mais tem sido verificados novos casos de LVZ em diversos municípios, com especial destaque para Barra Mansa (SILVA *et al.*, 2015; PIMENTEL *et al.*, 2014). Um dos fatores do aumento considerável é o transporte de cães positivos de áreas endêmicas para áreas livres da doença e a progressiva capacidade de adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis*.

1.4 SINAIS CLÍNICOS NO CÃO

O quadro clínico da leishmaniose visceral canina (LVC), é de amplo espectro, com sinais clínicos inespecíficos. Sendo assim, o animal pode apresentar desde nenhum sinal clínico a graves quadros de caquexia, o que num todo, desenvolvem um processo debilitante, de percurso crônico. Entre os sinais clínicos da LVZ os mais presentes são a caquexia/magreza, linfadenomegalia, onicogrifose, alopecia, lesões cutâneas, esplenomegalia, hepatomegalia, lesões oculares, porém em diversos casos, os animais não apresentam sinais clínicos (ABRANCHES *et al.*,

1991; CIARAMARELLA & CORONA, 2003). Alguns sinais, entre eles, o emagrecimento progressivo e distúrbios locomotores, concernente à fraqueza muscular, são também observados com certa frequência. O animal que apresenta diversos sinais clínicos levanta com maior inclinação a suspeita clínica da doença para o médico veterinário. (ABRANCHES *et al.*, 1991).

Contudo, os cães infectados, não demonstraram nenhum sinal clínico (CABRAL *et al.*, 1998) tendo potencial de haver a presença de parasitos até na pele sadia, advertindo para a relevância dos animais no ciclo de transmissão da doença (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2004).

1.5 PATOGENIA NO CÃO

Em cães infectados por *L. infantum*, a multiplicação desse parasito em macrófagos de diferentes tecidos leva à destruição dessas células, que parece induzir uma resposta imune mista do tipo Th1/Th2. Essa resposta imune pode resultar em alterações histológicas em diversos tecidos e órgãos do sistema fagocítico mononuclear, sistema cardiovascular, digestório, sistema nervoso central e sistema genito-urinário. Essas alterações são caracterizadas principalmente por uma reação inflamatória granulomatosa e por injúria imuno-mediada causada pelo depósito de imuno-complexos ou produção de auto-anticorpos (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). A inflamação granulomatosa geralmente também é acompanhada por infiltrado linfoplasmocitário e ou linfo-histiocítico, e ocasionalmente por infiltrado de neutrófilos (SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 1999). Essa inflamação é a principal responsável pelas alterações histológicas observadas em linfonodos, baço, medula óssea, fígado, intestinos, ossos, órgãos do trato genital masculino e feminino e mucosas. Por sua vez, mecanismos imuno-mediados parecem ser a principal causa das lesões histológicas renais tais como glomerulonefrite e nefrite intersticial e da miosite em músculos mastigatórios (SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 1999; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). É possível que a inflamação granulomatosa e a injúria imuno-mediada contribuam igualmente para geração das alterações histológicas observadas na pele, músculos, membrana

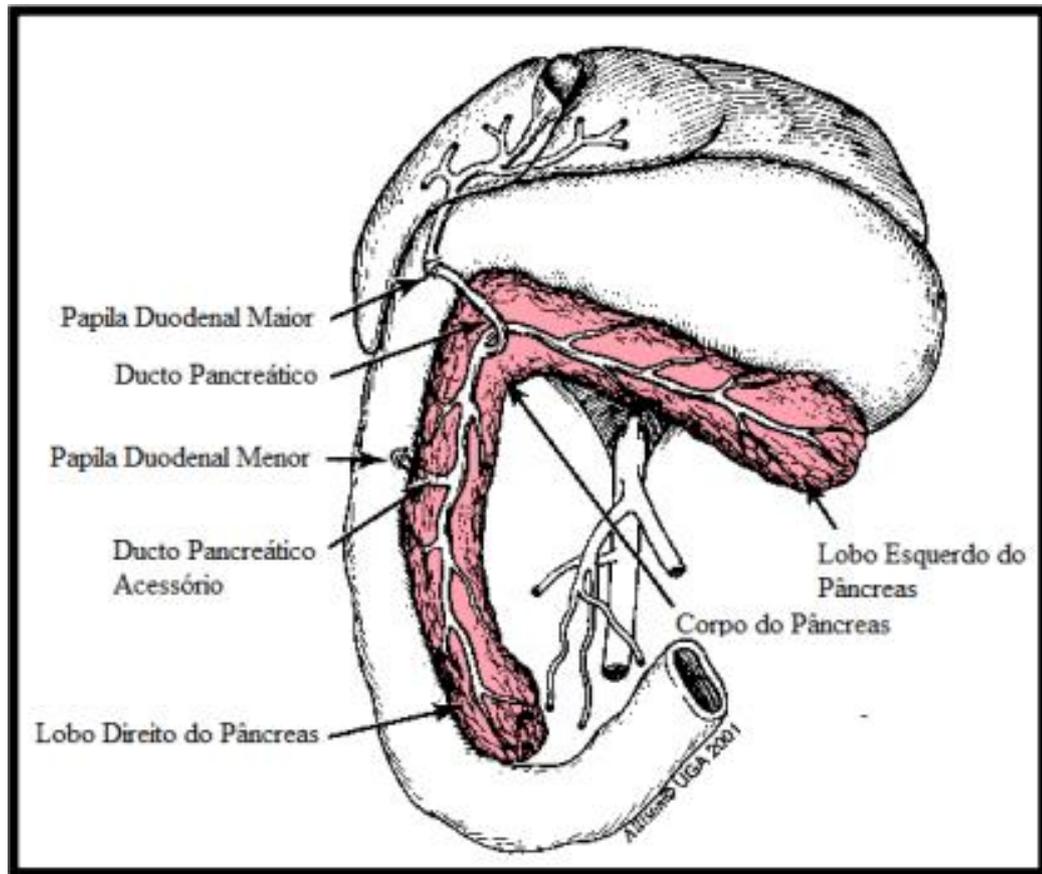
sinovial e olhos. Cada sinal clínico pode ser reflexo de alterações patológicas em um único órgão ou múltiplos órgãos ou de um mecanismo patológico mais complexo. Entretanto, os mecanismos patológicos envolvidos em alguns órgãos e em alguns sinais clínicos permanecem desconhecidos (SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 1999; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

1.6 PÂNCREAS NO CÃO

1.6.1. Fisiologia e anatomia do pâncreas no cão

O pâncreas fica localizado no abdômen cranial direito, é anatomicamente relacionado com estômago, fígado e duodeno (WILLIAM, 2005; STEINER, 2008). Possui coloração amarelada, consistência amolecida e semelhante a uma glândula salivar (DYCE *et al.*, 2010). Macroscopicamente, é composto por um lobo direito, próximo ao duodeno, um lobo esquerdo em proximidade ao baço e uma porção central, que é conhecida como corpo do pâncreas, com localização na curvatura da zona cranial do duodeno (Figura 4) (CULLEN; MACLACHLAN, 2001; KONIG, SAUTET & LIEBICH, 2005; STEINER, 2008).

Figura 4: Anatomia do pâncreas e sistema de ductos pancreáticos.



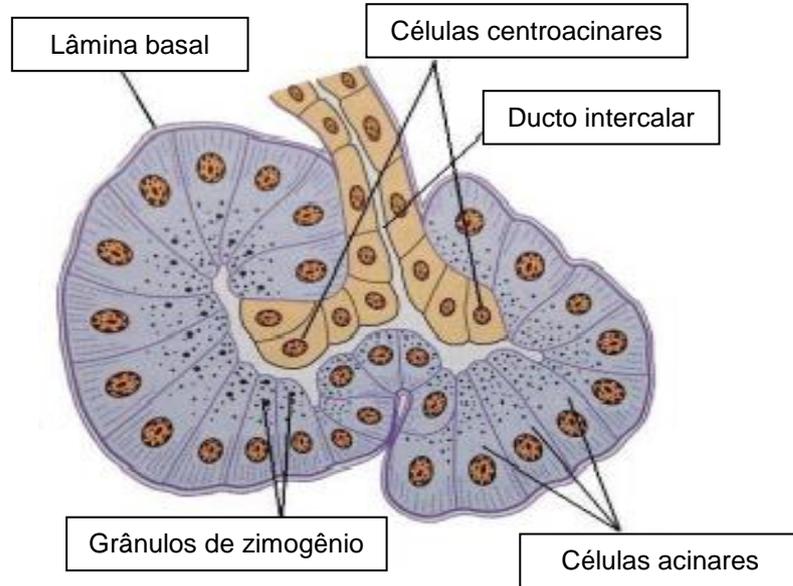
Fonte: CORNELL; FISCHER (2003)

Entre as espécies, há variação referente ao número de ductos pancreáticos, podendo ter ambos, ou, em alguns casos, atrofia em algum deles, sendo assim, a fusão remanescente que atrofia, com a parte do ducto intacto, permite que a secreção dos lobos pancreáticos vá para o duodeno (WILLIAM, 2005;). Nos cães, na maioria das vezes, os dois ductos persistem íntegros (STEINER, 2008), entretanto, há algumas exceções, onde só o ducto pancreático acessório, encontra-se presente (WILLIAMS, 2005).

O lobo direito do pâncreas é irrigado pelas artérias por duas artérias, a artéria pancreática-duodenal cranial e caudal, sendo a primeira ramificação da artéria celíaca e a segunda da artéria mesentérica cranial (WILLIAMS, 2005). O corpo e o lobo esquerdo do pâncreas, são vascularizados por um ou mais ramos da artéria esplênica e pela artéria pancreática-duodenal caudal, uma ramificação da artéria mesentérica cranial (KONIG, SAUTET & LIEBICH, 2005).

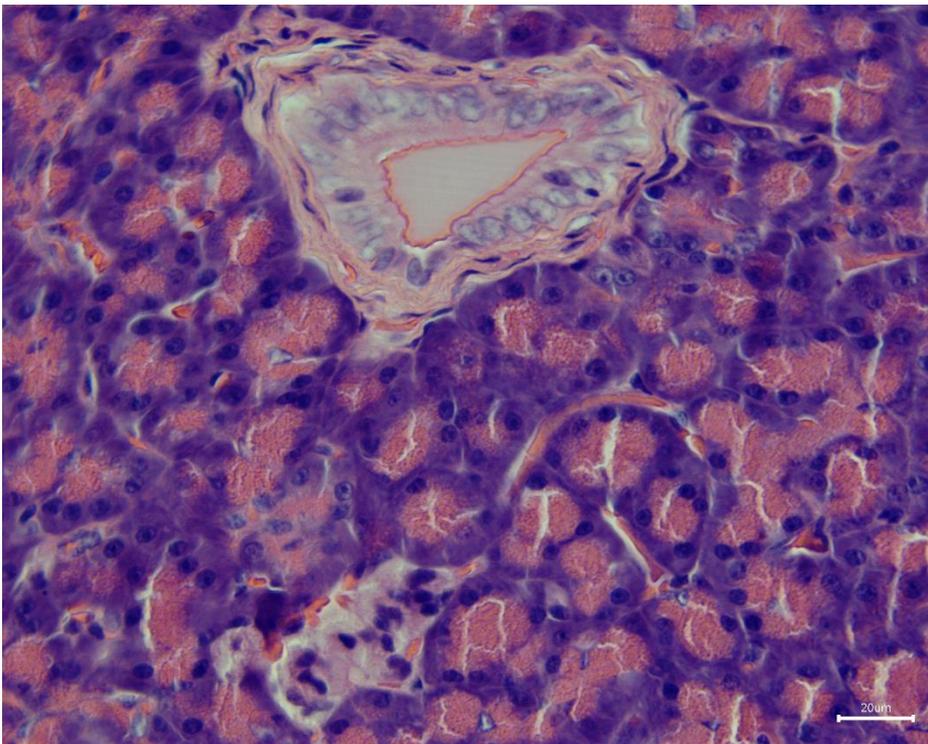
O pâncreas possui significativo papel na digestão dos cães, sendo uma das principais glândulas dos sistemas, endócrino e digestório (GRECO; STABENFELDT, 2015). Tem como principal função secretar enzimas digestivas e outras substâncias, colaborando com a absorção de nutrientes e de vitaminas e minerais, além de hormônios, como o glucagon e a insulina. (BUNCH, 2006). Dispõe de tecido endócrino e exócrino, este último sendo a maior parte do órgão. Na porção endócrina, encontram-se as ilhotas de Langerhans, composta em sua maior parte por células β responsáveis pela secreção de insulina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). Em menor número as células α , que secretam glucagon. Com menor frequência encontram-se as células F produtoras de polietídeo pancreático e células D, que produzem somatostatina (CAPEN, 2001). As ilhotas de Langerhans são fortemente vascularizadas, podendo receber até dez por cento do fluxo sanguíneo arterial pancreático (CHARLES, 2007). A porção exócrina é formada exponencialmente por uma glândula acinosa composta, tendo os ácinos pancreáticos como a parte excretora e responsáveis pelo preenchimento de aproximadamente 85% do pâncreas. Os ácinos possuem um núcleo arredondado, situado na metade inferior da célula e citoplasma apical eosinofílico, o que reflete a acumulação de numerosos grânulos de zimogênios (Figura 5) (KLIMSTRA, 2007). Microscopicamente, em cada lóbulo pancreático, células acinares são encontradas e elas sintetizam as enzimas digestivas e compõem o sistema de ductos intralobulares (CULLEN; MACLACHLAN, 2001).

Figura 5: Estrutura de um ácino pancreático.



Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO (2011)

Figura 6: Corte histológico de pâncreas normal de cão. Ácinos pancreáticos, ilha de Langerhans e ducto interlobular. HE.



Fonte: Lapclin Dermzoo, 2012.

Esses grânulos são liberados por exocitose quando há o estímulo no pâncreas (MANSFIELD, 2012). Na porção exócrina do pâncreas, ocorre a produção e secreção de enzimas digestivas, além de secreção de bicarbonato operante na neutralização do ácido gástrico e, além disso, a secreção do pâncreas inibe a proliferação bacteriana no duodeno (CORNELL; FISCHER, 2003; WILLIAMS, 2005). As secreções de enzimas digestivas são responsáveis pela quebra de proteínas, gorduras e carboidratos. (GRECO; STABENFELDT, 2015). As células acinares, secretam enzimas em sua forma inativa, como também em sua forma ativa (CHARLES, 2007; STEINER, 2008). Entretanto, enzimas que tenham a capacidade de digerir componentes da membrana celular são impreterivelmente secretadas na forma de zimogênio (STEINER,2008).

As enzimas proteolíticas, como a tripsina, quimotripsina e carboxipeptidases, exercem função na hidrólise proteica (RASTOGI, 2007). A hidrólise dos triglicerídeos ocorre devido mecanismo de ação da lipase, colesterolesterase e fosfolipase. Já enzima responsável pela hidrólise dos hidratos de carbono é a amilase (GUYTON & HALL, 2006). A nuclease, ribonuclease e desoxirribonuclease, são responsáveis pela quebra de ligações entre nucleotídeos do ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) dos alimentos ingeridos (RASTOGI, 2007).

Após a estimulação do pâncreas, inicia-se a secreção do suco pancreático, através dos ductos pancreáticos, na já referida secreção aquosa, contendo bicarbonato e produzida pelas células centroacinares e dos ductos (WILLIAMS, 2005; MIX & JONES, 2006).

As enzimas pancreáticas (Quadro 1), são cruciais na digestão da maioria das dietas, entretanto as enzimas orais, gástricas e a bordadura em escova dos enterócitos, contribuem também para esse processo de digestão (STEINER, 2008).

Quadro 1: Integrantes da secreção pancreática exócrina.

Enzimas na forma inativa (Zimogênios)	Enzimas na forma ativa	Outros produtos secretados
Tripsinogênio	Lipase	Água
Quimotripsinogênio	Amilase	Bicarbonato
Proelastase	Carboxielastase	Fator intrínseco
Fosfolipase	Desoxirribonuclease	Fatores antimicrobianos
Procarboxipeptidase	Ribonuclease	Inibidor da secreção da tripsina pancreática (PSTI)
Procolagenase		Fatores tróficos intestinais
Procolipase		

(Adaptado de STEINER, 2008).

1.6.2. Alterações pancreáticas em cães

São várias as doenças que podem acometer o pâncreas e se dividem em dois grupos, as endócrinas, principalmente a diabetes mellitus, insulínoma, neoplasia das células β e neoplasia secretora de gastrina, o gastrinoma (BUNCH, 2006). Na porção exócrina, destacam-se as neoplasias, cálculos, atrofia, hiperplasia e distúrbios de suas secreções (McGAVIN; ZACHARY, 2009), contudo a pancreatite é destacada como a doença pancreática mais relatada em cães. (RUAUX, 2003; WESTERMARCK; WIBERG, 2003).

A pancreatite advém no pâncreas exócrino e se apresenta em duas formas: a forma aguda e a crônica. A forma aguda apresenta incidência de 0,5% (SHEN *et al.*, 1999), podendo ser fatal se o tratamento não for da forma adequada (MANSFIELD *et al.*, 2003). Nestes animais, os sinais clínicos mostram-se inespecíficos, entretanto, vômitos são os sinais mais relatados. O animal pode ainda apresentar outros sinais, como: anorexia, desidratação, depressão, dor abdominal e dispneia. Casos mais

severos podem ainda apresentar icterícia, necrose hepatocelular, choque, sangramentos, arritmias cardíacas e desconforto respiratório. (BUNCH, 2006; PLUNKETT, 2006). Possui pouca ou nenhuma alteração patológica permanente (SHERDING *et al.* 2003; TILLEY; SMITH JR, 2008).

Em sua forma crônica, a pancreatite é geralmente acompanhada por fibrose e atrofia parenquimatosa (McGAVIN; ZACHARY, 2009). Entende-se que a doença seja subestimada, devido inespecificidade dos sinais clínicos, entre eles caquexia/magreza, perda de massa muscular, perda de pelos e ainda porque não há uma técnica laboratorial padrão ouro, cuja coleta de amostra biológica a ser examinada não seja invasiva para o diagnóstico (WATSON, 2003; XENOULIS & STEINER, 2012).

Atualmente, há melhores métodos laboratoriais para o diagnóstico, aumentando exponencialmente o grau de reconhecimento da doença pelos médicos veterinários (ARMSTRONG & WILLIAMS, 2012). Porém, a etiologia, fisiopatologia, diagnóstico, classificação, tratamento e o prognóstico, permanecem desafiadores e bastante controversos (MIX & JONES, 2006; MANSFIELD, 2011; BAZELLE & WATSON, 2015).

O diagnóstico definitivo de pancreatite só pode ser realizado pelo exame histopatológico do pâncreas, sendo igualmente esta a única forma de diferenciar a pancreatite aguda da crônica e ainda, em alguns casos, pancreatite de neoplasia (MARQUES, 2015).

Outros mecanismos de diagnóstico, como mensuração de amilase e lipase, auxiliam no diagnóstico, visto que o aumento simultâneo dessas enzimas indicam pancreatite (GASCÓN; ASCEÑA, 2001). Entretanto, é de conhecimento que a lipase pancreática canina, pode informar resultados falso-positivos em cerca de 40% dos cães (HAWORTH *et al.*, 2014). Ainda assim, exames de imagem também ajudam o direcionamento do diagnóstico (STEINER, 2003; RUAUX, 2003).

Animais com estágio avançado de pancreatite crônica apresentam sinais de diabetes mellitus (DM) e insuficiência pancreática exócrina (IPE) (BUNCH, 2006). A pancreatite crônica, fibrose cística, ressecção pancreática ou outras causas de obstrução do ducto pancreático, incluindo carcinoma, podem causar má absorção intestinal de nutrientes (FISHER, 1999). Na pancreatite, a função exócrina estará reduzida e isso resulta em uma má digestão de gordura, carboidratos e proteínas. Vale destacar importantes etiologias que podem levar a um quadro de pancreatite

em cães entre elas: fatores alimentares, hiperlipoproteinemia, fármacos, toxinas, hipercalcemia, obstrução do canal, refluxo biliar duodenal, trauma pancreático, isquemia e causas idiopáticas. Doenças específicas, tais como leishmaniose e babesiose também são relatadas como causa da pancreatite em cães, embora não está claro se a causa é a doença ou o tratamento dessas parasitoses (MANSFIELD, 2012; MOHR, *et al.*, 2000).

1.7 PANCREATITE, CAQUEXIA E LVC

A pancreatite crônica associada às infecções parasitárias também pode causar caquexia em animais e humanos (RACHID *et al.*, 2011), porém a sua ocorrência em cães infectados por *L. infantum* foi pouco estudada.

A caquexia, importante sinal clínico apresentado em cães soropositivos para *L. infantum* carece de mais informações histológicas, para melhor compreensão da sua etiologia. Segundo Koutinas e Koutinas (2014), a caquexia seria uma das consequências da proteinúria causada por glomerulonefrite associada à infecção por *L. infantum*. A caquexia também tem sido atribuída à anorexia, competição entre parasito e hospedeiro por nutrientes essenciais como triptofano e reduzida absorção intestinal (SLAPPENDEL, 1988; KEENAN *et al.*, 1984). Em humanos há relato de uma co-infecção de *L. infantum* em pâncreas de paciente portador do vírus da imunodeficiência humana (HIV). A necropsia revelou pâncreas normal ao exame macroscópico. A microscopia ótica do pâncreas revelou: atrofia pancreática grave, diminuição dos grânulos de zimogênio, anormalidades nucleares discretas e presença de formas amastigotas de *Leishmania* em macrófagos intersticiais, além da positividade para antígenos de *Leishmania* e vírus HIV-p24 na imunohistoquímica (CHEHTER *et al.*, 2001). Carrasco *et al.* (1997) relatam um caso de cão com leishmaniose visceral apresentando sinais clínicos de pancreatite aguda. Ao exame microscópico do pâncreas, foram evidenciados numerosos lóbulos com áreas centrais de hemorragia, exsudato fibrinoso e necrose, com um infiltrado difuso de neutrófilos. Septos interlobulares foram engrossados por uma intensa acumulação de exsudato fibrinoso e hemorragia. Entretanto, não foram observadas formas

amastigotas de *Leishmania* nesse órgão. O diagnóstico final foi de pancreatite hemorrágica aguda associada a LV.

2 JUSTIFICATIVA

A LVC está em expansão no Brasil e no estado do Rio de Janeiro. Atualmente, no município de Barra Mansa tem ocorrido uma epidemia de leishmaniose visceral com mais de três mil casos caninos diagnosticados entre 2011 e 2013 (MELLO *et al.*, 2014) e nove casos humanos registrados, com quatro óbitos entre 2010 e 2013 (PIMENTEL *et al.*, 2014). Apesar das alterações histológicas e suas associações com sinais clínicos serem conhecidos para diversos órgãos em cães infectados por *L. infantum*, ainda são escassas as informações em alguns órgãos, dentre eles, inclui-se o pâncreas. Adicionalmente, a ocorrência de formas amastigotas de *Leishmania* no pâncreas de cães é pouco conhecida. Em estudo piloto em cães de Barra Mansa detectamos pancreatite granulomatosa associada a formas amastigotas de *Leishmania*, o que motivou o presente estudo. A caquexia/magreza é um sinal clínico comum em cães com leishmaniose visceral, porém sua etiologia não é bem conhecida e pode estar associada com pancreatite causada pelo parasitismo por *L. infantum*, o que precisa ser avaliado. Recentemente por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, liberou o medicamento “Milteforan®”, sendo a miltefosina o princípio ativo do medicamento em questão, para tratamento da leishmaniose visceral canina no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016). Porém, não são conhecidos os efeitos adversos desse medicamento no pâncreas de cães. Fármacos usados para o tratamento da leishmaniose visceral em humanos, como o antimoniato de meglumina podem causar como efeito adverso a pancreatite (LYRA *et al.*; 2016). Nesse contexto, o conhecimento da ocorrência de *L. infantum* no pâncreas de cães naturalmente infectados e das alterações histológicas nesses órgãos fornece informações importantes para melhor conhecimento da patogenia dessa parasitose em cães, assim como subsídios para futuros estudos sobre reações adversas associadas aos medicamentos anti-*Leishmania* utilizados no tratamento de cães parasitados. Por meio das técnicas de imuno-histoquímica e hematoxilina-eosina é possível identificar as alterações histológicas e formas amastigotas no pâncreas de cães infectados com *L. infantum*, correlacionando a presença do parasito com as alterações histológicas.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a frequência de infecção por *Leishmania infantum* e as alterações histológicas associadas em pâncreas de cães domésticos naturalmente infectados.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as alterações histológicas no pâncreas de cães soropositivos para anticorpos anti-*L. infantum*.

Verificar a associação de sinais clínicos de caquexia /magreza com alterações histológicas em cães com pâncreas infectado por *L. infantum*.

Avaliar a carga parasitária de *L. infantum* no pâncreas de cães soropositivos para anticorpos anti-*L. infantum*.

Verificar a associação entre a carga parasitária de *L. infantum* no pâncreas e os sinais clínicos de caquexia/magreza.

Verificar a associação entre a carga parasitária de *L. infantum* no pâncreas e a intensidade do infiltrado inflamatório nesse órgão.

5 METODOLOGIA

5.1 AMOSTRA

Trata-se de um estudo retrospectivo de amostra de conveniência composta por 143 amostras de pâncreas de cães soropositivos para anticorpos anti- *L. infantum* concomitantemente no teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunocromatografia de duplo percurso (DPP®). As amostras foram coletadas entre 2012 e 2013 de cães soropositivos para LVC, provenientes do município de Barra Mansa, situado ao sul do estado do Rio de Janeiro. Barra Mansa fica localizado às margens do Rio Paraíba do Sul, na região fluminense do Médio Paraíba, entre as Serra do Mar e da Mantiqueira. O município é uma área endêmica da LVZ no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Inicialmente, os cães foram examinados clinicamente por meio da inspeção de pele e de mucosas oral e ocular, palpação dos linfonodos superficiais e órgãos. Os sinais clínicos foram descritos em prontuários. Foram considerados como sinais clínicos de leishmaniose visceral canina (LVC): onicogribose, alopecia, lesões cutâneas, caquexia, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, lesões oculares. Em seguida, os cães foram submetidos à eutanásia por meio da administração de *overdose* de tiopental sódico por via endovenosa, de acordo com o programa nacional de controle de LV, Decreto nº 51.838/1963. Na necropsia, o pâncreas foi examinado macroscopicamente e amostras desse órgão foram fixadas em formalina tamponada a 10% e posteriormente, processadas para emblocamento em parafina (CARSON; HLADICK, 2009) para realização das técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica. Adicionalmente, fragmentos de baço, pele, linfonodo e medula óssea, que foram coletados assepticamente e imersos em solução salina estéril contendo antimicrobianos para realização de cultura parasitológica.

5.2 HISTOPATOLOGIA E IMUNO – HISTOQUÍMICA

Cortes histológicos seriados de 5 µm foram obtidos a partir dos blocos de parafina armazenados no serviço de Anatomia Patológica do INI, que continham as amostras teciduais de pâncreas. Posteriormente, esses cortes foram montados em lâminas não-silanizadas para histopatologia e em lâminas silanizadas para imuno-histoquímica.

Para histopatologia, os tecidos foram corados com hematoxilina-eosina (HE) (CARSON; HLADICK, 2009). O infiltrado inflamatório no pâncreas foi classificado como: granulomatoso, quando houve predomínio de macrófagos; não granulomatoso, quando houve predomínio de outros tipos de células inflamatórias; supurativo, com presença de neutrófilos; não supurativo, com presença exclusiva de células mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos).

Para a avaliação da intensidade da inflamação, os tipos de células (macrófagos, plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos) detectados no infiltrado inflamatório foram analisados semi-quantitativamente, sob um microscópio de luz. Para este fim, usando uma grade óptica de 1 mm² e um contador manual de células, o número de células foi determinado em um campo microscópico no aumento de 400 x na área mais celular do corte histológico. A mediana foi calculada para todo o infiltrado inflamatório (soma de todos os tipos de células encontradas) de cada órgão.

Para imuno-histoquímica, as lâminas foram submetidas à desparafinação, reidratação, bloqueio da peroxidase endógena, recuperação antigênica, bloqueio da ligação não específica de proteínas, e a incubação com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* diluído a 1: 500, seguindo um protocolo previamente descrito (BOECHAT *et al.*, 2016). Um sistema de detecção à base de polímero (Polymer HiDef Detecção HRPTM Sistema, Cell Marque, Rocklin, CA, EUA) foi utilizado para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a avaliação da carga parasitária, macrófagos parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* foram quantificados como descrito para a quantificação de células inflamatórias por histopatologia. No entanto, as células foram contadas em cinco campos em aumento de 400 x nas zonas mais parasitadas das secções. O número médio de macrófagos parasitados foi calculado e o parasitismo classificado como ausente, leve a moderado (0,2 a 10 macrófagos parasitados) e intensa (mais de 10 macrófagos parasitados) (BOECHAT *et al.*, 2016).

5.3 CULTURA PARASITOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Leishmania*

As 143 amostras de fragmentos de baço e medula óssea foram inoculadas em meio bifásico Insecto NNN / Schneider (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino e incubadas a 26- 28 ° C (MADEIRA *et al.*, 2009). As formas promastigotas de *Leishmania* isoladas foram identificadas como *L. infantum* por eletroforese de enzimas *multilocus* utilizando cinco sistemas enzimáticos (CUPOLILLO *et al.*, 1994).

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise exploratória foram fornecidas as frequências relativas das variáveis categóricas com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%). Para as variáveis quantitativas, foram utilizadas as medianas e seus intervalos interquartílicos.

Para a comparação entre a ocorrência de sinais clínicos de caquexia e magreza e as diversas alterações histológicas nos 143 cães (fibrose, necrose, hemorragias, tipo de infiltrado inflamatório) foram empregados testes de associação qui-quadrado de Pearson e/ou teste exato de Fisher, no caso de contagens

esperadas < 5. Adicionalmente, foram comparadas as frequências das alterações histológicas com os resultados da IHQ para diagnóstico de *Leishmania* spp.

A comparação da intensidade do infiltrado inflamatório (para o total de células) nos cães positivos e negativos para *Leishmania* spp. no pâncreas foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

Para verificar a correlação entre a carga parasitária e a intensidade do infiltrado inflamatório, foi empregado a correlação de Spearman. Valores próximos a +1 indicaram correlação positiva, próximos a -1, correlação negativa e 0, ausência de correlação.

Os testes foram considerados significativos ao nível de 5%. Apesar da crítica ao uso exclusivo do p-valor e devido ao tamanho amostral em alguns grupos foi considerado também a relevância teórica e a diferença de ao menos 10 pontos percentuais (pp.) como indicativo de potencial diferença entre os grupos.

A análise foi realizada no software R versão 3.3.

6 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA / FIOCRUZ; Números LW-038/08 e LW-54/13).

7 RESULTADOS

Dos 143 animais avaliados, setenta e cinco eram machos (52,4%) e sessenta e oito (47,6%) eram fêmeas. Na população total, cento e dezoito cães foram classificados como sem raça definida (SRD) (82,5%). Dos 25 cães com raça definida, cinco eram Labrador Retriever, quatro Pinscher, três American Pitbull Terrier, três Dachshund, dois Cocker Spaniel, dois Rottweiler, dois Pastor Alemão, um Dobermann, um Pastor Branco Suíço, um Poodle e um Cane Corso. Em relação à faixa etária, cento e dois animais (71,3%) possuíam idade entre 1 e 7 anos, trinta e dois (22,3%) com idade acima de 7 anos e nove (6,2%) tinham até 12 meses. Em relação aos sinais clínicos, oitenta e dois animais (57,3%) apresentaram ao menos um sinal clínico compatível com LVC e sessenta e um (42,7%), não apresentaram nenhum sinal clínico. Em relação aos sinais clínicos apresentados a seguir, os animais que apresentaram descamação cutânea furfurácea, pêlo opaco, onicogribose, alopecia e úlcera cutânea foram enquadrados em um único grupo, descritos como alterações dermatológicas, assim como hepatomegalia e esplenomegalia. Alguns animais apresentaram mais de um sinal clínico como mostra a figura 6. Os sinais clínicos observados encontram-se na tabela 1.

Figura 7: Cão, fêmea, adulta, SRD, soropositivo para anticorpos *anti-Leishmania infantum*. Animal apresentando diversos sinais clínicos compatíveis com LVC como onicogrifose, úlceras, alopecia generalizada, pelo opaco, caquexia/magreza. Proveniência: Município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, 2013.



As frequências dos sinais clínicos observados se encontram na tabela 1.

Tabela 1. Frequência de sinais clínicos em 143 cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* spp., provenientes do município de Barra Mansa, no período de 2012 e 2013.

Sinal clínico	n=143	(%)
Alterações dermatológicas	40	28,0
Hepato/Esplenomegalia	40	28,0
Caquexia/Magreza	30	21,0
Linfadenomegalia	23	16,1
Alterações Oftálmicas	18	12,6

7.1 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

Foram analisadas 143 amostras de pâncreas, coradas com a técnica de hematoxilina-eosina (HE). Em sessenta e três amostras (44,1%), não foram encontradas alterações microscópicas. A pancreatite foi observada em 76 (53,1%) dos 143 cães, sendo 74 (51,7%) do tipo crônica (granulomatosa ou linfoplasmocitária) e 2 (1,4%) do tipo aguda (supurativa ou eosinofílica). As frequências dos tipos de pancreatite e demais alterações histológicas, foram descritas na tabela 4.

Tabela 2. Alterações histológicas observadas em 80 amostras de pâncreas de cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* provenientes de Barra Mansa, Rio de Janeiro, no período de 2012 a 2013.

Alterações histológicas no pâncreas	n (%)
Pancreatite granulomatosa	40 (50%)
Pancreatite linfoplasmocitária	34 (42,5%)
Degeneração vacuolar	7 (8,8%)
Fibrose	6 (7,5%)
Hemorragia	3 (3,8%)
Pancreatite eosinofílica	1 (1,2%)
Pancreatite supurativa	1 (1,2%)
Necrose	1 (1,2%)

Nos 22 cães com pâncreas positivos para *Leishmania* spp. na IHQ, as alterações histológicas no pâncreas foram observadas em vinte (90,9%) e nos 121 pâncreas negativos na IHQ, alterações histológicas no pâncreas foram observadas em sessenta (49,6%). As frequências das alterações histológicas no pâncreas nesses dois grupos de cães estão descritas na tabela 5.

Tabela 3. Frequência de alterações histológicas em pâncreas de acordo com resultado da técnica de IHQ para diagnóstico de *Leishmania* spp., provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro no período de 2012 e 2013.

Pâncreas			
Alterações histológicas	IHQ Negativa	IHQ Positiva	p valor
	n 60 (%)	n 20 (%)	
Pancreatite granulomatosa	23 (38,3%)	17 (85%)	0.001
Pancreatite linfoplasmocitária	31 (51,7%)	3 (15%)	0.004
Degeneração vacuolar	6 (10%)	1 (5%)	0.673
Fibrose	4 (6,7%)	2 (10%)	0.637
Hemorragia	2 (3,3%)	1 (5%)	1.000
Pancreatite eosinofílica	1 (1,7%)	0	1.000
Pancreatite supurativa	1 (1,7%)	0	1.000
Necrose	1 (1,7%)	0	1.000

Nos 30 animais que apresentaram caquexia/magreza, 17 (56,7%) possuíam alguma alteração histológica no pâncreas. Nos 113 animais sem caquexia/magreza, 63 (55,7%) possuíam alteração histológica no pâncreas. As frequências das alterações histológicas no pâncreas nos grupos sem caquexia/magreza e com caquexia/magreza estão descritas tabela 6.

Tabela 4. Frequência de alterações histológicas em pâncreas de cães com e sem sinal clínico de caquexia, provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro no período de 2012 e 2013.

Alterações histológicas no pâncreas	Sem caquexia/magreza	Com caquexia/magreza	p valor
	n 63 (%)	n 17 (%)	
Pancreatite granulomatosa	33 (52,4%)	7 (41,2%)	0.586
Pancreatite linfoplasmocitária	25 (39,7%)	9 (52,9%)	0.410
Degeneração vacuolar	4 (6,3%)	3 (17,6%)	0.161
Fibrose	4 (6,3%)	2 (11,8%)	0.602
Hemorragia	3 (4,8%)	0	1.000
Pancreatite eosinofílica	1 (1,6%)	0	1.000
Pancreatite supurativa	1 (1,6%)	0	1.000
Necrose	1 (1,6%)	0	1.000

Considerando a ocorrência de pancreatite (granulomatosa, linfoplasmocitária, eosinofílica e supurativa) em cães com e sem caquexia/magreza observou-se uma frequência de pancreatite de 53,3% em cães com caquexia/magreza e 53,1 % em cães sem caquexia/magreza. Não houve associação estatisticamente significativa entre pancreatite e caquexia/magreza (p valor=1.000).

Na pancreatite granulomatosa, os infiltrados inflamatórios eram predominantemente constituídos por macrófagos, havendo também plasmócitos e linfócitos (Figura 8). Em seis amostras (15%), foram observadas pela coloração HE formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior dos vacúolos parasitóforos no citoplasma de macrófagos (Figura 9).

Figura 8: Corte histológico de pâncreas de cão infectado por *Leishmania* spp. mostrando pancreatite com infiltrado inflamatório granulomatoso intersticial difuso, moderado e composto principalmente por macrófagos, havendo também linfócitos e plasmócitos. HE

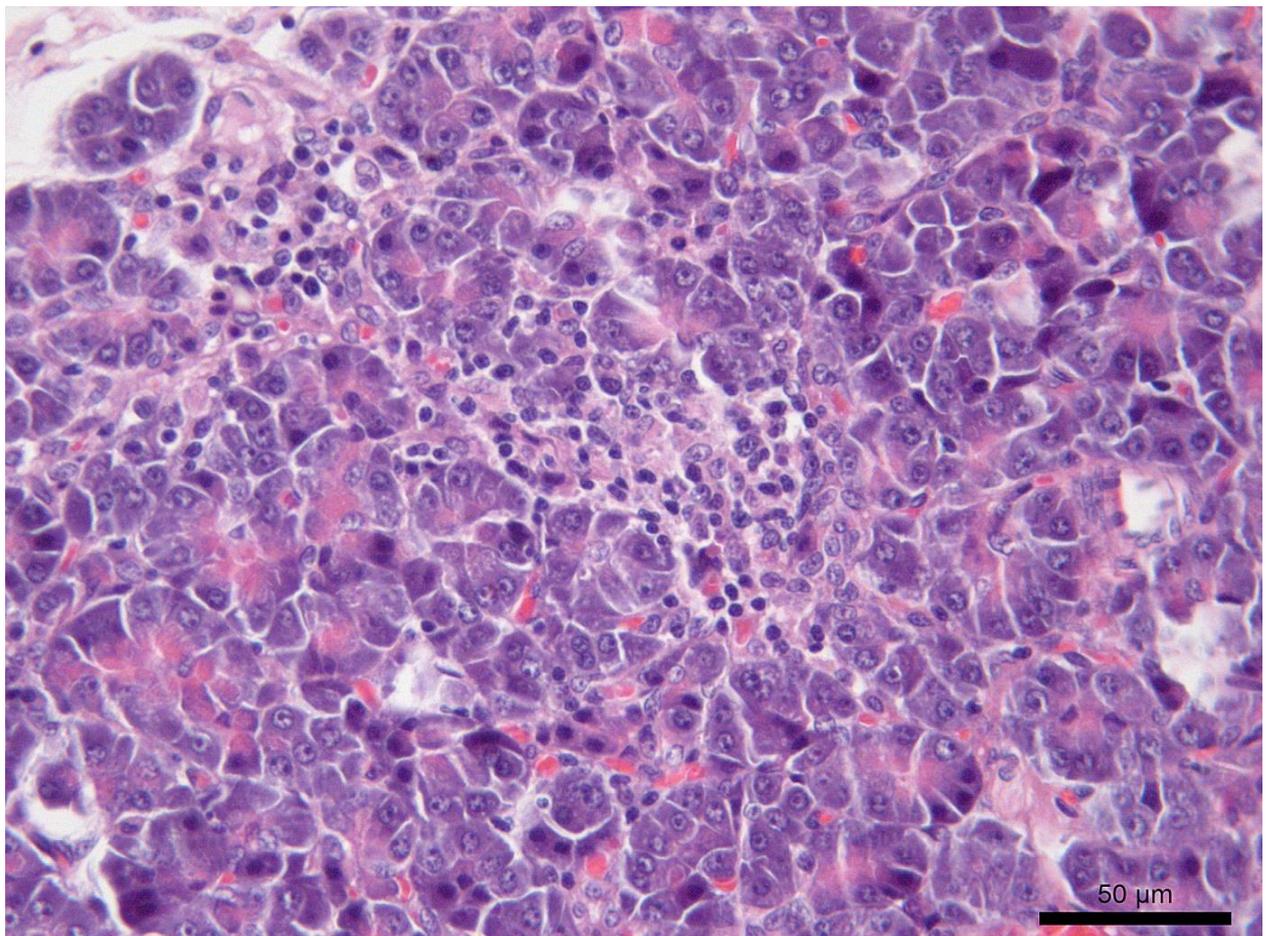
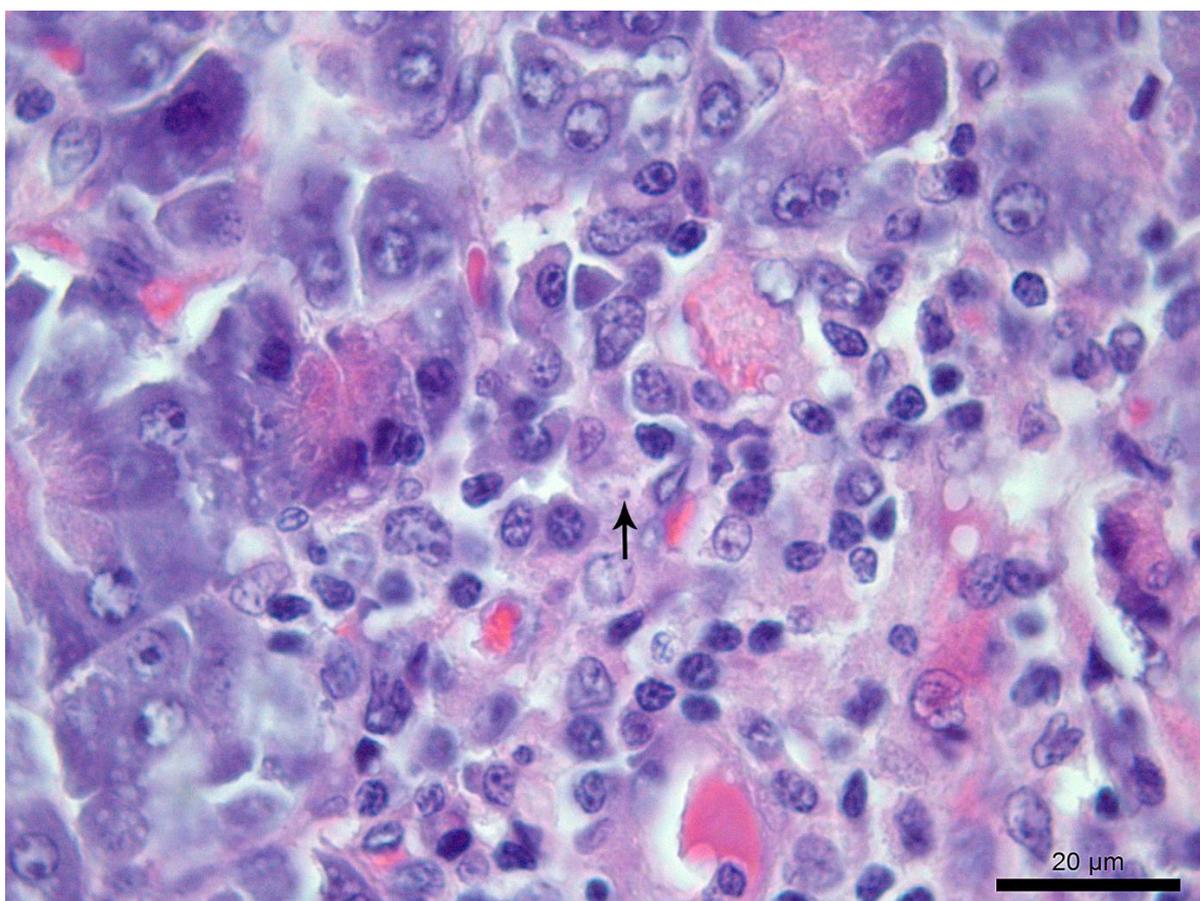


Figura 9: Corte histológico de pâncreas de cão infectado por *Leishmania* spp. mostrando pancreatite com infiltrado inflamatório granulomatoso intersticial difuso, moderado e composto principalmente por macrófagos. Visualiza-se a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. (Seta) (HE)



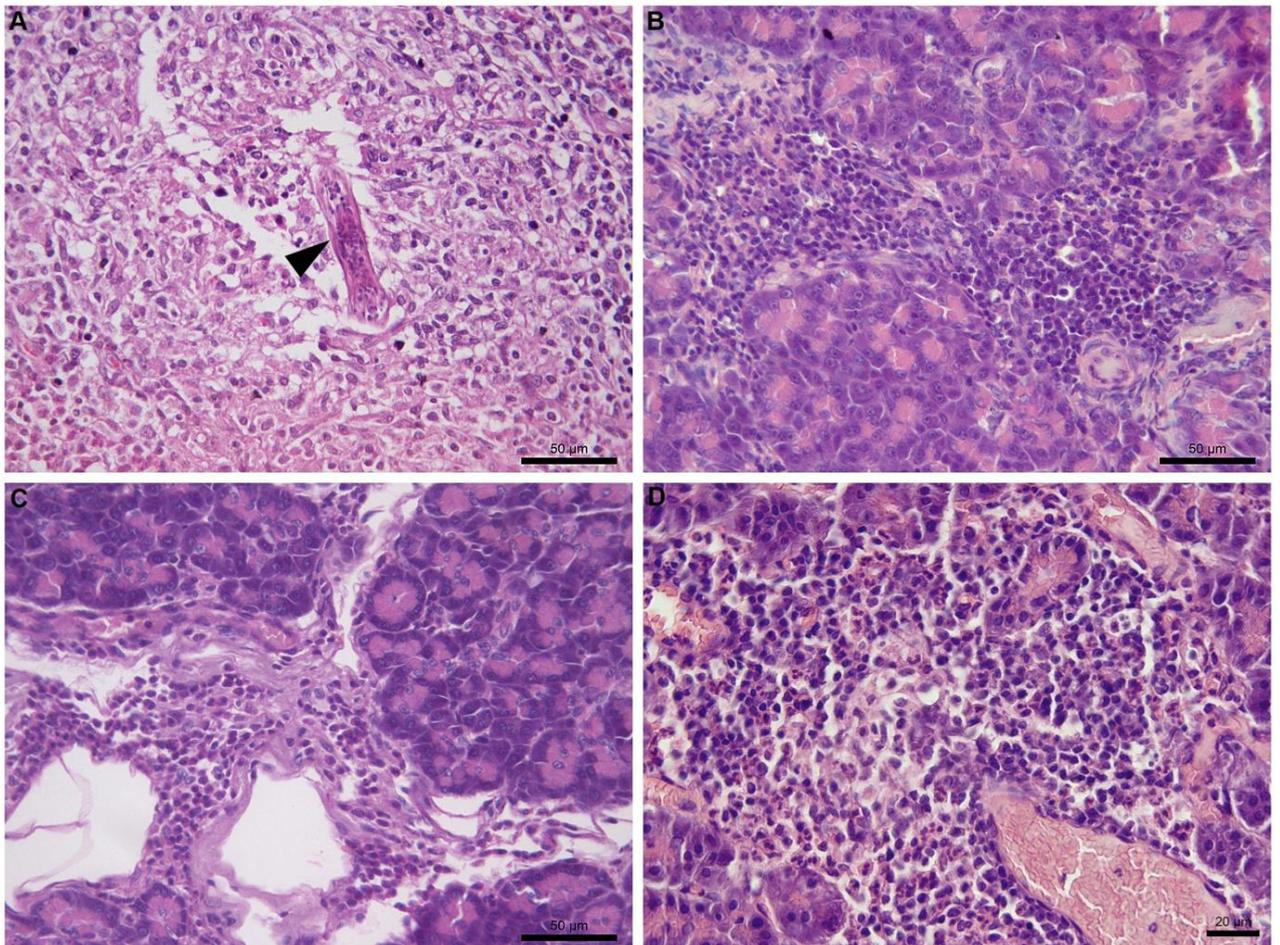
Em um dos casos com pancreatite granulomatosa foi observada larva de nematoide no parênquima. Neste caso, que foi negativo para amastigotas de *Leishmania* spp., além do infiltrado de macrófagos havia também muitos eosinófilos, linfócitos e plasmócitos, além de fibrose (Figura 10).

Na pancreatite linfoplasmocitária foi observado infiltrado inflamatório multifocal, principalmente perivascular, constituído principalmente por linfócitos e plasmócitos, havendo macrófagos em menor número (Figura 10).

Na pancreatite eosinofílica foi observado infiltrado inflamatório multifocal, principalmente perivascular. Constituído principalmente por eosinófilos, havendo também linfócitos e plasmócitos em menor número (Figura 10).

Na pancreatite supurativa foi observado infiltrado inflamatório multifocal, principalmente perivascular. Constituído principalmente por neutrófilos, havendo também muitos linfócitos, plasmócitos e macrófagos em menor número (Figura 10).

Figura 10: Corte histológico de pâncreas corado pela técnica de HE de cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania infantum*, mostrando quatro diferentes tipos de pancreatite. (A) Pancreatite granulomatosa, difusa, moderada e composta principalmente por macrófagos, havendo linfócitos, plasmócitos e eosinófilos em menor número. Visualiza-se a presença de larva de nematoide no parênquima (cabeça de seta). (B) Pancreatite linfoplasmocitária intersticial, acentuada, constituída principalmente por linfócitos e plasmócitos. (C) Pancreatite eosinofílica perivascular, constituída principalmente por eosinófilos, havendo linfócitos e plasmócitos em menor número. (D) Pancreatite supurativa, perivascular, constituída principalmente por neutrófilos, havendo também muitos linfócitos e plasmócitos e macrófagos em menor número.



Foram analisadas as frequências de raça, idade e sexo nos grupos pesquisados de animais com e sem alterações histológicas no pâncreas, como descrito na tabela 7. Dos cães com raça definida que apresentaram pancreatite, quatro eram Labrador Retriever, três Pinscher, dois American Pitbull Terrier, dois

Cocker Spaniel, um Rottweiler, um Pastor Alemão, um Pastor Branco Suíço e um Dachshund.

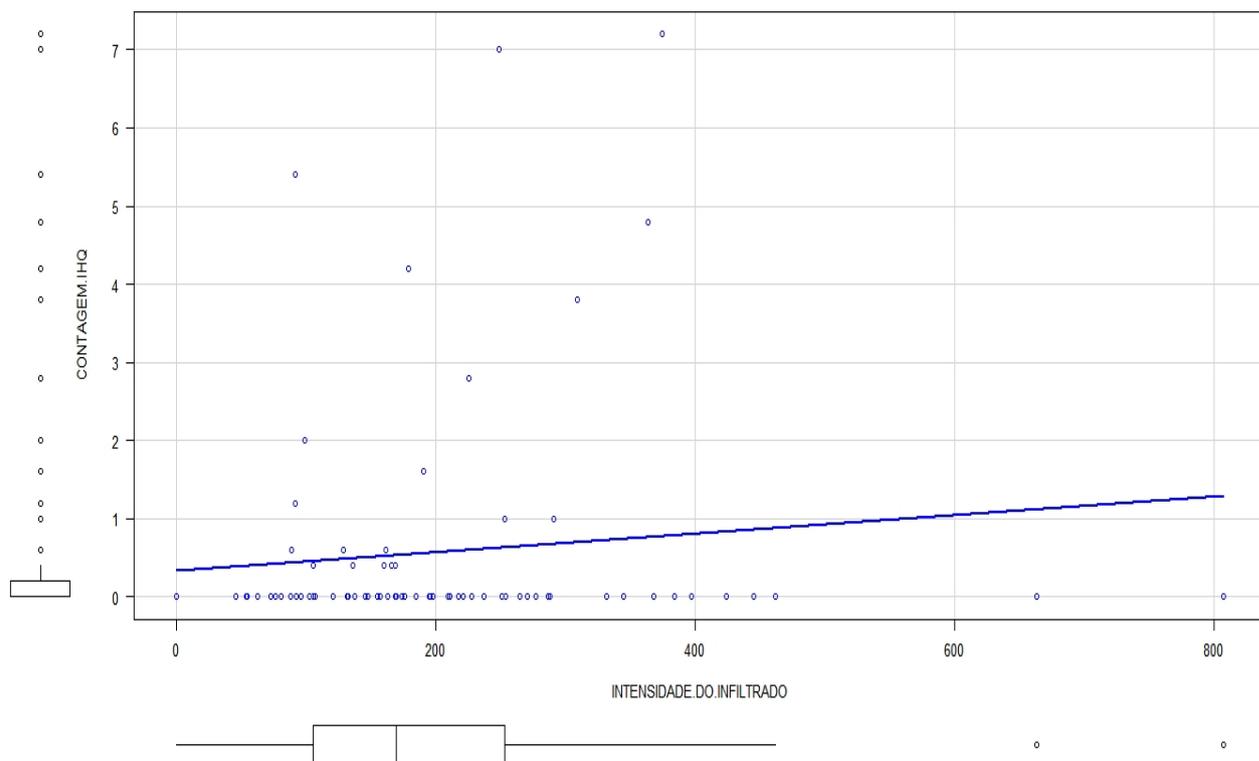
Tabela 5. Avaliação de raça, sexo e idade em animais de acordo com a presença de alterações histológicas pela técnica de HE, em cães provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro no período de 2012 e 2013.

Características dos cães	Pâncreas		p valor
	Com alteração histológica n 80 (%)	Sem alteração histológica n 63 (%)	
Sem raça definida	65 (81,2%)	53 (84,1%)	0.825
Com raça definida	15 (18,8%)	10 (15,9%)	
Macho	40 (50%)	35 (55,6%)	0.613
Fêmea	40 (50%)	28 (44,4%)	
Até 12 meses	6 (7,5%)	3 (4,8%)	0.320
De 1 a 7 anos	53 (66,2%)	49 (77,8%)	
Mais que 7 anos	21 (26,2%)	11 (17,5%)	

Em relação aos animais que apresentaram pancreatite, a mediana do infiltrado inflamatório foi de 175 células inflamatórias/mm², sendo 46 a mínima e 807 a máxima. Nos animais positivos para formas amastigotas de *Leishmania* spp. no pâncreas na técnica de IHQ, que apresentaram simultaneamente quadro de pancreatite, a mediana foi de 167,5 células inflamatórias/mm², sendo o valor mínimo de 89 e máximo de 375 células inflamatórias/mm². Nos animais com pancreatite e negativos na técnica de IHQ, a mediana foi de 172 células inflamatórias/mm², variando entre 46 e 807 inflamatórias/mm².

A carga parasitária presente nos animais positivos na técnica de IHQ foi testada através da correlação de Spearman com a intensidade do infiltrado inflamatório como mostra a figura 11.

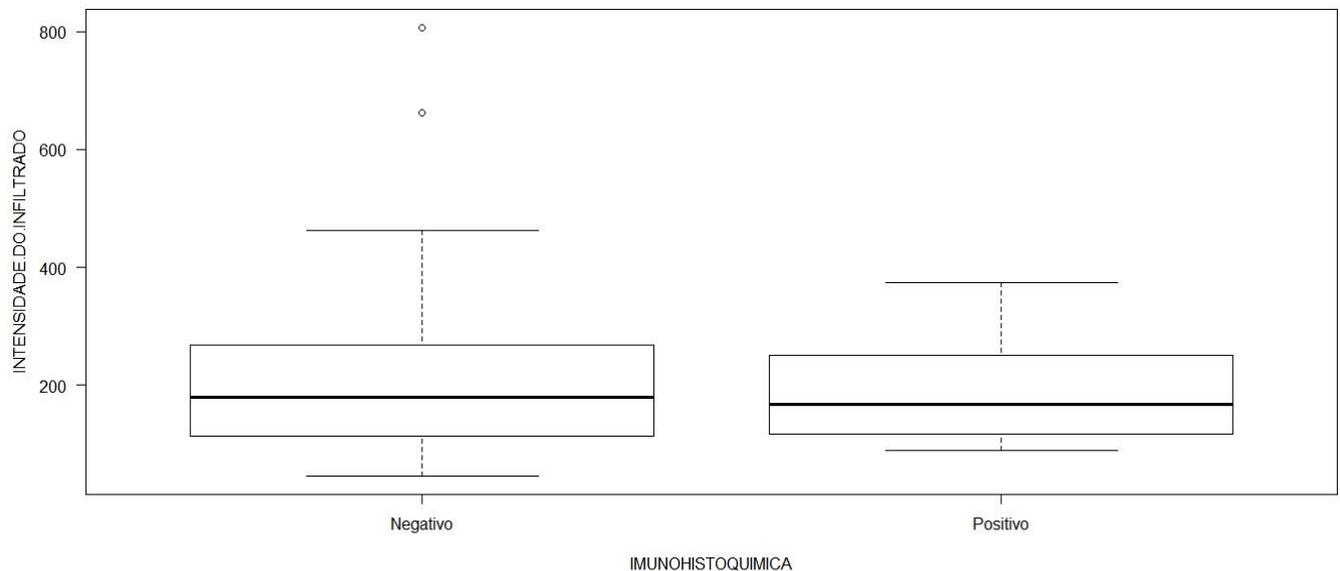
Figura 11: Relação da carga parasitária de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no pâncreas encontrada na técnica de IHQ com a intensidade do infiltrado inflamatório, em cães soropositivos anti-*Leishmania* spp. provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, no período de 2012 e 2013.



A correlação apresentou valor de 0.048, tendo o p.valor =0.672.

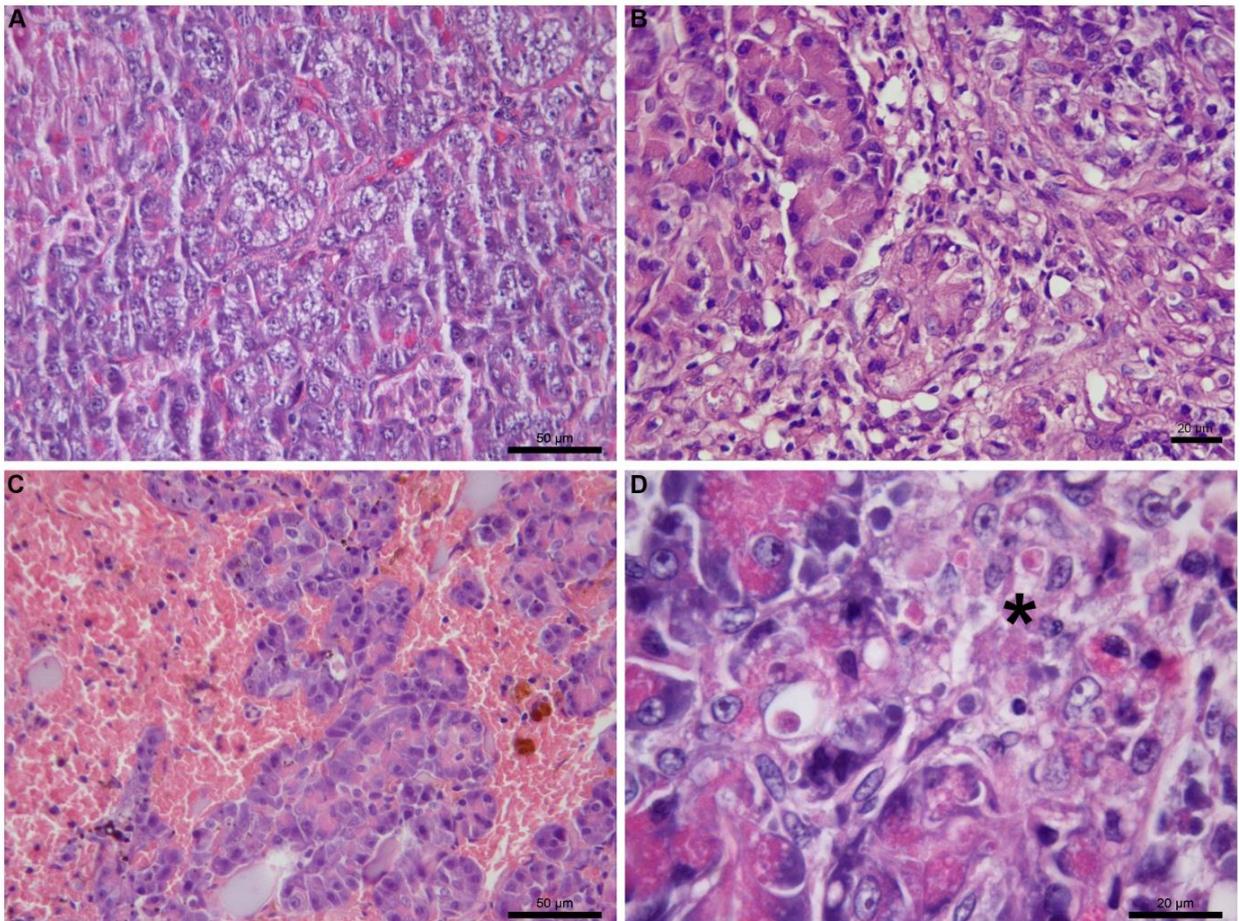
A comparação da intensidade do infiltrado inflamatório (para o total de células) nos cães positivos e negativos para *Leishmania* spp. no pâncreas, foi realizada pelo teste de Mann-Whitney como demonstrado na figura 12, sem relevância estatística (p valor=0.881).

Figura 12: Comparação entre intensidade do infiltrado inflamatório nos cães positivos e negativos para *Leishmania* spp. no pâncreas, de acordo com a técnica de IHQ, provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, no período de 2012 e 2013.



Além das pancreatites, foram observadas outras alterações histológicas (degeneração vacuolar, fibrose, hemorragia e necrose). Entre essas alterações a degeneração vacuolar foi a mais comum, presente em sete cães (8,8%), fibrose em seis cães (7,5%), hemorragia em três (3,8%) e necrose em um (1,2%). As alterações histológicas encontradas no pâncreas estão demonstradas na figura 13.

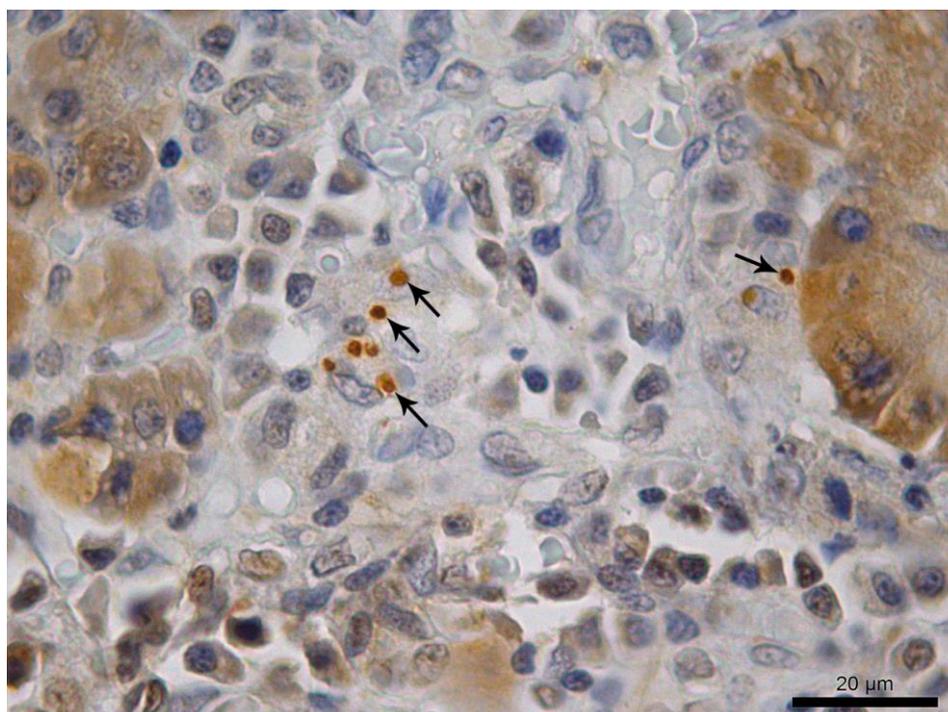
Figura 13: Corte histológico de pâncreas corado pela técnica de HE de cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania infantum*, mostrando quatro tipos de alterações histológicas. (A) Degeneração vacuolar e difusa de ácinos pancreáticos. (B) Fibrose no parênquima. (C) Extensa área de hemorragia com presença de hemossiderina no parênquima (D) Discreto foco de necrose no parênquima (asterisco).



7.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram analisadas 143 lâminas de amostras de pâncreas, a partir da técnica de imuno-histoquímica (IHQ). Em vinte e dois casos (15,4%), o resultado foi positivo para formas amastigotas de *Leishmania* spp. Nos casos positivos, formas amastigotas de *Leishmania* spp. foram observadas no citoplasma de macrófagos presentes no tecido intersticial e tecido conjuntivo em torno dos ductos interlobulares (Figura 7).

Figura 14: Corte histológico de pâncreas de cão mostrando formas amastigotas de *Leishmania* spp. coradas em castanho no citoplasma de macrófagos no tecido intersticial. Imuno-histoquímica



Em relação aos 22 animais positivos pela técnica de IHQ para *Leishmania* spp., treze cães (59,1%) apresentaram pelo menos um sinal clínico. Enquanto nos 121 cães negativos pela técnica de IHQ, 52 (43%) apresentaram sinais clínicos. Os sinais clínicos e suas frequências nesses dois grupos de cães encontram-se na tabela 2.

Tabela 6- Frequência de sinais clínicos em cães de acordo com o resultado da técnica de IHQ para diagnóstico de *Leishmania* spp., provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro no período de 2012 e 2013.

Sinais Clínicos	IHQ negativo	IHQ positivo	p valor
	n 121 (%)	n 22 (%)	
Caquexia/magreza	21 (17,4%)	9 (40,9%)	0.021
Alterações dermatológicas	33 (27,3%)	7 (31,8%)	0.797
Hepatoesplenomegalia	34(28,1%)	6 (27,3%)	1.000
Linfoadenomegalia	18 (14,9%)	5 (22,7%)	0.353
Alterações oftálmicas	14 (11,6%)	4 (18,2)	0.482

Em relação à carga parasitária de formas amastigotas de *Leishmania* spp., nos 22 cães que apresentaram positividade, a mediana de carga parasitária foi de 1,4 macrófagos infectados por mm², sendo o valor mínimo de 0,4 macrófagos infectados/mm² e o máximo de 7,2 macrófagos infectados/mm². Em relação à carga parasitária nos animais com sinais clínicos, a mediana foi de 2,0 macrófagos infectados/mm², sendo o valor mínimo de 0,4 macrófagos/mm² e o máximo de 7,2 macrófagos infectados/mm². Em relação à carga parasitária nos animais que não apresentaram sinal clínico, a mediana foi de 0,6 macrófagos infectados/mm², sendo o valor mínimo de 0,4 macrófagos/mm² e o máximo de 7,0 macrófagos infectados/mm².

Nos cães positivos para *Leishmania* spp. na IHQ com sinal clínico de caquexia (n=9) a mediana da carga parasitária foi de 3,8 macrófagos infectados/mm², sendo o valor mínimo de 0,6 e o máximo de 7,2 macrófagos infectados/mm². Nos cães positivos para *Leishmania* spp. na IHQ sem sinal clínico de caquexia (n=13), a mediana da carga parasitária foi de 0,6 macrófagos infectados, sendo 0,6 a mínima e 7,0 a máxima.

Foram avaliados individualmente nos dois grupos, um dos 22 animais positivos para *Leishmania* spp. na IHQ e o outro dos 121 animais negativos para *Leishmania* spp. para avaliar se houve associação da detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no pâncreas com a raça, sexo e idade dos cães. Os

seguintes dados foram descritos na tabela 3. Nos quatro cães positivos na técnica de IHQ, em relação à raça dois eram Labrador Retriever, um Pinscher e um Cocker Spaniel

Tabela 7 – Avaliação de raça, sexo e idade em cães de acordo com o resultado da técnica de IHQ para diagnóstico de *Leishmania* spp. no pâncreas, provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, no período de 2012 e 2013.

Características dos cães	Pâncreas		p valor
	IHQ negativa n= 121 (%)	IHQ positiva n = 22 (%)	
Sem raça definida	100 (82,6%)	18 (81,8%)	1.000
Com raça definida	21 (17,4%)	4 (18,2%)	
Macho	58 (47,9%)	17 (77,3%)	0.019
Fêmea	63 (52,1%)	5 (22,7%)	
Até 12 meses	8 (6,6%)	1 (4,5%)	0.846
De 1 a 7 anos	87 (71,9%)	15 (68,2%)	
Mais que 7 anos	26 (21,5%)	6 (27,3%)	

N= número de cães; IHQ= técnica de imuno-histoquímica

7.3 PARASITOLÓGICO

Dos 143 animais incluídos neste estudo, cento e quinze (80,4%) apresentaram positividade em pelo menos uma amostra de baço e/ou medula óssea. O baço foi o órgão com maior positividade, em 101 (70,62%), posteriormente a medula óssea em 92 (64,3%). Encontrou-se positividade em ambas as amostras em 80 (55,9%). Dos 22 animais positivos a IHQ, todos apresentaram cultura parasitológica positiva em baço e 18 apresentaram em medula óssea.

8 DISCUSSÃO

No presente estudo, a frequência de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em pâncreas foi relativamente baixa e ligeiramente inferior a frequência de positividade de 22,6% encontrada por Guerra *et al.* (2016) pela técnica de imuno-histoquímica. Esses autores examinaram pâncreas de 75 cães soropositivos para anticorpos anti-*L. infantum* e com isolamento de *L. infantum* por cultura parasitológica, provenientes de áreas endêmicas do estado de São Paulo. Quando comparada a frequência de positividade de formas amastigotas em pâncreas com outros órgãos em cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania*, o baço, medula óssea, fígado, linfonodo, pele e trato genital apresentam frequência de positividade maior pela técnica de imuno-histoquímica. As frequências de positividade de baço, medula óssea, fígado, linfonodo, trato genital e pele variam entre 50 e 94% (MOREIRA *et al.* 2007; COSTARDI, M.L, 2009; FRANCO, P. A; GUIMARÃES, E.P; ZORZATTO, J.R, 2013; BOECHAT *et al.*, 2016; GUERRA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.* 2017). Por sua vez, a frequência de amastigotas no pâncreas do presente estudo e de Guerra *et al.* (2016) foram superiores às encontradas em bexiga urinária, estômago, que variam em torno de 3 a 11%. Esses resultados sugerem que o pâncreas não é um órgão pelo qual o protozoário *L. infantum* apresenta tropismo, diferente dos órgãos do sistema fagocítico mononuclear, pele e trato genital (MOREIRA *et al.* 2007; COSTARDI, M.L, 2009; BOECHAT *et al.*, 2016; GUERRA *et al.*, 2016).

O isolamento de *L. infantum* pela cultura parasitológica em baço e ou medula óssea em todos os cães com infecção no pâncreas sugere que o acometimento desse órgão ocorre em decorrência do avanço da doença com acometimento prévio de outras vísceras. Apesar da baixa frequência de infecção por *Leishmania* spp. no pâncreas, recomenda-se a investigação desse protozoário nesse órgão quando o cão for submetido ao tratamento para *Leishmania* spp. O motivo é que, alguns fármacos usados no tratamento das leishmanioses podem causar pancreatite, entre eles, o antimoniato de meglumina, usado para tratamento de leishmanioses em

humanos (VÉLEZ, *et al.* 2010; LYRA, *et al.* 2016). Ademais, a técnica de imunohistoquímica apresenta limitações de sensibilidade, que varia em torno de 50 a 70%, sendo inferior a técnica de PCR (OLIVEIRA *et al.* 2017). Portanto, a frequência de infecção pancreática pode ser superior a encontrada neste estudo e futuros estudos utilizando técnicas moleculares devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

Em relação aos sinais clínicos dos cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania*, não houve diferenças significativas entre os animais positivos e negativos para presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em pâncreas, exceto caquexia/magreza. Com relação aos sinais clínicos compatíveis com LVC, nosso estudo apresentou frequência inferior à de 82,5 % e 83 % descritas anteriormente por Boechat *et al.* (2016) e Oliveira *et al.* (2017), respectivamente. Essa diferença nas frequências de sinais clínicos em cães provenientes da mesma área endêmica, provavelmente foi causada pelos critérios de inclusão desses dois estudos, que somente utilizaram cães com isolamento de *L. infantum* em cultura parasitológica, enquanto neste estudo foram incluídos cães soropositivos com ou sem isolamento em cultura.

Nos cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* do presente estudo, em relação à idade e raça, não houve diferença significativa entre os animais positivos e negativos para formas amastigotas de *Leishmania* spp. no pâncreas. Esses resultados corroboram os resultados observados por outros autores (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; AMÓRA *et al.*, 2006 e SANTOS *et al.* 2010), que não encontraram associação entre idade e raça e infecção por *L. infantum*. Entretanto, a frequência de positividade para *Leishmania* spp. na IHQ do pâncreas foi 54,6 pp superior em machos em relação as fêmeas. Este resultado opõe-se ao encontrado por França-Silva *et al.* (2003); Gontijo & Melo (2004) e Santos *et al.* (2010), que não observaram predisposição a infecção por *L. infantum* relacionada ao sexo. Apesar de estatisticamente ser significativa a diferença entre machos e fêmeas na infecção do pâncreas por *Leishmania* spp. há de se considerar o pequeno número de cães com infecção do pâncreas por *Leishmania* spp., que pode ter influenciado o resultado. Portanto, futuros estudos com uma amostra representativa de cães positivos são necessários para confirmar se os machos têm mais predisposição para infecção pancreática por *L. infantum*.

A frequência de alterações histológicas encontradas no pâncreas dos cães estudados foi alta, sendo a pancreatite a alteração mais comum, com predomínio da

forma crônica. Resultado similar foi encontrado em estudo realizado com 200 cães no centro de ciências patológicas da Universidade de Glasgow, Escócia (WATSON *et al.*, 2003). Na amostra desses autores, a frequência de alterações histopatológicas foi de 58,5%.

A pancreatite crônica também foi a mais encontrada, com ocorrência em 25,5% da amostra, cerca de metade do valor encontrado no nosso estudo. Os cães analisados por Watson *et al.*, (2015), são provenientes de um país onde a leishmaniose visceral canina não é endêmica e também não foi relatada a presença do parasito por esses autores. Portanto, a prevalência mais elevada de pancreatite crônica neste estudo, sugere que a infecção por *L. infantum* possivelmente influenciou na ocorrência desta alteração histológica.

No presente estudo, não houve correlação em relação a sexo, raça e idade, nos animais com e sem alteração histológica. Entretanto, há divergências em relação a outros autores, que apesar de também não terem encontrado relação entre sexo e raça com pancreatite em cães, verificaram que ela é mais frequente em cães com idade superior a cinco anos (CHARLES, 2007; ARMSTRONG, 2011). Diferentemente, de acordo com Bunch (2006) e Xenoulis (2015) a pancreatite aguda é mais frequente em cães de meia idade a idosos, sem predisposição ao sexo e com maior frequência de raças Terrier. Sherding *et al.* (2003) e Ueda *et al.* (2011) citam como raças predispostas Yorkshire Terrier, Schnauzer miniatura, Poodle e Cocker Spaniel, com predominância para o sexo feminino e para cães com meia idade a idosos. Watson *et al.* (2003), mostraram risco relativo aumentado de pancreatite crônica em Cavalier King Charles Spaniel, Collies e Boxers. Raças como Pastor Alemão, Jack Russel Terrier, West Highland White Terrier e Chow Chow são mais predispostos à pancreatite aguda, nos quais pode haver presença de herança autossômica recessiva, podendo ser autoimunes (BRENNER *et al.*, 2009). Nos cães, a pancreatite aguda é a forma mais frequente dentre as formas de pancreatite, sendo relatadas taxas de mortalidade entre os 27 e 58% (MANSFIELD, C. 2012).

Diferentemente, no presente estudo a pancreatite crônica foi a forma predominante nos cães soropositivos para anticorpos anti- *L. infantum*. A pancreatite crônica é caracterizada por mudanças histológicas permanentes no pâncreas, progressivas e com prognóstico desfavorável (FERNANDES, 2015). São exemplos dessas lesões permanentes a degeneração vacuolar dos ácinos, fibrose e necrose, evidenciadas em quadros de pancreatite crônica, também foram encontradas no

presente estudo (BOSTROM, *et al.*, 2013). Essas alterações anatômicas, geralmente irreversíveis e progressivas, são acompanhadas de infiltrados, granulomatoso e linfoplasmocitário (MCGAVIN; ZACHARY, 2009; THOMPSON *et al.*, 2009), corroborando com os achados do presente estudo.

A pancreatite em cães geralmente é classificada como idiopática, devido ter sua etiologia desconhecida. Entretanto, diversos fatores que causam pancreatite em cães já são conhecidos, tais como fatores alimentares, neoplasias, infecção ascendente por bactérias intestinais, terapias medicamentosas, obstrução de ducto pancreático e migração parasitária (BUNCH, 2006; SHERDING *et al.*, 2003). No presente estudo, a pancreatite foi observada em número mais elevado nos animais positivos para *Leishmania* spp. no pâncreas em relação aos animais negativos, o que sugere que a presença do parasito está relacionada a essas alterações. Dentre os tipos de pancreatite observada, a granulomatosa apresentou associação significativa com a presença das formas amastigotas de *L. infantum*, enquanto a pancreatite linfoplasmocitária apresentou associação significativa com a ausência do parasito.

De forma semelhante, o infiltrado granulomatoso é o tipo de reação inflamatória associado a infecção por *Leishmania infantum* em outros órgãos, como pele, órgãos do sistema fagocítico mononuclear, fígado, trato genital e sistema nervoso central (KOUTINAS & KOUTINAS, 2014; BOECHAT. *et.al.*, 2016; OLIVEIRA. *et.al.*, 2017). Entretanto, a pancreatite granulomatosa também pode ter outras causas, como observado por Williams (2005), que relatou que doença hepática pode estar em associação com pancreatite, sugerindo que poderá ser resultado de comprometimento vascular secundário a alterações na coagulação, acumulação de toxinas ou mesmo uma causa comum às duas doenças. O desenvolvimento de pancreatite por outros agentes já foi anteriormente sugerido como potencial complicação da babesiose canina (MÖHR, LOBETTI & VAN DER LUGT, 2000). Nesta pesquisa, um dos casos de pancreatite granulomatosa na ausência de formas amastigotas de *Leishmania* spp. foi associado a migração de larva de nematóide no parênquima do órgão, provavelmente pertencente a espécie *Toxocara canis*. As larvas infectantes desse nematóide quando ingeridas pelo cão e gato, perfuram a parede intestinal, caem na circulação sanguínea fazem uma migração hepato-cardiopulmonar (SERAKIDES, 2010). Essas larvas teriam chegado ao pâncreas ao perfurarem a parede do intestino delgado, devido à proximidade

desses dois órgãos, realizando um ciclo errático, conforme já relatado anteriormente (BUNCH, 2006). Muitos eosinófilos também foram observados no pâncreas desse cão, que são células inflamatórias associadas à migração de helmintos nos tecidos.

A pancreatite eosinofílica observada em um dos cães desse estudo também pode ter sido causada pela migração de helmintos, apesar do parasito não ter sido observado. Outros helmintos também são relatados como causadores de pancreatites em diferentes espécies de animais tais como o trematódeo *Eurytrema pancreaticum* no ducto pancreático de bovinos e larvas do nematoide *Strongylus vulgaris*, que podem migrar pelos vasos sanguíneos do pâncreas equino (BASSANI *et al.*, 2007; QUEVEDO *et al.*, 2013). Ademais, de acordo com o presente estudo a ocorrência de inflamação linfoplasmocitária também pode estar presente em cães com infecção pancreática por *L. infantum*. Diferentemente do presente estudo, Carrasco *et al.* (1997), relataram pancreatite aguda hemorrágica associada a infecção por *L. infantum* em um cão na Espanha, sugerindo que as lesões teriam sido em consequência de vasculite por depósito de imunocomplexos. Esses autores encontraram muitas formas amastigotas em baço e linfonodos, porém não detectaram formas amastigotas de *Leishmania* spp. no pâncreas. Portanto, mesmo não observando formas amastigotas de *Leishmania* spp. no pâncreas ou infiltrado granulomatoso nos casos de pancreatite dos demais cães, não se pode excluir a possibilidade de *Leishmania* spp. ter sido o agente etiológico dessa alteração. Também deve ser levado em consideração que todos os animais desse estudo eram soropositivos para esse parasito.

No grupo dos animais positivos para *Leishmania* spp. em pâncreas, houve aumento na frequência de caquexia/magreza de 23,5 pp. em relação aos animais negativos. Este aumento pode ser justificado pela visceralização e estadiamento da doença. O emagrecimento dos cães em áreas de leishmaniose visceral é frequente, entretanto em animais com curto período de estudo este sinal não é observado, o que corrobora com a hipótese de caquexia/magreza estar associada a animais com maior tempo de infecção (MATTOS JR. *et al.*, 2004). A caquexia/magreza no presente estudo foi encontrada em 21% da amostra, valor inferior ao encontrado por Boechat, *et al.*, (2016), entretanto, superior ao encontrado por Oliveira, *et al.*, (2017) em cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania*. Entretanto em ambos trabalhos só foram contabilizados os cães com caquexia, não sendo avaliado quadros de magreza, diferente da nossa análise de sinais clínicos.

A insuficiência pancreática exócrina (IPE) pode ser causada por um quadro de pancreatite crônica (WESTERMARCK & WIBERG, 2003). Alguns animais podem apresentar perda de peso acentuada, com perda muscular e ausência de gordura corporal palpável (WILLIAMS, 2004). Alterações dermatológicas também podem estar presentes, os pelos podem estar opacos e com baixa qualidade, apresentando queda excessiva (SHERDING *et al.*, 2003). Os cães afetados frequentemente podem desenvolver seborreia crônica, devido à deficiência de ácidos graxos essenciais e caquexia (GERMAN, 2012; WATSON, 2015). A mediana da carga parasitária no pâncreas em animais positivos de *Leishmania* spp. na técnica da IHQ foi maior no grupo dos animais com sinais clínicos comparada aos animais sem sinais clínicos. Adicionalmente, a mediana de carga parasitária no pâncreas de cães com caquexia/magreza foi superior quase três vezes em relação aos animais com sinais clínicos sem caquexia/magreza e mais de seis vezes em relação aos animais sem sinal clínico. Entretanto, os cães desta pesquisa que apresentaram sinais clínicos de caquexia/magreza tiveram semelhança na frequência de pancreatite com os cães que não apresentaram sinal clínico.

A baixa carga parasitária no pâncreas, bem como a intensidade do infiltrado inflamatório de leve a moderado, ausência de casos de atrofia e ocorrência de poucos casos de fibrose e degeneração, sugerem que parte significativa do pâncreas não foi acometida e, portanto, não houve um quadro de insuficiência pancreática exócrina (IPE). Para haver caquexia/magreza e outros sinais clínicos associados a pancreatite seria necessário um comprometimento de 90% ou mais da capacidade secretória do pâncreas (WESTERMARCK & WIBERG, 2003; SHERDING *et al.* 2008), o que leva a um quadro de IPE, causando má digestão.

Portanto, a não associação estatística entre pancreatite e caquexia/magreza no presente estudo, esteve provavelmente relacionada a ausência de IPE. Entretanto, como limitação desse estudo, não foi realizada a dosagem de enzimas pancreáticas no sangue, que seriam importantes para avaliar a extensão do comprometimento da função exócrina do pâncreas e a insuficiência pancreática, sobretudo o teste cPLI- canine Pancreatic Immunoreactivity, sendo ele um teste bem validado. Este teste consiste na medição da concentração sérica da lipase de origem pancreática somente, estando ela aumentada apenas quando existe inflamação em pâncreas (MANSFIELD, *et al.*, 2012). Atualmente, este teste é o de eleição para o diagnóstico em cães (XENOULIS & STEINER, 2013).

Portanto, novos estudos sobre consequências da infecção por *Leishmania* spp. no pâncreas devem avaliar não somente as alterações histológicas, mas também as enzimas indicadoras da função hepática e pancreática para confirmar as hipóteses levantadas com os resultados da presente pesquisa. Os resultados de associação da caquexia e magreza com infecção e maior carga parasitária no pâncreas de cães com esses sinais clínicos observados nessa pesquisa podem estar ligados a um estágio mais avançado da leishmaniose visceral. Quando a infecção atinge o pâncreas, ela estaria disseminada acometendo outras vísceras como nesse estudo e no de Carrasco *et al.* (1997). Em caso de leishmaniose visceral disseminada, poderiam ter ocorrido outras alterações que podem ter levado a caquexia e magreza, tais como anorexia, acompanhada de desnutrição e lesão renal com perda de proteínas na urina (SARIDOMICHELASKIS *et al.*, 1999, KOUTINAS & KOUTINAS, 2014). De fato, no presente estudo os cães com infecção no pâncreas tinham maior frequência de sinais clínicos, entre eles alterações dermatológicas, linfadenomegalia e alterações oftálmicas, embora esses resultados não tenham sido significativos estatisticamente, o que pode ser justificado pela baixa positividade de *Leishmania* spp. em pâncreas.

9 CONCLUSÕES

- A infecção do pâncreas está relacionada a ocorrência desse parasito em órgãos do sistema fagocítico mononuclear e a uma maior frequência de sinais clínicos, sugerindo um estágio avançado da doença.
- Os cães soropositivos para anticorpos *anti-L. infantum* apresentaram alta taxa de pancreatite, que ocorreu mesmo na ausência de sinais clínicos de insuficiência pancreática exócrina e de formas amastigotas de *L. Infantum* no pâncreas.
- O protozoário *Leishmania infantum* é um dos agentes etiológicos da pancreatite crônica em cães, estando associado a um infiltrado inflamatório predominantemente granulomatoso, de leve a moderado e presente em uma baixa carga parasitária.
- A caquexia/magreza estiveram associadas a uma maior ocorrência do parasito no pâncreas, entretanto, não foram associadas a pancreatite, possivelmente pelo não comprometimento de porção significativa do órgão relacionado ao tempo de infecção.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F, M.; *et al.* Canine *Leishmaniasis*: pathological and ecological factors influencing transmission of infection, **Journal of Parasitology**, [S.l.], v. 77, n. 4, p. 557-561, 1991.

AMÓRA, S.S.A.; SANTOS, M.J.P.; ALVES, N.D.; *et al.* Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p. 1854-1859, 2006.

ARMSTRONG, J. P; Canine Pancreatitis: Diagnosis and Management. **Western Veterinary Conference**, [S.l.], p. 1-5, 2011.

ARMSTRONG, J.P.; WILLIAMS, D.A. Pancreatitis in cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, [S.l.], v. 27, n. 3, p. 140-147, 2012.

BASSANI, C.A.; SANGIONI, L.A.; SAUT, J.P.E.; *et al.* Euritrematose bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 299-316, 2007.

BAZELLE, J.; WATSON, PENNY, W.; Pancreatitis in cats: Is it acute, is it chronic, is it significant? **SAGE journals**, [DOI: 10.1177/1098612x14523186]

BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, A.A.V.; MADEIRA, M.F.; FERREIRA, L.C.; FIGUEIREDO, F.B.; *et al.* Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v. 115, p. 2371–2379, 2016.

BOSTROM, B.M.; XENOULIS, P. G.; NEWMAN, S.J.; *et al.* Chronic pancreatitis in dogs: A retrospective study of clinical clinicopathological, and histopathological findings in 61 cases, **The Veterinary Journal**, v. 195, p. 73-79, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília, Ed.2, p.120, 2006.

BRENNER, K.; *et al.* Juvenile Pancreatic Atrophy in Greyhounds: 12 Cases (1995 – 2000). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Ohio, v. 23, n. 1, p. 67-71, 2009.

BUNCH, S. E.; O pâncreas exócrino, In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G.; **Medicina interna de pequenos animais**, 3.ed. São Paulo: Mosby, p. 533-546, 2006.

BURNA, A.N.; ALVAREZ, J.D.; SÁNCHEZ NEGRETTE, M.; MAIDANA, H.R.; Confirmación histopatológica de leishmaniosis visceral em un canino de Corrientes, Argentina. **Rev.vet.**, Argentina, 21: 2. 148-150, 2010.

CABRAL, M.; GRADY, J.E.O.; GOMES, S. *et al.* The immunology of canine *Leishmaniasis*: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 76, p.173-180, 1998.

CAMPOS-PONCE, M.; PONCE, C.; PONCE, E.; *et al.* *Leishmania chagasi/infantum*: futher investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral *Leishmaniasis* foci in Central America. **Experimental Parasitology**, [S.I.], v.109, n.4, p. 209-219, 2005.

CAPEN, C.C.; Endocrine system, In: CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. **Thomson's special veterinary pathology**, 3ed. Saint Louis: Mosby, p. 279-325,2001.

CARRASCO, L.; CHACÓN, F.M.L.; MARTIN, E.; HERVÁS, J.; MOLLEDA, J.M.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; LÓPEZ, R.; Acute haemorrhagic pancreatitis associated with canine visceral leishmiasis. **Veterinary Record**, [S.I.], v. 141, p. 519-521; 1997.

CARSON, F.L.; HLADICK, C.; Histotechnology: a self instructional text, **3 rd ed. ASCP Press Chicago.**, IL. 2009.

CHARLES, J.; Pancreas. In **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals.**, 5 ed. Edinburgh: Saunders Elsevier. p. 389-423, 2007.

CHEHTER, E.Z.; LONGO, M.A.; LAUDANNA, A.A.; DUARTE, M.I.S.; Pancreatic involvement in co-infection visceral *Leishmaniasis* and HIV: Histological and ultrastructural aspects. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n.2, p. 75-78, 2001.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M.; Canine *Leishmaniasis*: **Therapeutic aspects. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, [S.I.], v. 25, p. 370-375, 2003.

CORNELL, K.; FISCHER, J. Surgery of the exocrine pâncreas. In: SLATTER, D.; **Textbook of animal surgery**, 3ed. Philadelphia: Saunders, v.1, p. 752-762, 2003.

COSTARDI, M.L. Imunohistoquímica em diferentes tecidos de cães com Leishmaniose Visceral. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

CULLEN, J.M.; MACACLACHLAN, N.J.; Liver, biliary system, and exocrine pancreas. In: CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. **Thomson's special veterinary pathology**. 3ed. Saint Louis: Mosby, p. 81-124, 2001.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, [S.l.], 50: 296-31, 1994.

DANTAS-TORRES, F.; *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 117-118, 2006. [DOI:10.1590/S0074-02762006000100024].

DYCE, K.M. **As glândulas endócrinas**. In: DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. Tratado de anatomia veterinária. 4. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier., p. 140, 2010.

FERNANDES, C.C.E.; Pancreatite em animais de companhia. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade de Évora, 2015.

FIGUEIREDO, F.B.; LIMA JÚNIOR, F.E.F.; TOMIO, J.E.; INDÁ, F.M.C.; CORRÊA, G.L.B.; MADEIRA, M..F.; Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta. Sci. Vet.**, v. 40, n. 1, p. 1026, 2012.

FISCHER, R.L.; Clinical Trials for the Treatment of Secondary Wasting and Cachexia. **American Society for Nutritional Sciences. J. Nutr.**, [S.I.], 129: 252S – 255S. 1999.

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA DA, R. T.; SIQUEIRA, A.M.; *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil, **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 111, p. 161-173, 2003.

FRANCO, P. A; GUIMARÃES, E.P; ZORZATTO, J.R.; Immunohistochemical diagnosis of visceral *Leishmaniasis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **34º CBA**. 2003

GÁSCON, M.; ACEÑA, M.C. Pancreatitis canina, **Clinica Veterinaria Pequeños Animais**, [S.I.], v. 21, n. 4, p. 293-299, 2001.

GERMAN, A. J.; Exocrine Pancreatic Insufficiency in the Dog: Breed Associations, Nutritional Considerations, and Long-term Outcome. **Topics in Companion Med.**, [S.I.], v. 27, p. 104-108, 2012.

GONTIJO, C. M.; MELO, M. N.; Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas, **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.I.], v. 7, n. 3, p. 1-12, 2004.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; The current status of zoonotic Leishmaniosis and approaches to disease control, **Journal Parasitol**, [S.I.], v. 35, p. 1169-1180, 2005.

GRECO, D.S.; STABENFELDT, G. H. **Glândulas endócrinas e suas funções**. In: CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. J. (Eds). Tratado de fisiologia veterinária. 4. Ed. São Paulo: Elsevier., p. 374-406, 2015.

GUERRA, J.M.; FERNANDES, N.C.C.A.; KIMURA, L.M.; *et al.* Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, [S.l.], v. 75, n. 1686, 2016.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

HAWORTH, M. D.; *et al.* Diagnostic accuracy of the SNAP and Spec canine pancreatic lipase tests for pancreatitis in dogs presenting with clinical signs of acute abdominal disease, **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, San Antônio, Texas, v. 24, n. 2, p. 135-143, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.**, 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 271-271, p. 349-351, 1995.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; *et al.* Visceral *Leishmaniasis* in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary. Pathology**, [S.l.], 21: 74–9, 1984.

KLIMSTRA, D.S.; Nonductal neoplasms of the pâncreas. **Modern Pathology**, [S.l.], v.20, p. 94-112, 2007.

KÖNIG, H.E.; SAUTET, J.; LIEBICH, H.G.; Digestive system. In: König HE, Liebich HG (eds): **veterinary anatomy of domestical animals**, Shattaver GmbH Stuttgart, p. 311-315, 2004:

KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K.; Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, [S.I.], v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

LYRA, M.R.; *et al.* Pancreatic toxicity as an adverse effect induced by meglumine antimoniate therapy in a clinical trial for cutaneous *Leishmaniasis*. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, p. 68, 2016.

MADEIRA, M.F. *et al.* Parasitological diagnosis of canine visceral *Leishmaniasis*: is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**, [S.I.], v. 87, p. 260-262, 2009.

MANSFIELD, C. Acute Pancreatitis in Dogs: Advances in Understanding, Diagnostics, and Treatment. **Topics in Companion Med**, [S.I.], . 27, p.123-132, 2012.

MANSFIELD, C. S. *et al.* Assessing the severity of canine pancreatitis. **Research in Veterinary Science**, [S.I.], v. 74, n. 2, p. 137-144,2003.

MANSFIELD, C. S.; WATSON, P. D.; JONES, B. R. Specificity and sensitivity of serum canine pancreatic elastase-1 concentration in the diagnosis of pancreatitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [S.I.], v. 23, p. 691-697, 2011.

MARQUES, B.L. Pancreatite Canina: Estudo retrospectivo de 17 casos clínicos 2009-2013. **Universidade de Lisboa.**, 2015.

MATTOS JR, D.G.; PINHEIRO, J.M.; MENEZES, R.C.; COSTA, D.A.; Aspectos clínicos e laboratoriais de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v.56, n.1, p. 119-122, 2004.

McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária.** 4 ed. São Paulo: Elsevier, p. 1496, 2009.

MELLO, C.X.; FIGUEIREDO, F.B.; MENDES JÚNIOR, A.A.V.; FURTADO, M.C.; MIRANDA, L.F.C.; MADEIRA, M^a.F. Outbreak of canine visceral *Leishmaniasis* in Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, 47 (6):788-790, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Nota técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SOA/GM/MAPA Processo nº 21000.042544/2016-94. Brasília, 2016.

MIX, K.; JONES, C.; Diagnosing Acute Pancreatitis in Dogs. **Compendium Vet**, [S.l.], p. 226-234, 2006.

MÖHR, A.J.; LOBETTI, R.G.; VAN DER LUGT, J. J. Acute pancreatitis: a newly recognized potential complication of canine babesiosis, **Journal of the South African Veterinary Association**, [S.l.], v. 71, n. 4, p. 232-239, 2000.

MONTALVO, A.M.; FRAGAM J.; MONZOTE, L.; *et al.* Diagnóstico de La *Leishmaniasis*: de La observación microscópica Del parasito a La detección Del ADN. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Cuba, v. 64, n. 2, p. 108-131, 2012.

MOREIRA, M.A.; LUVIZOTTO, M.C.; GARCIA, J.F.; *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of *Leishmaniasis* in dogs with different clinical signs, **Veterinary Parasitology**, [S.l.], v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007. [DOI: 10.1016/J.VETPAR.2006.12.012].

OLIVEIRA, V. C.; BOECHAT, V. C.; MENDES, A.A.V.; *et al.* Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **PLoS ONE**, [S.l.], v.12, n. 4, p. 1-15, 2017.

PIMENTEL, M^a.I.F. *et al.* High visceral *Leishmaniasis* mortality rate in Barra Mansa, a new area of visceral *Leishmaniasis* transmission in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 47 (4):521-523, 2014.

PLUNKETT, S. J. **Procedimentos de emergência em pequenos animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, p. 521, 2006.

QUEVEDO, P.S.; MENDES, M.; PAPPEN, F.G.; *et al.* Pancreatite intersticial crônica em bovino causada por *Eurytrema coelomaticum*. **Ciência Rural, Santa Maria.**, v.43, n. 8, p. 1449-1452, 2013.

RACHID, M.A.; AQUINO NETO, H.M.; FACURY-FILHO, E.J.; CARVALHO, A.U.; VALLE, G.R.; VASCONCELOS, A.C.; Chronic interstitial pancreatitis and chronic

wasting disease caused by *Eurytrema coelomaticum* in Nelore Cow. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v.63, n.3, p. 741- 743, 2011.

RASTOGI, S.C. Foodstuffs. **In Essentials of animal physiology.**, (4^a ed.) New Age International, New Delhi, 2007.

RUAUX, C.G. Diagnostic Approaches To Acute Pancreatitis, **Clinical Techniques in small Animal Practice**. [S.l.], v. 18, p. 245-249, 2003.

SANTOS, J.M.L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M.R.F.; *et al.* Prevalência de anticorpos *anti-Leishmania* spp. em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 41-45, 2010.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. The Author. Journal compilation. ESVD and ACVD, **Veterinary Dermatology**, [S.l.], v. 20, p. 471- 489, 1999.

SERAKIDES, R. Sistema urinário. **In: Santos R.L. & Alessi A.C.** ed. Patologia Veterinária. Roca, São Paulo. p.291-336, 2010.

SHEN, J.; *et al.* Hemodynamic effects and the effective treatment of naloxone on experimental acute pancreatitis in dogs. **Chinese medical Journal**, Inglaterra, v.105, n. 11, p. 957-963, 1999.

SHERDING, R.G; BIRCHARD, S.J JOHNSON, S. E. Doenças e cirurgia do pâncreas exócrino. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual saunders clínica de pequenos animais**, 3 ed. São Paulo: Roca. p. 965-974, 2003.

SILVA DA, MADEIRA. M^a.F.; FIGUEIREDO, F.B. Geographical expansion of canine visceral *Leishmaniasis* in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 57 (5):435-438. 2015.

SILVA, S.M.; RIBEIRO, V.M; RIBEIRO, R.R; *et al.* First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil, **Veterinary Parasitology**, [S.l.], v. 166, p. 159-162.

SLAPPENDEL, R.J. Canine *Leishmaniasis*. A review based on 95 cases in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, [S.l.], v. 10, p. 1–16, 1988.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; *et al.* Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, [S.l.], n. 130, p. 7-12, 2004.

STEINER, J. M. Diagnosis of pancreatitis. **Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, [S.l.], v. 33, n.5, p. 1181-1195, 2003.

STEINER, J.M.; **Exocrine pâncreas**. In: Steiner J. M. Small Animal Gastroenterology. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH, p. 283-306, 2008.

THOMPSON, L.J.; SESHADRI, R.; RAFFE, M.R. Characteristics and outcomes in surgical management of severe acute pancreatitis: 37 dogs (2001-2007). **Journal of veterinary Emergency and Critical Care**, San Antonio, n. 19, n. 2, p. 165-173, 2009.

TILLEY, L.P.; SMITH, F.W.K. Insuficiência **Pancreática Exócrina**, In: TILLEY, L.P.; SMITH, F.W.K. (Eds). Consulta Veterinária em 5 minutos. 2. Ed. São Paulo: Manole, p. 682-683, 2003.

TONINI, M.A.; LEMOS, E.M.; REIS, A.B.; *et al.* First description of autochthonous canine visceral *Leishmaniasis* in the metropolitan region of Vitória, State of Espírito Santo, Brazil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 754-756, 2012.

UEDA, M. Y.; *et al.* **Alterações ultrassonográficas do pâncreas em cães com suspeita de pancreatite**. In: Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de pequenos animais, São Paulo, Anclivepa. 11, 2011

VÉLEZ, I.; LÓPEZ, L.; SÁNCHEZ, X.; *et al.* Efficacy of Miltefosine for the Treatment of American Cutaneous *Leishmaniasis*, **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, [S.l.], v. 83, n. 2, p. 351-356, 2010.

WATSON, P. J.; *et al.* Prevalence and breed distribution of chronic pancreatitis at post-mortem examination in first-opinion dogs. **Journal of Small Animal Practice**, [S.l.], v. 44, n. 7, p. 306-312, 2003.

WATSON, P. Pancreatitis in dogs and cats: definitions and pathophysiology, **Journal of Small Animal Practice**, [S.l.], v. 56, p. 3-12, 2015.

WESTERMARCK, E.; WIBERG, M. Exocrine pancreatic insufficiency in dogs. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, Finland, v. 33, n. 5, p. 1165-1179, 2003.

WHO.; Control of the *Leishmaniasis*: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of *Leishmaniases*. Geneva, **In WHO Technical Report Series.**, p. 1-186, 2010.

WHO.; ***Leishmaniasis: A Global Brief on Vector Borne Diseases.***, p. 1-56, 2014.

WILLIAMS, D. A.; Diseases of the exocrine pancreas. In: HALL, E.J.; SIMPSON, J. W.; WILLIAMS, D. A. **Manual of canine and feline gastroenterology.** 2ed. Gloucester: BSAVA, p. 222-239, 2005.

WILLIAMS, D. A.; **Doença Pancreática Exócrina.** In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara; p. 1418-1439, 2004.

XENOULIS, P. G.; STEINER, J. M. Necrosis and Inflammation: Canine. In M. J. Washabau, **Canine and Feline Gastroenterology.**, Missouri: Elsevier Saunders. 2013

XENOULIS, P.G. Diagnosis of pancreatitis in dogs and cats, **Journal of Small Animal Practice.** v. 56, n.1, p. 13-26, 2015.

XENOULIS, P.G.; STEINER, J. M.; Canine and feline pancreatic lipase immunoreactivity, **Veterinary Clinical Pathology**, [S.l.], v. 41, p. 312-324, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Fiocruz)



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" Construção de um painel de soros caninos para o Ministério de Saúde utilizar na validação de kits diagnósticos para LV. "

número P-454/08, proposto por Fabiano Borges Figueiredo, foi licenciado pelo N° L-038/08.

Sua licença de N° L-038/08 autoriza o uso anual de :

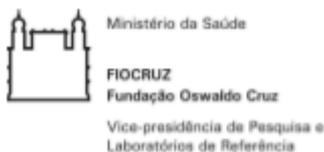
- 1400 Canis familiaris

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 21 de maio de 2012.

Rio de Janeiro, 24/09/2008


Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ

ANEXO B – Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Fiocruz)



LICENÇA

LW-54/13

Certificamos que o protocolo (P-40/13-2), intitulado "HIBRIDIZAÇÃO IN SITU NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* EM CÃES DOMÉSTICOS", sob a responsabilidade de FABIANO BORGES FIGUEIREDO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 02/12/2017 e inclui o uso total de :

Canis familiaris
- 75 Machos.
- 75 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 2 de dezembro de 2013

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA