

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**Análise dos indicadores de lesão miocárdica em cães com
leishmaniose visceral**

Kelly Cristina da Silva Godoy

CAMPO GRANDE, MS

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**ANÁLISE DOS INDICADORES DE LESÃO MIOCÁRDICA EM
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

**Analysis of indicators of myocardial injury in dogs with visceral
leishmaniasis**

Kelly Cristina Da Silva Godoy

Orientador: Prof^a. Dr^a. Alda Izabel de Souza

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE, MS

2015

Certificado de aprovação

KELLY CRISTINA DA SILVA GODOY

Análise dos indicadores de lesão miocárdica em cães com leishmaniose visceral.

Analysis of myocardial injury indicators in dogs with visceral leishmaniasis.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado(a) em: 26/02/2015

BANCA EXAMINADORA:



Dra. Alda Izabel de Souza
(UFMS) – (Orientadora)



Dr. Danilo Carloto Gomes
UFMS



Dra. Mariana da Silva Poci Palumbo
UFMS

À minha mãe, minha estrela guia,
fonte de inspiração, seus conselhos me iluminaram neste caminho, seus cuidados e apoio
jamais serão esquecidos. Mãe, a vida segue, e você segue junto com ela em meu
coração, meu eterno amor obrigada!!!

Com amor dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar em todos os momentos, por me dar força para superar as dificuldades e mostrar os melhores caminhos.

Ao Márcio, meu amor, que demonstrou apoio incondicional e respeito as nossas escolhas. Obrigada por me encorajar e jamais me deixar desistir.

Maria, meu anjinho, minha luz, que tantas vezes dividiu a tela do computador com a mamãe para que pudéssemos ficarmos juntas, obrigada minha princesinha, meu amor por você é maior que “a luz do Sol”.

Ao meu pai Pedro Antônio obrigada por me ouvir e acreditar que era possível, por mostrar com simplicidade que todos somos importantes e que ninguém é melhor ou pior que eu, amo você meu velho pai.

À minha mãe, que a sabedoria e a força dos seus ensinamentos me guiam por todos os caminhos, sei que a invisibilidade não significa ausência, eu amo você mãe, saudades eternas.

Ao meu irmão Wellington, que aguardou ansiosamente este momento junto comigo e com minha cunhada Roberta, minha irmã pelo destino. Agradeço a vocês por me ajudarem a superar a dor da ausência da nossa mãe e compartilharem comigo a alegria deste momento.

A minha sogra Marta e sogro Rafael, que, no momento em que mais precisei, tiveram a coragem e a sensibilidade de mudar suas vidas para que eu pudesse concluir este ciclo, obrigada pelo apoio, incentivo e cuidados, aprendi com a nossa convivência a admirá-los ainda mais.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Alda Izabel de Souza, pela oportunidade, pela paciência, pelo apoio, e por respeitar cada momento de uma vida além do mestrado, pela dedicação, pelas incansáveis correções deste trabalho e por compartilhar seu conhecimento com tanta generosidade.

Franciela Pezarico, quanta coisa vivemos ao longo destes dois anos, sentimentos de alegrias e tristezas compartilhados com respeito e carinho.

Sandro, agradeço-lhe por todos os exames processados e por todos os dias de convivência com alguém de tamanha simplicidade e paciência.

Bruna Brito, que, com seu “humor “, se tornou parte desta história, minha parceira do café, quantas histórias contadas enquanto almoçávamos. Muito obrigada por estes momentos.

Paulo Henrique Braz, que me incentivou e me acompanhou em cada momento, agradeço pela companhia diária inclusive domingos e feriados de pesquisa que renderam horas de histórias.

Renata Valençoela, quantos almoços ao “pé da árvore”, obrigada pela ajuda, conselhos e incentivos no decorrer deste ciclo.

Simone Sorgatto, obrigada pelo companheirismo, por tentar me acalmar me incentivando nas apresentações durante este período de convivência.

Tamires Ramborger, quantas horas ouvindo, gravando, corrigindo e me auxiliando nas apresentações muito obrigada.

Gustavo, obrigada, pela imensa ajuda no decorrer deste projeto.

Obrigada a equipe do laboratório de Patologia Clínica Veterinária pela ajuda na execução das análises desta pesquisa, pelo apoio e incentivos dedicados a mim. Levarei no meu coração as marcas deste tempo em que pude conviver com pessoas tão especiais afinal este ciclo se encerra mas o ciclo da vida é infundável e ela segue diferentes caminhos para todos nós mas as lembranças permanecem em nossos corações.

Ao professor Dr. Danilo Carloto pelo auxílio nas leituras das lâminas histológicas.

Ao professor Dr. Carlos Eurico pela disposição e ajuda nas análises estatísticas desta pesquisa.

Ao Ricardo e a Camila, secretários da pós graduação que procuraram sempre, com atenção, esclarecer com informações pertinentes e precisas todas as dúvidas.

A equipe do Centro de Controle de Zoonose (CCZ) pela disposição em ajudar, fornecendo os dados necessários para realização desta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho, muito obrigada, este foi um caminho impossível de ser percorrido sozinho, o apoio e o incentivo de cada um me fizeram andar, obrigada por fazerem parte desta história!

“Não importa o que fizeram com você. O que importa é o que você faz com aquilo /
fizeram com você.”

Jean Paul Sartre

RESUMO

GODOY, K. C. S. Análise dos indicadores de lesão miocárdica em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

A leishmaniose visceral é uma importante protozoonose de transmissão vetorial causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e pode acometer diversas espécies, inclusive o homem. O envolvimento sistêmico e a evolução da leishmaniose visceral apresentam similaridades entre as espécies canina e humana. O cão é o principal reservatório e importante modelo experimental da parasitose. A doença promove manifestações clínicas inespecíficas e variáveis, dependendo do órgão envolvido e da resposta imunológica individual. Os órgãos do sistema fagocítico mononuclear e o tecido renal são os mais acometidos, com raros relatos, até o momento, do envolvimento miocárdico. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar os indicadores laboratoriais, eletrocardiográficos e histológicos de lesão cardíaca em diferentes grupos clínicos de cães com leishmaniose visceral. Foram analisados marcadores séricos, traçado eletrocardiográfico e fragmentos de tecido cardíaco de 41 cães naturalmente infectados, distribuídos em três grupos: assintomático, oligossintomático e sintomático. Todos os animais apresentaram aumento na atividade sérica da enzima creatina quinase fração MB. No traçado eletrocardiográfico, o complexo de baixa voltagem foi o distúrbio de condução mais frequente (8/12). Na análise histológica, 75,6% dos cães apresentaram reação inflamatória com predomínio de infiltrados linfohistiocítico (13/31) de intensidade discreta à moderada e distribuição multifocal. As alterações microscópicas identificadas no miocárdio foram independentes dos achados laboratoriais, eletrocardiográficos e quadro clínico apresentado pelos animais estudados. A ausência de associação entre alterações histopatológicas e os parâmetros investigados, alertam para a dificuldade de identificação de cardiopatia em cães com leishmaniose visceral e ressalta a importância de incluir a leishmaniose visceral no diagnóstico de patologias cardíacas, principalmente em regiões endêmicas para o agente.

Palavras-chave: Cardiomiopatia. Enzimas. Leishmania. Marcadores bioquímicos. Miocardite.

ABSTRACT

GODOY, K.C.S. Analysis of myocardial injury indicators in dogs naturally infected with visceral leishmaniasis.2015.34 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

Visceral leishmaniasis is an important protozoonosis of vector transmission caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* and can affect several species, including man. The systemic involvement and the evolution of visceral leishmaniasis show similarities between canine and human species. The dog is the main reservoir and important experimental model of parasitosis. The disease causes nonspecific clinical manifestations and variable depending on the involved organ and individual immune response. The organs of the mononuclear phagocyte system and the renal tissue are the most affected, with rare reports so far, myocardial involvement. The objective of this study was to evaluate the laboratory indicators, electrocardiographic and cardiac histological lesions in different clinical groups of dogs with visceral leishmaniasis. Serum markers analyzed were in conjunction of the electrocardiographic tracing and heart tissue fragments of 41 naturally infected dogs were divided into three groups: asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic. All animals showed increased activity in serum creatine kinase MB fraction. In the electrocardiographic tracing, low voltage complex was the most frequent conduction disorder (8/12). In the histological analysis, 75.6% of the dogs showed inflammatory reaction with predominance of linfohistiocítico infiltrates (13/31) of mild intensity to moderate and multifocal distribution. Microscopic changes identified in the myocardium were independent laboratory findings, electrocardiographic and clinical picture presented by the studied animals. The lack of association between histopathological changes and the parameters investigated, indicate the disease identification difficulty in dogs with visceral leishmaniasis and highlights the importance of including visceral leishmaniasis in the diagnosis of heart disease especially in endemic regions to the agent.

Palavras-chave: Cardiomiopatia. Enzimas. *Leishmania*. Marcadores bioquímicos. Miocardite.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral	12
2.2 Leishmaniose visceral em cães	13
2.2.1 Envolvimento do miocárdio na leishmaniose visceral	14
2.3 Indicadores de lesão cardíaca na leishmaniose visceral	14
2.3.1 Biomarcadores séricos de lesão miocárdica	15
2.3.2 Eletrocardiograma na leishmaniose visceral.....	16
2.3.3 Histopatologia do miocárdio na leishmaniose visceral.....	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 METODOLOGIA.....	19
4.1 Animais utilizados	19
4.2 Critérios de inclusão e exclusão	19
4.3 Confirmação diagnóstica da Leishmaniose visceral canina	19
4.4 Formação dos grupos clínicos	19
4.5 Exames laboratoriais	20
4.6 Eletrocardiograma.....	21
4.7 Eutanásia dos animais.....	21
4.8 Avaliação histopatológica	22
4.9 Análises estatísticas	22
4.10 Aspectos éticos.....	22
REFERÊNCIAS	24
5 Artigo gerado pela pesquisa.....	30

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade zoonótica, endêmica, com ampla distribuição mundial e transmitida, principalmente, pela forma vetorial a partir da picada do inseto vetor, especialmente, *Lutzomyia longipalpis*. Nas Américas, a enfermidade possui como agente causador o protozoário *Leishmania (L.) infantum chagasi*, de ciclo digenético (CHAGAS et al., 1938; OMS, 2014). Os caninos domésticos são considerados os principais reservatórios urbanos da enfermidade, uma vez que estão em contato direto com os seres humanos, apresentam intenso parasitismo na pele e alta susceptibilidade à doença (ASHFORD, 1996; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

A Leishmaniose visceral canina (LVC) é uma enfermidade com característica multissistêmica, manifestações clínicas inespecíficas, variáveis e de difícil diagnóstico (MANCIANTI et al., 1988). Acomete diversos órgãos, especialmente os do sistema monocítico fagocitário (SILVA et al., 2013) e renal (BENDERITTER et al., 1988; RIGO et al., 2013), com poucos relatos de implicação cardíaca (TORRENT et al., 2005; LOPES-PEÑA et al., 2009; MENDES et al., 2014).

A despeito de alguns autores terem identificado miocardite na LV, após necropsia, a caracterização clínico-laboratorial *ante-mortem* de cardiopatia em animais infectados não foi estabelecida (LÓPEZ-PEÑA et al., 2009; SILVA et al., 2009). Relatos descrevem a presença de distúrbios de impulso elétrico no traçado eletrocardiográfico e elevação nos biomarcadores séricos de lesão miocárdica em animais infectados (TORRENT et al., 2005; LOPEZ-PEÑA et al., 2009; SILVESTRINI et al., 2012; SOUSA et al., 2013; MENDES et al., 2014), no entanto nenhum dos autores comparou essas alterações com aspectos clínicos da leishmaniose visceral.

A similaridade entre o envolvimento sistêmico e a evolução da LV faz dos caninos um bom modelo experimental para a doença em seres humanos (HOMMEL et al., 1995; ALVES et al., 2010). Com isso, o conhecimento do comportamento de parâmetros laboratoriais e eletrocardiográficos em associação aos aspectos clínicos e alterações histológicas no miocárdio, nessa espécie, pode colaborar com informações relacionadas aos efeitos cardíacos da parasitose. Por isso o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos laboratoriais e eletrocardiográficos da injúria cardíaca em cães com leishmaniose visceral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral

As leishmanioses abrangem um grupo de doenças parasitárias, causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ALVAR et al., 2004). Estima-se a existência de 20 espécies causadoras da doença em seres humanos (OMS, 2014) e destas, 13 apresentam características zoonóticas (GRAMICIA; GRADONI, 2005). A transmissão vetorial ao hospedeiro vertebrado ocorre durante repasto sanguíneo da fêmea infectada de insetos da ordem Diptera, família Psychodidae e gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (KILLICK- KENDRICK, 1990; LAISON; RANGEL, 2005).

A doença é considerada uma das principais enfermidades negligenciadas de maior importância para a saúde pública e endêmica nos cinco continentes. Três formas clínicas são reconhecidas: a cutânea, a mucocutânea e a visceral, esta considerada a forma mais grave da protozoonose com letalidade em torno de 10% quando não tratada de forma adequada (GRAMICIA; GRADONI, 2005; OMS, 2014).

A leishmaniose visceral pode acometer diversas espécies, com destaque para os caninos e os seres humanos. O primeiro relato no homem ocorreu em 1900, quando o médico inglês William Leishman encontrou formas amastigotas do parasito no baço de um paciente. Em 1903, Ronald Ross reconheceu a existência do gênero *Leishmania* como agente das leishmanioses (ALTAMIRANO- ENCISO et al., 2003).

No Brasil, em 1934, foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* sp. em cortes histológicos de fígado de pacientes que morreram com suspeita de febre amarela. Estudos extensos sobre a leishmaniose foram realizados e o pesquisador Evandro Chagas, em 1937, estabeleceu o agente causador da doença como sendo o protozoário *Leishmania chagasi* e o possível vetor, *Lutzomyia longipalpis*. Em 1956, o cão e a raposa foram considerados reservatórios do parasito (CHAGAS et al., 1938; LAISON; RANGEL, 2005).

A leishmaniose foi descrita, no Brasil, inicialmente, como enfermidade de áreas rurais. O desequilíbrio ambiental, provocado pela urbanização das populações, o aumento dos desmatamentos, as condições precárias de saneamento, além da adaptação do vetor ao novo ambiente e as dificuldades no controle da doença em grandes centros são

fatores que contribuíram para a disseminação do agente e caracterização da doença como grave problema de saúde pública (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2014).

2.2 Leishmaniose visceral em cães

O aumento da incidência de LV humana em áreas com alta prevalência de leishmaniose visceral canina e alta densidade de *Lutzomyia longipalpis*, tornaram os cães um dos mais importantes elos na transmissão da *Leishmania* aos seres humanos (ASHFORD, 1996; CAMARGO-NEVES et al. 2001; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

A evolução clínica, o agente infectante, o vetor e a resposta imunológica semelhante entre as espécies humana e canina faz com que o cão seja reconhecido como bom modelo experimental para o conhecimento das alterações causadas pelo agente nos diversos órgãos, inclusive o coração (HOMMEL et al., 1995; ALVES et al., 2010).

Os animais infectados podem apresentar diferentes manifestações clínicas em consequência da resposta imunológica e da interação do parasito com o hospedeiro, interferindo direta ou indiretamente nos sinais clínicos. A presença do agente causa lesão tecidual por ativação da resposta inflamatória e a resposta imunológica indireta promove deposição de imunocomplexos na membrana tecidual dos órgãos envolvidos (MENDES et al., 2014; ROSA et al., 2014).

Os sinais clínicos aparecem, em média, após 3-7 meses da inoculação do agente, entretanto o desenvolvimento de sintomas poderá ocorrer após anos de inoculação (BRASIL, 2014). Durante esse período o microorganismo se dissemina, por meio do sistema vascular e linfático, para diversos órgãos com predileção pelo sistema fagocítico mononuclear. Contudo, o envolvimento de órgãos não linfóides tem sido descrito de forma crescente (PEÑA; ROURA; DAVIDSON, 2000; ALVES et al., 2010; RIGO et al., 2013; ROSA et al., 2014).

Os cães com leishmaniose visceral podem ser classificados de acordo com os sinais clínicos em assintomáticos: na ausência de manifestações clínicas sugestivas da infecção por *Leishmania*; oligossintomáticos: quando apresentar adenopatia linfóide, discreta perda de peso e pelo opaco e sintomáticos: na presença de todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, úlceras,

hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores (BRASIL, 2014).

Estima-se que, no Brasil, entre 40-60% dos cães soropositivos sejam assintomáticos, portanto não identificados, dificultando o controle dessa zoonose (MANCIANTI et al., 1988; XAVIER et al., 2006; BRASIL, 2014). Cães assintomáticos são tão competentes quanto os sintomáticos na infecção de flebotomíneos e podem transmitir a *Leishmania* a outros caninos e humanos (PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001; LAURENTI et al., 2013). Em animais oligossintomáticos, a despeito da presença dos anticorpos, são identificados poucos e inespecíficos sinais clínicos que, muitas vezes, dificulta a suspeita clínica (LAURENTI et al., 2013). Na forma sintomática observa-se com frequência linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, febre, emagrecimento progressivo, caquexia, onicogribose, lesões cutâneas e renais (MANCIANTI et al., 1988; LIMA et al., 2004; RALLIS et al., 2005; RIGO et al., 2013; BRASIL, 2014). A lesão cardíaca em portadores de leishmaniose visceral também tem sido descrita independente de sintomatologia clínica de cardiopatia, entretanto estudos envolvendo maiores números de indivíduos são escassos (MORAIS et al., 1988; DIAMANTINO, 2010; ROSA et al., 2014) e não definem a etiopatogenia da injúria miocárdica.

2.2.1 Envolvimento do miocárdio na leishmaniose visceral

A caracterização clínica de cardiopatias em pacientes com LV tem sido apresentada em relatos isolados (TORRENT et al., 2005; LOPES-PEÑA et al., 2009; DIAMANTINO, 2010; MENDES et al., 2014) no entanto, estudos *post-mortem* têm identificado alta frequência de envolvimento miocárdico em diferentes espécies (MORAIS et al., 1988; OLIVEIRA, 2009; ROSA et al., 2014). Em cães, pode acometer até 100% dos animais com achados frequentes de infiltrado inflamatório mononuclear, necrose focal e presença de vasculite (LOPES-PEÑA et al., 2009; ROSA et al., 2014).

A etiopatogenia do envolvimento muscular cardíaco é controversa. Ainda não há um consenso se os achados são devidos à resposta reacional à ação dos anticorpos circulantes e deposição de imunocomplexos no miocárdio ou em consequência da ação direta do parasito ao órgão (MENDES et al. 2014; ROSA et al., 2014). Em estudos recentes utilizando a técnica de imuno-histoquímica, na tentativa de esclarecer a etiopatogenia da lesão miocárdica, avaliou-se a ocorrência de alterações cardíacas em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* provenientes de área endêmica para LV, os

autores observaram a ocorrência de infiltrado linfohistioplasmocitário com carga parasitária baixa no miocárdio e correlacionaram o parasitismo com a maior severidade do processo inflamatório (ROSA et al., 2014; SOARES et al., 2014).

2.3 Indicadores de lesão cardíaca na leishmaniose visceral

2.3.1 Biomarcadores séricos de lesão miocárdica

Marcadores bioquímicos séricos são substâncias liberadas para circulação a partir de lesão celular. A aspartato-transaminase (AST), a creatina quinase (CK), associada à dosagem da creatina quinase fração MB (CK-MB) (MELO et al., 2008) e a Troponina I Cardíaca (cTnl) são os principais biomarcadores validados para estudos de lesão em cardiomiócitos e apresentam alterações nos valores séricos em cardiopatias (WU et al., 1996; DINIZ et al., 2007; SILVESTRINI et al., 2012; MENDES et al., 2014).

A AST foi o primeiro biomarcador sérico de lesão cardíaca utilizado, contudo, em humanos, mostrou-se de baixa especificidade e vem sendo substituído. Na medicina veterinária, a despeito do desconhecimento da eficiência da enzima para a marcação de lesão em cardiomiócitos, ainda tem sido adotada em associação com outros analitos (SOUZA et al., 2008; CARRETÓN et al., 2013; MENDES et al., 2014)

A CK é reconhecida como indicador de lesão em tecido muscular esquelético, entretanto está presente também nas células do músculo cardíaco (MELO et al., 2008; FERREIRA et al., 2010). O aumento nos níveis séricos de CK acontece poucas horas após a injúria miocárdica e atinge valores máximos em 12 horas. O retorno ao nível normal ocorre 24 a 48 horas após o término da alteração de permeabilidade das fibras musculares e valores persistentemente altos indicam a continuidade da lesão (FERREIRA et al., 2010).

Quando ocorre necrose do miocárdio, há liberação da isoenzima CK-MB para o meio extracelular, e a determinação de sua atividade sérica é considerada um recurso importante para a detecção de lesão cardíaca, especialmente em humanos (DINIZ et al., 2007). Em animais a CK-MB é julgada menos específica, ainda assim, é usada para acompanhamento de cardiopatias (FREDERICKS et al., 2001; SCHOBBER; KIRBACH; OECHTERING, 2005). Estudos experimentais com indução de infarto do miocárdio em cães detectaram aumento significativo desse biomarcador e conseguiram prever o tamanho e a área acometida (SHELL et al., 1973; SHARKEY et al., 1991). Igualmente,

variação na atividade da CK e CK-MB foram identificadas na cardiopatia chagásica canina (SOUZA et al., 2008) e no relato de miocardite em um cão com leishmaniose visceral (MENDES et al., 2014).

Considerando que essa variação também pode ocorrer devido a lesões em músculo esquelético, para aumentar a especificidade da CK-MB é utilizado o índice CK (MELO et al., 2008). Índices CK superiores a 20% sugerem a presença de macroCK, observada em doenças autoimunes, e podem elevar a atividade do biomarcador, mesmo na ausência de lesão miocárdica. A CK-MB pode se ligar a imunoglobulinas e se elevar falsamente, indicando assim a presença de macroCK e impedindo a confirmação de lesão cardíaca em doenças com hipergamaglobulinemia (STEIN et al., 1981; LEE et al., 1994; MELO et al., 2008; HOFFMANN et al., 2013).

A troponina cardíaca (cTnI) é uma proteína que inibe a interação entre a actina e a miosina, até a entrada do cálcio no interior das células miocárdicas normais. É considerada um marcador de injúria miocárdica de alta sensibilidade e especificidade quando aumentada no soro sanguíneo, uma vez que lesão sarcomérica dos cardiomiócitos provocam sua liberação para a circulação (SMITH et al., 1997; DINIZ et al., 2007). A efetividade desse biomarcador já foi estabelecida em diversas espécies, entre elas, humanos e cães portadores de diferentes enfermidades (WU et al., 1996; OYAMA; SISSON, 2004; SCHOBER; KIRBACH; OECHTERING, 2005). Segundo Silvestrini et al. (2012), a concentração sérica elevada de cTnI na LVC indicou injúria miocárdica, contudo, os autores sugeriram novas investigações já que não avaliaram o tecido cardíaco.

2.3.2 Eletrocardiograma na leishmaniose visceral

O eletrocardiograma (ECG) é um método não invasivo, eficiente e de fácil utilização para investigação de alterações na atividade elétrica do coração. Além disso, pode sugerir aumento e espessamento das câmaras cardíacas, alterações eletrolíticas e presença de efusão pericárdica (FERREIRA; SOUZA; CAMACHO, 1998; TILLEY; BURTINICK, 2004;). Quando usado, de modo sistemático, fornece informações a respeito de frequência, ritmo, eixo elétrico, distúrbios de condução do sistema mioelétrico cardíaco e permite assim obter dados importantes sobre o estado clínico do miocárdio (WOLF; CAMACHO; SOUZA, 2000; TILLEY; BURTINICK, 2004).

Em cães, o ECG é utilizado com frequência em estudos envolvendo patógenos, reconhecidamente, promotores de distúrbios cardiovasculares (DVIR et al. 2004;

CHAMPION et al., 2013). Relatos de casos de LVC, descrevem a presença de bloqueio atrioventricular de primeiro grau, com infra-desnivelamento de ST (TORRENT et al., 2005), baixa voltagem do complexo QRS (LOPEZ-PEÑA et al., 2009) e batimentos ectópicos ventriculares (MENDES et al., 2014). A investigação em 105 cães infectados identificou alterações distintas, com predomínio de parada sinusal, bloqueio de ramo direito, complexo atrial prematuro e aumento na duração da onda P e complexo QRS (SOUSA et al. 2013). Desta forma, até o momento, não é possível estabelecer o perfil eletrocardiográfico na leishmaniose visceral canina.

2.3.3 Histopatologia do miocárdio na leishmaniose visceral

A identificação macroscópica de injúrias no miocárdio nem sempre é evidente, sendo necessária a análise microscópica por meio de técnicas histológicas para confirmação de lesões (VLEET; FERRANS, 2009). Achados histopatológicos de dano miocárdico na LVC, embora escassos, revelam semelhança com alterações teciduais em fragmentos de miocárdio de seres humanos infectados com a parasitose (MORAIS et al., 1988; ROSA et al., 2014; SOARES et al., 2014), o que torna os cães bons modelos experimentais para pesquisa.

A análise histológica do miocárdio de cães com LV identificou infiltrado inflamatório em 100% das amostras além de outras alterações como: necrose de coagulação, aumento de colágeno, vasculite, degeneração de fibras miocárdicas e fibrose (ROSA et al., 2014; SOARES et al., 2014).

Não há um consenso sobre a patofisiologia do comprometimento miocárdico até o momento. Estudos utilizando a técnica de imunohistoquímica, para a quantificação do parasitismo miocárdico, divergem sobre o efeito da presença do parasito e de mecanismos imunomediados sobre os cardiomiócitos (MORAIS et al. 1988; ALVES et al.; 2010; ROSA et al., 2014; SOARES et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os indicadores laboratoriais, eletrocardiográficos e histológicos de lesão cardíaca em diferentes grupos clínicos de cães com leishmaniose visceral.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar os valores das enzimas creatina quinase (CK), creatina quinase fração MB (CK-MB), aspartato transaminase (AST) e do biomarcador troponina I cardíaca (cTnI), em cães com leishmaniose visceral.
- ✓ Caracterizar os distúrbios eletrocardiográficos em cães com leishmaniose visceral.
- ✓ Identificar as alterações morfológicas e a presença de infiltrado inflamatório em miocárdio de cães com leishmaniose visceral.
- ✓ Associar os valores das enzimas creatina quinase (CK), creatina quinase fração MB (CK-MB) e aspartato transaminase (AST) com os aspectos clínicos externos de cães com leishmaniose visceral.
- ✓ Associar os valores das enzimas creatina quinase (CK), creatina quinase fração MB (CK-MB) e aspartato transaminase (AST) com as alterações morfológicas e presença de infiltrado inflamatório em miocárdio de cães com leishmaniose visceral.
- ✓ Comparar os parâmetros eletrocardiográficos com aspectos clínicos dos cães com leishmaniose visceral.
- ✓ Associar os parâmetros eletrocardiográficos com as alterações morfológicas e presença de infiltrado inflamatório em miocárdio de cães com leishmaniose visceral.
- ✓ Descrever a frequência das alterações histopatológicas de acordo com os aspectos clínicos dos cães com leishmaniose visceral.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais utilizados

Foram estudados 41 cães com leishmaniose visceral, recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, do município de Campo Grande, MS.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Como critérios de inclusão foram selecionados cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral, com idade, declarada pelo proprietário, entre um e cinco anos e peso corporal de até 10 quilos, sem restrição de sexo e raça.

Animais com presença de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, verificados por meio de teste imunocromatográfico¹, foram excluídos do estudo. Os cães foram considerados negativos para a infecção por *Trypanosoma cruzi* e *Dirofilaria immitis* visto que Campo Grande é área não endêmica para estes agentes.

4.3 Confirmação diagnóstica da leishmaniose visceral canina

A avaliação sorológica foi realizada pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), do município de Campo Grande, conforme protocolo de diagnóstico para leishmaniose visceral estabelecido pelo Ministério da Saúde (Nota Técnica Conjunta 01/2011) que utiliza o teste rápido imunocromatográfico (DPP®) como teste de triagem e o ensaio imunoenzimático (ELISA) como confirmatório (BRASIL, 2011).

O exame parasitológico por punção aspirativa por agulha fina dos linfonodos ou baço, foi realizado com o intuito de confirmar a infecção através da observação de formas amastigotas. As lâminas foram fixadas em metanol, coradas pela técnica de Panótico rápido e analisadas em toda sua extensão em microscopia óptica com objetiva de 100X.

4.4 Formação dos grupos clínicos

Os animais foram agrupados de acordo com os sinais clínicos externos em: assintomáticos - ausência de sinais clínicos sugestivos da enfermidade;

¹ Senspert®, Vencofarma, Londrina, Paraná, Brasil

oligossintomáticos - presença de até três sinais clínicos, entre eles: adenopatia linfóide, perda de peso e pelo opaco; sintomáticos - presença de mais de 3 sinais clínicos principalmente, alterações cutâneas (alopecia, descamação, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento e ceratoconjuntivite. A classificação clínica foi realizada pelo Centro de Controle de Zoonoses e baseou-se no manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

4.5 Exames laboratoriais

Para realização dos exames laboratoriais foram colhidos, aproximadamente, 10 mL de sangue por punção da veia cefálica ou jugular e acondicionado em frasco estéril sem anticoagulante. Após a coagulação do sangue, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos, para obtenção do soro e estocadas em tubos plásticos a - 80° até a realização dos exames.

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em analisador bioquímico semi-automático² e seguiram a instrução e metodologia do fabricante dos *kits* reagentes. Os resultados foram comparados aos valores de normalidade utilizados como referência para as enzimas estabelecidos por Kaneko; Harvey; Bruss (2008).

- a) Creatina quinase (CK)³: determinada por método cinético-UV. O método baseia-se na ação catalítica da CK sobre creatinina fosfato e adenosina difosfato (ADP) formando creatinina e adenosina trifosfato (ATP). A glicose é fosforilada pelo ATP, formando glicose 6-fosfogluconato na presença do NADP+. A atividade enzimática da CK é calculada pelo aumento na absorvância de 340nm quando o NADP+ é reduzido a NADPH.
- b) Creatina quinase MB (CK-MB)³: determinada por método cinético-UV. As subunidade M são inibidas por anticorpo específico que não afeta as subunidades B. O método baseia-se na reação catalítica da enzima nas reações acopladas de hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase. A atividade enzimática da CK é calculada pelo aumento na absorvância de 340nm quando o NADP+ é reduzido a NADPH, proporcional a atividade da CK-MB.

² Thermoplate – analisador bioquímico

³ Bioclin®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

- c) Aspartato transaminase (AST)³: determinada por método cinético-UV. A AST catalisa a transferência do grupamento amina do aspartato para o cetoglutarato, formando glutamato e oxalacetato, que é reduzido a malato pela ação da enzima malato desidrogenase enquanto a NADH é oxidada a NAD⁺. A atividade enzimática de AST é calculada pela redução da absorbância em 340nm, após conversão de NADH em NAD⁺.

O índice CK-MB, utilizado para aumentar a especificidade da enzima CK-MB, foi obtido a partir da razão CK-MB/CK. Índices menores que 6%, entre 6-20% e superiores a 20% foram considerados como lesão muscular, injúria cardíaca e presença de macroenzimas CK (macroCK), respectivamente. Para exclusão de macroenzimas, nova dosagem da CK-MB foi realizada após aquecimento do soro a 45° C por 20 minutos, de acordo com o protocolo do fabricante do *kit* diagnóstico ².

Para a mensuração da troponina cardíaca (cTnI)⁴ foi utilizado o ensaio imunocromatográfico Troponina I cardíaca³, o método utiliza anticorpos monoclonais de camundongo anti-cTnI, que reagem com a troponina presente no soro. A amostra se move por capilaridade através de uma membrana cromatográfica e quando positiva forma uma linha de cor vermelha

4.6 Eletrocardiograma

Para avaliação da atividade elétrica cardíaca utilizou-se eletrocardiógrafo computadorizado⁵, na velocidade de 50 mm/seg registradas nas derivações I, II, III, aVR, aVL e aVF. Os traçados eletrocardiográficos foram empregados para avaliar alterações de ritmo e condução elétrica no tecido cardíaco, a partir das medidas da duração de onda P (Pms), amplitude de onda P (PmV), duração do intervalo PR, intervalo QT, duração e amplitude do complexo QRS. O resultado das mensurações foi considerado como a média de cinco ciclos cardíacos e os valores encontrados foram comparados com os intervalos de referência estabelecidos por Wolf; Camacho; Souza (2000).

4.7 Eutanásia dos animais

Os cães identificados como positivos, após os procedimentos ambulatoriais foram submetidos à eutanásia pela equipe técnica do Centro de Controle de Zoonoses, do

⁴ Troponina K-085®, Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

⁶ ECGPCVET ® Tecnologia Eletrônica Brasileira (TEB)

município de Campo Grande, de acordo com a política sanitária adotada pelo Ministério da Saúde, conforme Portaria Interministerial 1.426 de 11 de Julho de 2008 (BRASIL, 2008), que proíbe o tratamento dessa enfermidade em cães no país.

4.8 Avaliação Histopatológica

Durante necropsia fragmentos de 1cm³ do miocárdio foram retirados transversalmente da região septo-ventricular, fixados em formol a 10% e submetidos ao processador automático de tecidos. Após inclusão em parafina o material foi seccionado a 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina.

As lâminas foram analisadas em toda a extensão em microscopia óptica com objetivas de 4x, 10x e 40X, observando-se alterações morfológicas e presença de infiltrado inflamatório. Os infiltrados inflamatórios foram classificados em focal e multifocal, a intensidade graduada de forma semi-quantitativa em escores de 0 a 2 (0 - ausência; 1 - discreta à moderada: na presença de pequenas ou médias lesões inflamatórias nas áreas estudadas; 2- moderada a intensa: quando observada a presença de focos maiores ou extensos de processo inflamatório). Considerou-se ainda o predomínio celular presente para a classificação do tipo de infiltrado inflamatório.

4.9 Análises Estatísticas

A atividade sérica das enzimas, assim como os resultados dos parâmetros eletrocardiográficos foram comparados entre os grupos clínicos por meio do teste Kruskal-Wallis. Quando apontadas diferenças entre as médias o teste de Dunn foi aplicado. O teste qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para verificar a associação de alterações histológicas, com os diferentes grupos clínicos e o traçado eletrocardiográfico. Para verificar a correlação entre dados histológicos e o nível da atividade sérica enzimática foi realizado o teste de Correlação de Spearman. As análises foram realizadas utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism 5.0 e os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.10 Aspectos éticos

O presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética para Uso de Animais da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS) e aprovado sob protocolo número 499/2013.

REFERÊNCIAS

ALTAMIRANO- ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História da Ciências e saúde**, v.10, n.3, p. 853-882, 2003.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO J.; NIETO J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**. v. 57, n.1, p.88, 2004.

ALVES, G. B. B.; PINHO, F. A.; SILVA, S. M. M. S.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, F. A. L. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania Leishmania chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 43(3): 310-315. 2010.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n.5, p.523-532, Sep. 1996.

BENDERITTER, T.; CASANOVA, P.; NASHKIDACHVILI, L.; QUILICI, M. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.82, n. 4, p.335-41, Aug.1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral**, 1.ed., Brasília: Ministério da Saúde. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria Interministerial nº 1.426**, de 11 de julho de 2008. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html. Acesso em 18 de janeiro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica n. 01/2011**- CGDT/CGLA/ DEVIT/ SVS/MS. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em:http://crmvms.org.br/files/materiais/nota-tecnica-no-1-2011_cglab_cgdt1_lvc_98999048.pdf. Acesso em 18 de janeiro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, 1.ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; KATZ, G. RODAS, L. A. C.; POLETTO, D. W.; LAGES, L. C.; SPINOLA, R. M. F.; CRUZ O G. Use of spacial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998 – 1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, n.5, p.1263-126, 2001.

CARRETÓN, E.; MORCHÓN, R.; GONZÁLEZ-MIGUEL, J.; JUSTE, M.C; SIMÓN, F.; MONTOYA-ALONSO, J.A. Utility of cardiac biomarkers during adulticide treatment of

heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.18, n. 97, p. 244-50, Oct. 2013.

CHAGAS, E; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F. N.; VON PAUMGARTTEN, M. J.; SÁ, B.; Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do estudo da Leishmaniose visceral americana, em 1937. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, n. 1, p. 89-229, Jun. 1938.

CHAMPION, T.; FRANCOY, C.; NETO, G. B. P.; CAMACHO, A. A. Electrocardiographic evaluation and serum cardiac troponin I levels in anemic dogs with blood parasitosis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n.6, p. 2915-2924, 2013.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p.151-156, Jun. 2006.

DIAMANTINO, T. C. C. Leishmaniose visceral: avaliação das repercussões cardiovasculares secundárias à doença e ao tratamento em crianças e adolescentes tratadas com três esquemas terapêuticos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 221p, 2010.

DINIZ, P. P. V. P.; DE MORAIS, H. A. S.; BREITSCHWERDT, E. B.; SCHWARTZ, D. S. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.22, p.1136–1143, 2007.

DVIR, E.; LOBETTI R. G.; JACOBSON L. S.; PEARSON J.; BECKER, P. J. Electrocardiographic changes and cardiac pathology in canine babesiosis. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.6, n. 1, May. 2004.

FERREIRA, W. L.; SOUZA, R. C. A. D. E.; CAMACHO, A. A. A. Eletrocardiograma na medicina veterinária. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. fascículo I, v. I, p. 54 - 57, 1998.

FERREIRA, F.S.; SILVEIRA, L.L.; COSTA, A.C.; ALBERNAZ, A.P.; CARVALHO, C.B.; OLIVEIRA, A.L.A. Estudo do comportamento da creatino quinase (CK) e creatino quinase-mb (CK-MB) sérica de cães submetidos à oxigenação por membrana extracorpórea durante um período de três horas. **Ciência Animal Brasileira**, 11(3):705-712.2010.

FREDERICKS, S.; MERTON, G. K.; LERENA, M. J.; HEINING, P.; CARTER, N. D.; HOLT, D. W. Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. **Clinical Chimica Acta**, v. 304, n. 1-2, p. 65–74, Feb. 2001.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRAMICIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Veterinary Parasitology**, v.35, n.11-12, p.1169-1180, 2005.

HOFFMANN, K. M.; GRILLITSCH, M.; DEUTSCHMANN, A.; HÖGENAUER, C.; STOJAKOVIC, T.; HAUER, A. C. Serum macromolecular creatine kinase type 1 as a

diagnostic clue in inflammatory bowel disease?. **European Journal Pediatrics**. v.172, n. 5, p.699-701. May.2013.

HOMMEL, M.; JAFFE, C. L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 89 (supplement. 1), p. 55-73, Dec.1995.

KANEKO J. J., HARVEY J. W., BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6 ed. San Diego California: Academic Press. 916p. 2008.

KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v.4, n.1, p. 1-24 1990.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 811-827 2005.

LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; MATTA, V.L.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.; SECUNDINO, N.F.; PIMENTA, P.F.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v.23, n.196, p.296-300, Sep. 2013.

LEE, K. N. C.; SAKO, G.; BERNHARDT, P.; ELIN, R.J. Relevance of macro creatine kinase type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data. **Clinical Chemistry**, v.40, p.1278-83. Jul. 1994.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; DE MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v.92, n.1, p. 43-53. Sep. 2004.

LOPEZ-PEÑA, M.; ALEMAN, N.; MUNOZ, F.; FONDEVILA, D.; SUÁREZ M. L.; GOICOA, A.; NIETO J. M. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. **Acta Veterinária Scandinavica**, v.51, p. 20. 2009.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, n.4, p. 566-7.1988.

MELO, M. M.; VERÇOSA JUNIOR, D.; PINTO, M. C. L.; SILVEIRA, J. B.; FERRAZ, V.; ECCO, R.; PAES, P. R. O. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (*Malpighiaceae*) em camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.631-640, 2008.

MENDES, R. S.; GURJÃO, T. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTANA, V. L.; TAFURI, W. L.; SANTOS, J. R. S.; DANTAS, A. F. M.; SOUZA, A. P. 2014. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi: aspectos clínicos e patológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 6, n.1, p. 79-84. 2014.

MORAIS, C. F.; DUARTE, M. I. S.; CORBETT, A. E. P.; REIS, M. M. Alterações morfológicas cardíacas no curso da leishmaniose visceral humana. Estudo baseado em 16 casos de necropsia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.51, p. 441-445, 1988.

OLIVEIRA, E. Parasitismo e alterações histológicas em hamsters infectados com tecido medular de pacientes portadores de leishmaniose visceral. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. 57p. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Leishmaniasis. **Fact sheet N°375** Atualizado em janeiro de 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em 11/10/2014.

OYAMA, M. A.; SISSON, D. D. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.18, p.831-839, 2004.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American journal of Tropical and Hygiene**, v.65, n.5, p.510-517, Nov. 2001.

PEÑA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993–1998). **Veterinary Ophthalmology**, v.3, n.1, p.35–41, 2000.

RALLIS, T.; DAY, M. J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; PAPAZOGLU, L.; FYTIANOU, A.; KOUTINAS, A. F. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **Journal of Comparative Pathology**, v.132, n. 2-3, p. 145-52, Apr.2005.

RIGO, R. S.; CARVALHO, C. M. E.; HONER, M. R.; ANDRADE, G. B.; SILVA, I. S.; RIGO, L.; FIGUEIREDO, H. R.; BARRETO, W. T. G. Achados histopatológicos renais em cães com leishmaniose visceral. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.55, n.2, p.113-116, 2013.

ROSA, F. A.; LEITE, J. H.; BRAGA, E. T.; MOREIRA, P. R.; BALTAZAR, F. H.; BIONDO, A. W.; PADUA, P. P.; VASCONCELOS, R. O.; CAMACHO A. A.; FERREIRA W. L.; MACHADO G. F.; MARCONDES, M. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum* chagasi. **Veterinary Pathology**, v.51, n. 3, p. 603-606, 2014.

SCHOBBER, K. E.; KIRBACH, B.; OECHTERING, G. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. **Journal Veterinary of Cardiology**, v.1, p.17-25, Dec. 2005.

SHARKEY, S. W.; MURAKAMI, M. M.; SMITH, S. A.; APPLE, F. S. Canine myocardial creatine kinase isoenzymes after chronic coronary artery occlusion. **Circulation**, v. 84, n. 5, p. 2211, Nov. 1991.

SHELL, W. E.; LAVELLE, J. F.; COVELL, J. W.; SOBEL, B. E. Early Estimation of Myocardial Damage in Conscious Dogs and Patients with Evolving Acute Myocardial Infarction. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 52, p. 2579-2590, Oct. 1973.

SILVA, B. C.; RACHID, M. A.; VIEIRA, F. G.; FIGUEIREDO, M. M.; VALLE, G. R.; TAFURI, W. L.; TOLEDO JÚNIOR, J. C.; RIBEIRO, V.M. Chronic pericarditis in a naturally *Leishmania (Leishmania) chagasi* infected dog. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**.v.2, p.107-109, 2009.

SILVA, L. C.; CASTRO, R. S.; FIGUEIREDO, M. M.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **Journal of Experimental Pathology**, v.94, n. 2, p. 133- 1433, 2013.

SILVESTRINI, P.; PIVIANI, M.; ALBEROLA, J.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; PLANELLAS, M.; ROURA, X.; O'BRIEN, P. J.; PASTOR, J. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 41, n. 4, p. 568-574. 2012.

SMITH, S. C.; LADENSON J. H.; MASON, J. W.; JAFFE, A. S. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis: experimental and clinical correlates. **Circulation**, v.95, n.1, p.163-168, Jan.1997.

SOARES, N. P.; MEDEIROS, A. A.; CASTRO, I. P.; WILSON, T. M.; GUIMARÃES, E. C.; MOREIRA, T. A. Imunohistoquímica em miocárdio de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42 p. 1248, Dec. 2014.

SOUSA, M. G.; CARARETO R.; SILVA, J. G.; OLIVEIRA, J. Assessment of the electrocardiogram in dogs with visceral leishmaniasis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n. 5, p. 643-647, 2013.

SOUZA, A. I.; PAULINO-JUNIOR, D.; SOUSA, M. G.; CAMACHO, A. A. Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, v.38, n.5, 1351-1356, 2008.

STEIN, W.; BOHNER, J.; KRAIS, J.; MÜLLER, M.; STEINHART, R.; EGGSTEIN, M. Macro creatine kinase BB: evidence for specific binding between creatine kinase BB and immunoglobulin G. **Journal Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.19, n. 9, p.925-30, Sep.1981.

TILLEY, L. P; BURTINICK, N.L. **ECG- eletrocardiografia para clínico de pequenos animais**. Roca, São Paulo, p.99, 2004.

TORRENT, E.; LEIVA, M.; SEGALÉS J.; FRANCH J.; PEÑA T.; CABRERA B.; PASTOR, J. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n.11, p. 549-52, 2005.

VLEET, J.F.V.; FERRANS, V.J. Sistema cardiovascular. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap.10, p.559-612.

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

WOLF, R.; CAMACHO, A. A.; SOUZA, R. C. A. Eletrocardiografia computadorizada em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.6, p. 616-620, 2000.

WU, A. H.; FENG, Y. J.; CONTOIS, J. H.; PERVAIZ, S. Comparison of myoglobin, creatine kinase-MB, and cardiac troponin I for diagnosis of acute myocardial infarction. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 26, n. 4, p. 291-300, Jul-Aug, 1996.

5 ARTIGO GERADO PELA PESQUISA

Avaliação dos indicadores de lesão miocárdica em cães com leishmaniose visceral¹

Kelly C. S. Godoy^{2*}, Paulo H. Braz², Andréia R. Assis², Tamires R. Antunes, Danilos C. Gomes, Alda I. Souza²

ABSTRACT.- Godoy K.C.S. & Souza A.I. 2014. [**Changes in myocardial injury indicators in naturally infected dogs with visceral leishmaniasis**] Avaliação dos indicadores de lesão miocárdica em cães com leishmaniose visceral. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Clínica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Filinto Müller 2443, Vila Ipiranga, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil. E-mail: k.c.s.godoy@gmail.com.

The objective of this study was to evaluate the laboratory indicators, electrocardiographic and cardiac histological lesions in different clinical groups of dogs with visceral leishmaniasis. Serum markers were analyzed in conjunction of the electrocardiographic tracing and heart tissue fragments of 41 naturally infected dogs were divided into three groups: asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic. All animals showed increased activity in serum creatine kinase MB fraction. In the electrocardiographic tracing, low voltage complex was the most frequent conduction disorder (8/12). In the histological analysis, 75.6% of the dogs showed inflammatory reaction with predominance of linfohistiocítico infiltrates (13/31) of mild intensity to moderate and multifocal distribution. Microscopic changes identified in the myocardium were independent laboratory findings, electrocardiographic and clinical picture presented by the studied animals. The lack of association between histopathological changes and the parameters investigated, indicate the disease identification difficulty in dogs with visceral leishmaniasis and highlights the importance of including visceral leishmaniasis in the diagnosis of heart disease especially in endemic regions to the agent.

INDEX TERMS: Biochemical markers, cardiomyopathy, enzymes, *Leishmania*, myocarditis

RESUMO.- O objetivo deste estudo foi avaliar os indicadores laboratoriais, eletrocardiográficos e histológicos de lesão cardíaca em diferentes grupos clínicos de cães com leishmaniose visceral. Foram analisados marcadores séricos, traçado eletrocardiográfico e fragmentos de tecido cardíaco de 41 cães naturalmente infectados, distribuídos em três grupos: assintomático, oligossintomático e sintomático. Todos os animais apresentaram aumento na atividade sérica da enzima creatina quinase fração MB. No traçado eletrocardiográfico, o complexo de baixa voltagem foi o distúrbio de condução mais frequente (8/10). Na análise histológica, 75,6% dos cães apresentaram reação inflamatória com predomínio de infiltrados linfohistiocítico (13/31) de intensidade discreta à moderada e distribuição multifocal. As alterações microscópicas identificadas no miocárdio foram independentes dos achados laboratoriais, eletrocardiográficos e quadro clínico apresentado pelos animais estudados. A ausência de associação entre alterações histopatológicas e os parâmetros investigados, alertam para a dificuldade de identificação de cardiopatia em cães com leishmaniose visceral e ressalta a importância de incluir a leishmaniose visceral no diagnóstico de patologias cardíacas principalmente em regiões endêmicas para o agente.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cardiomiopatia, enzimas, *Leishmania*, marcadores bioquímicos, miocardite

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose infecto-parasitária, com característica multissistêmica e desenvolvimento crônico. No Brasil é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, transmitida vetorialmente por fêmeas infectadas do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, durante o repasto sanguíneo (Laison & Rangel 2005, Shaw 2006). Os caninos domésticos são considerados os principais reservatórios urbanos da leishmaniose visceral, apresentam intenso parasitismo na pele e alta susceptibilidade a doença (Ashford 1996, Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006).

¹ Recebido em 00/00/00

Aceito para publicação em

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Filinto Müller 2443, Ipiranga, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil.

*Autor para correspondência: k.c.s.godoy@gmail.com

³ Laboratório de Patologia Clínica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Filinto Müller 2443, Ipiranga, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil. aldaizabel@ufms.br

A coincidência de agente infectante, vetor, evolução clínica e resposta imunológica entre as espécies humana e canina, faz do cão um bom modelo experimental para a investigação das alterações causadas pelo parasito nos diversos órgãos, inclusive o coração (Hommel et al. 1995, Alves et al. 2010).

A interação parasito-hospedeiro é responsável pelas diferentes manifestações clínicas, que podem variar de polissintomáticos a assintomáticos. Os órgãos afetados são, principalmente, os do sistema fagocítico e os tecidos cutâneo e renal (Silva et al. 2013). Observação de sinais clínicos e ou laboratoriais de comprometimento cardiovascular são raramente descritos e, na maioria das vezes, como casos isolados (Torrent et al. 2005, Lopes-Peña et al. 2009).

Apesar da pouca observação dos aspectos clínicos de cardiopatias, estudo anatomopatológico em cães que desenvolveram LV, após infecção natural, constatou a presença de infiltrados inflamatórios em 100% dos miocárdios analisados (Rosa et al. 2014). Biomarcadores séricos de lesão em cardiomiócitos e avaliação eletrocardiográfica também foram utilizados na leishmaniose visceral canina (LVC) e julgados bons indicadores do envolvimento miocárdico, contudo, novas investigações são sugeridas já que não foi realizada avaliação histopatológica do tecido cardíaco (Silvestrini et al. 2012).

O objetivo deste estudo foi analisar os indicadores laboratoriais, eletrocardiográficos e histológicos de lesão cardíaca em diferentes grupos clínicos de cães com leishmaniose visceral.

MATERIAL E MÉTODOS

Um estudo transversal foi realizado com 41 cães, sem restrição de sexo e raça, idade entre um e cinco anos, declarada pelo proprietário, peso corporal de até 10 quilos e sorologicamente reagentes para leishmaniose visceral canina, cedidos pelo Centro de Controle de Zoonose do município de Campo Grande, MS. A infecção foi confirmada, em todos os animais por meio da observação de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no exame parasitológico de linfonodo e/ ou do baço. Animais com presença de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, verificados por meio de teste imunocromatográfico (Senspert®, Vencofarma, Londrina, Paraná, Brasil), foram excluídos do estudo. Campo Grande está em uma área não endêmica para *Trypanosoma cruzi* e *Dirofilaria immitis*, portanto infecções para estes agentes não foram consideradas.

Os animais foram agrupados de acordo com os sinais clínicos externos em: assintomáticos- ausência de sinais clínicos sugestivos da enfermidade; oligossintomáticos- presença de até três sinais clínicos, entre eles: adenopatia linfóide, perda de peso e pelo opaco; sintomáticos- presença de mais de 3 sinais clínicos principalmente, alterações cutâneas (alopecia, descamação, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento e ceratoconjuntivite.

Para avaliação da bioquímica sérica os cães foram mantidos em jejum alimentar e hídrico por 12 e duas horas, respectivamente. As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia cefálica ou jugular e o soro obtido após centrifugação. Todas as amostras foram armazenadas a -80° C até realização dos ensaios.

A dosagem da atividade sérica das enzimas creatina quinase (CK), aspartato transaminase (AST) e creatina quinase fração MB (CK-MB) e o teste rápido imunocromatográfico Troponina I cardíaca (cTnI) (Troponina K-085®, Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) foram utilizados como marcadores de lesão cardíaca. Os valores de normalidade utilizados como referência para as enzimas foram estabelecidos por Kaneko, Harvey & Bruss (2008). Os ensaios bioquímicos, realizados por método enzimático, seguiram os protocolos disponibilizado nos kits comerciais (Bioclin®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), com leitura em analisador bioquímico semi-automático.

O índice CK-MB, obtido a partir da razão CK-MB/CK, foi utilizado para aumentar a especificidade da enzima CK-MB. Índices menores que 6%, entre 6-20% e superiores a 20% foram considerados como lesão muscular, injúria cardíaca e presença de macroenzimas CK (macroCK), respectivamente. Para exclusão de macroenzimas, nova dosagem da CK-MB foi realizada após aquecimento do soro a 45° C por 20 minutos, de acordo com o protocolo do fabricante do kit diagnóstico.

Para a avaliação eletrocardiográfica (ECG) foi utilizado equipamento computadorizado (ECGPCVET © Tecnologia Eletrônica Brasileira) na velocidade de 50 mm/seg registradas nas derivações I, II, III, aVR, aVL e aVF. Os traçados eletrocardiográficos foram empregados para avaliar alterações de ritmo e condução elétrica no tecido cardíaco, a partir das medidas da duração de onda P (Pms), amplitude de onda P (PmV),

duração do intervalo PR, intervalo QT, duração e amplitude do complexo QRS. Os valores encontrados foram comparados com os intervalos de referência estabelecidos por Wolf, Camacho & Souza (2000) e distribuídos entre os grupos clínicos.

Após eutanásia, os animais foram necropsiados e fragmentos de 1cm³ do tecido miocárdico foram retirados transversalmente da região septo-ventricular, fixados em formol a 10% e submetidos ao processador automático de tecidos. Após inclusão em parafina o material foi seccionado a 5 µm de espessura e corado com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em toda a extensão em microscopia óptica com objetivas de 4x, 10x e 40X, observando-se a presença de infiltrado inflamatório, necrose e fibrose. Os infiltrados inflamatórios foram classificados em focal e multifocal, a intensidade graduada de forma semi-quantitativa em escores de 0 a 2 (0- ausência; 1- discreta à moderada na presença de pequenas ou médias lesões focais nas áreas estudadas; 2- moderada a intensa quando observada a presença de focos maiores ou extensos de processo inflamatório), considerou-se ainda o predomínio celular para a classificação do tipo de infiltrado inflamatório presente. As alterações histológicas observadas foram distribuídas de acordo com os grupos clínicos.

A atividade sérica das enzimas, assim como os resultados dos parâmetros eletrocardiográficos foram comparados entre os grupos clínicos por meio do teste Kruskal-Wallis ou teste de Dunn. O teste qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para verificar a associação de alterações histológicas, com os diferentes grupos clínicos e o traçado eletrocardiográfico. A correlação entre dados histológicos e o nível da atividade sérica enzimática foi realizada pelo teste de Correlação de Spearman. As diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/ UFMS), sob protocolo de número 499/2013.

RESULTADOS

Diversas raças participaram do estudo, incluindo Poodle (12,2%), Pinscher (4,9%), York Shire (4,9%), Teckel (2,4%) e Pug (2,4%), porém a maioria dos cães eram animais sem raça definida (73,2%). Em relação ao sexo, 68,3% eram fêmeas e 31,7 % machos. Entre os sinais clínicos observados houve predomínio de dermatopatias, linfadenomegalia e caquexia. Após avaliação, 17,1% dos animais foram classificados como assintomáticos, 36,5% oligossintomáticos e 46,3% sintomáticos

Os valores referentes à atividade enzimática da CK e CK-MB foram superiores ao intervalo de normalidade para espécie. Inversão na proporcionalidade das enzimas CK e CK-MB foi evidenciada em 100% das amostras, com manutenção do índice CK acima de 20%, mesmo após desnaturação das proteínas a 45^o C. Valores das médias e desvio padrão da atividade sérica das enzimas e índice CK são apresentados no Quadro 1. Diferença estatística significativa foi observada entre os grupos assintomático e sintomático quando considerado os níveis séricos de atividade enzimática da CK-MB. A cTnl sérica reagiu positivamente em 4,9% (2/41) dos animais pesquisados.

Quadro 1. Valores médios e desvio padrão da atividade enzimática sérica: creatina quinase (CK), creatina quinase fração MB (CK-MB), aspartato transaminase (AST) e índice CK dos cães com leishmaniose visceral de acordo com os grupos clínicos

Grupos	CK (U/L)	CK-MB (U/L)	AST (U/L)	Índice CK (%)
referência	(20-220)	(11-38,8)*	(23-66)*	(6-20)**
Assintomático (n=7)	247,4 ± 174,8 ^a	263,0 ± 117,6 ^a	48,0 ± 16,1 ^a	124,2 ± 39,1 ^a
Oligossintomático (n=15)	349,2 ± 220,0 ^{ab}	488,4 ± 64,7 ^{ab}	56,6 ± 25,1 ^{ab}	154,1 ± 53,9 ^{ab}
Sintomático (n=19)	468,5 ± 298,6 ^{ab}	681,2 ± 358,1 ^{bb}	58,7 ± 22,0 ^{ab}	163,7 ± 61,1 ^{ab}
Total (n=41)	354,6 ± 222,2	521,6 ± 326,3	54,5 ± 21,9	158,2 ± 54,9

Médias seguidas por letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

*Valores de referência: Kaneko, Harvey & Bruss (2008)

**Fonte do intervalo de referência para o índice CK: Melo et al. (2008)

No ECG, 29,3 % (12/41) dos animais apresentaram distúrbio na condução elétrica, representada principalmente pelo complexo de baixa voltagem do QRS (8/12), bloqueio átrio ventricular de segundo grau Mobitz II (2/12), alternância elétrica (1/12) e parada sinusal (1/12) (Figura 1). A maior frequência destas alterações foi observada nos cães sintomáticos (36,8%) seguidos pelos oligossintomáticos (26,7%) e

assintomáticos (14,3%), no entanto, sem diferença significativa entre eles ($p>0,05$). Aumento na duração das ondas P (39%) e dos complexos QRS (41,5%) também foram evidenciados nos traçados eletrocardiográficos. Os valores das médias e desvio-padrão dos parâmetros numéricos do ECG dos cães estão discriminados no Quadro 2.

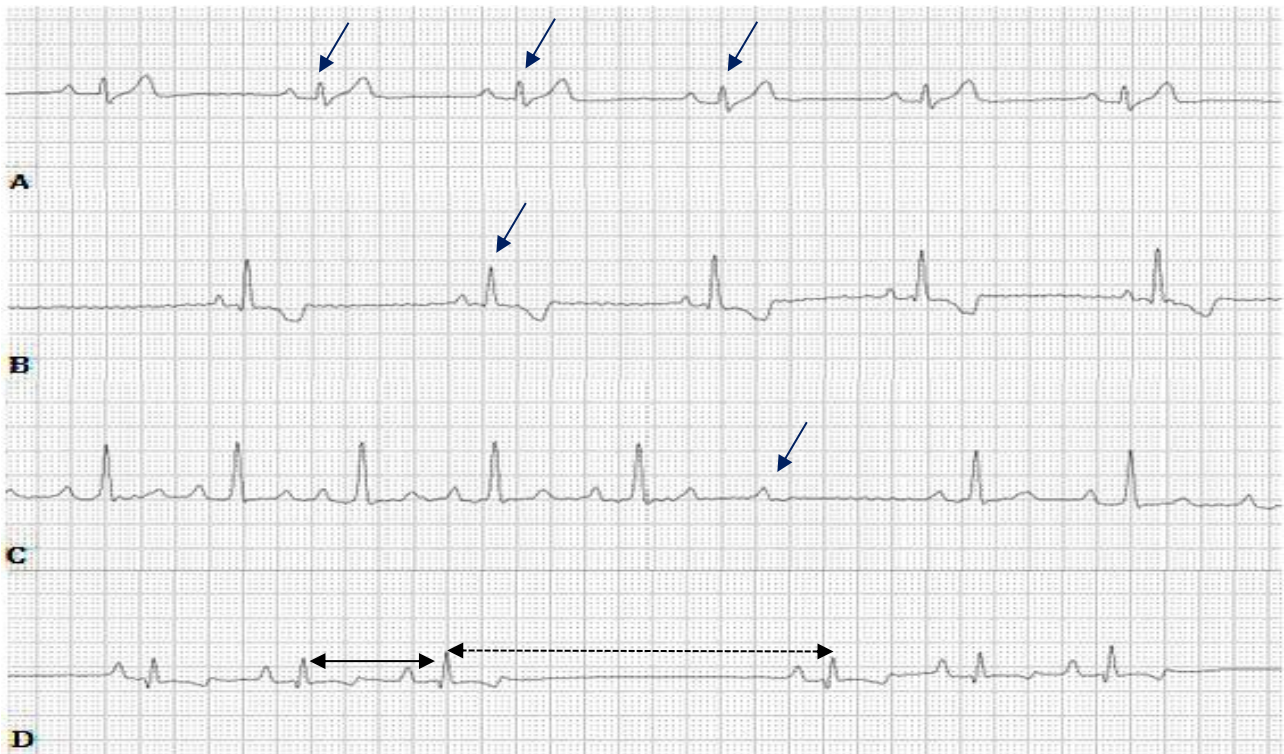


Fig.1. Representação das alterações eletrocardiográficas observadas nos cães com leishmaniose visceral. (A) Complexos QRS de baixa voltagem (setas). (B) Alternância elétrica: onda R de amplitude inferior as demais (seta). (C) Bloqueio átrio ventricular de segundo grau Mobitz II: na seta, a presença de uma onda P não seguida por um complexo QRS e precedida por intervalos PR uniformes. (D) Parada sinusal: intervalo RR (seta tracejada), maior que intervalo RR (seta contínua). Traçados mostrados na derivação DII, 50m/s, calibração padrão (1cm=1mV)

Quadro 2. Valores médios e desvio padrão de parâmetros numéricos do eletrocardiograma de cães com leishmaniose visceral distribuídos nos diferentes grupos clínicos.

Grupos clínicos	Parâmetros eletrocardiográficos					
	P(ms)	PR(ms)	QRS(ms)	QT(ms)	P(mV)	R(mV)
Assintomáticos (n=07)	42,2 ± 3,3 ^a	84,4 ± 15,4 ^a	55,2 ± 10,2 ^a	198,3 ± 19,3 ^a	0,21 ± 0,1 ^a	1,2±0,7 ^a
Oligossintomáticos (n=15)	42,8 ± 6,7 ^{ab}	79,8 ± 11,1 ^{ab}	52,2 ± 11,7 ^{ab}	198,6 ± 19,9 ^{ab}	0,17 ± 0,1 ^{ab}	0,8±0,3 ^{ab}
Sintomáticos (n=19)	42,4 ± 6,2 ^{ab}	88,4 ± 14,3 ^{ab}	55,5 ± 9,1 ^{ab}	189,5 ± 26,8 ^{ab}	0,16±0,1 ^{ab}	0,9±0,5 ^{ab}
**Referências	44,5 ± 1,0	91,3 ± 3,5	54,7 ± 1,6	202,4 ± 4,0	0,20 ± 0,01	1,21±0,06

P(ms): duração da onda P (ms); PR(ms) = duração do intervalo PR (ms); QRSms = duração do complexo QRS (ms); QTms= duração do intervalo QT; PmV = amplitude de onda P (mV); RmV = amplitude da onda R (mV).

Médias seguidas por letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($p<0,05$).

**Fonte: Wolf, Camacho & Souza (2000)

Na análise histológica, 75,6% (31/41) dos cães apresentaram reação inflamatória no fragmento miocárdico avaliado, com predomínio de infiltrados com intensidade discreta a moderada (61,3%) e distribuição multifocal (63,4%). Os infiltrados do tipo linfohistiocítico (42%) e linfohistioplasmocítico (35,5%) foram os mais frequentes. Vasculite (6,4%), necrose (16,2%), fibrose (12,9%) e infiltrado de adipócitos (6,4%) também foram observados. Formas amastigotas no tecido miocárdio não foram visualizadas. A classificação dos processos inflamatórios distribuídos de acordo com os grupos clínicos dos cães com LV são apresentados no Quadro 3. Nenhuma associação estatística significativa ($p > 0,05$) foi identificada entre estes parâmetros.

Quadro 3. Classificação dos processos inflamatórios do miocárdio de cães com leishmaniose visceral distribuídos de acordo com os grupos clínicos.

	PROCESSO INFLAMATÓRIO	GRUPOS CLÍNICOS		
		Classificação	Assintomáticos n =04 (%)	Oligossintomáticos n=11 (%)
Distribuição	Focal	01 (25,0)	03 (27,3)	01 (06,2)
	Multifocal	03 (75,0)	08 (72,7)	15 (93,8)
Intensidade	Leve à moderada	02 (50,0)	07 (63,6)	10 (62,5)
	Moderada à intensa	02 (50,0)	04 (36,4)	06 (37,5)
Tipo do infiltrado	Linfohistiocítico	03 (75,0)	02 (18,2)	08 (50,0)
	Linfohistioplasmocítico	01 (25,0)	05 (45,4)	05 (31,2)
	Linfoplasmocítico	00 (00,0)	03 (27,3)	03 (18,8)
	Plasmohistiocítico	00 (00,0)	01 (09,1)	00 (00,0)

*Não houve diferença significativa entre os grupos, considerando a frequência das características observadas entre eles, χ^2 ($p > 0,05$).

Correlação estatística não foi observada quando confrontada a intensidade do processo inflamatório e a atividade enzimática da CK ($p = 0,28$ $r = 0,17$) e CK-MB ($p = 0,25$ $r = 0,18$). Não foi identificada diferença estatística quando comparadas as alterações eletrocardiográficas com dados da análise histológica ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

No presente estudo 100% dos animais apresentaram elevação nos valores da atividade sérica do marcador CK-MB, utilizado na investigação de lesão em cardiomiócitos. Essa enzima está presente no citoplasma celular e aumenta, consideravelmente, sua atividade plasmática na presença de hipóxia ou necrose do miocárdio (Diniz et al. 2007).

Apesar da enzima CK-MB ser considerada específica para injúria cardíaca, recomenda-se a dosagem simultânea da atividade sérica da CK total. Em todas as amostras analisadas, o índice CK apontou a presença de CK atípicas, denominadas de MacroCK, mesmo após desnaturação das proteínas. Esses valores podem estar associados ao aumento sérico de imunoglobulinas que leva à formação dessas macroenzimas e eleva, falsamente, os valores da CK-MB, quando aplicado o método cinético (Sturk & Sanders 1990, Lee et al. 1994, Hoffman et al. 2013). Segundo Yuu et al. (1980), na presença de IgG as macroenzimas geradas não são inibidas pelos anticorpos anti-M, que são direcionados para a fração M da enzima, mesmo após aquecimento. Na LVC, quanto maior o número de sinais clínicos maior é a concentração da imunoglobulina (Pinelli et al. 1994, Alexandre-Pires et al. 2010) e podem justificar a associação estatística identificada entre os valores da CK-MB e o grupo dos cães classificados como sintomáticos.

A cTnI é uma proteína presente unicamente em músculo cardíaco e liberada para a circulação, de acordo com o grau de ruptura da membrana dos miócitos. Vários trabalhos têm destacado a utilidade deste biomarcador na identificação de miocardiopatias de etiologia infecciosa (Barr, Warner & Kornreic 2005, Diniz et al. 2007, Carretón, Grandi & Morchón 2011). A Investigação de lesão miocárdica em cães com LV, utilizando método quantitativo de análise, apontou número superior de animais com aumento sérico da cTnI (Silvestrini et al. 2012), quando comparado aos 4,9% identificados no presente estudo. Essa discrepância pode estar associada à diferença entre as metodologias de análise e sensibilidade dos testes. Testes qualitativos detectam cTnI a partir de 0,5 ng/mL enquanto testes quantitativos são capazes de identificar

nível sérico inferior a 0,06 ng/ mL. Outro fato a ser considerado é a variabilidade na liberação da cTnI. Maior quantidade da proteína é liberada em injúrias miocárdicas agudas (Smith et al. 1997) portanto o teste pode apresentar baixa sensibilidade para doenças crônicas como a LVC.

O registro gráfico da atividade elétrica do coração é também uma importante ferramenta na investigação de cardiopatias. O envolvimento miocárdico, após quadros infecciosos, inclusive a LV, resulta no desenvolvimento de transtornos elétricos (Souza et al. 2008, Diamantino 2010, Champion et al. 2013, Sousa et al. 2013). Durante a avaliação eletrocardiográfica 29,3% dos animais do estudo apresentaram distúrbios de condução, com maior frequência de complexos de baixa voltagem, relatados em processos inflamatórios do tecido cardíaco (Pinto et al. 2008). No entanto, esses achados diferem das alterações observadas em cães com LV e complementa a lista de desordens eletrocardiográficas inespecíficas que podem ser identificadas em enfermidades infecciosas com envolvimento miocárdico (Sousa et al. 2013). O aumento da duração da onda P e do complexo QRS, detectado nos cães estudados, podem indicar tanto o aumento de átrio esquerdo e dos ventrículos, quanto a presença de miocardiopatia, que provocam uma lentidão na condução elétrica (Souza et al. 2008).

Manifestações clínicas e patológicas da LVC variam de acordo com a região endêmica e depende de fatores intrínsecos relacionados ao vetor, ao ambiente e ao hospedeiro e podem levar a modificações nas características da doença (Alves et al. 2010). Em inoculação experimental de hamsters, com tecido medular de pacientes humanos com LV, foi observada a presença de infiltrado inflamatório no miocárdio de 28% dos animais (Oliveira 2009). Em humanos portadores da afecção, a avaliação microscópica identificou infiltrados inflamatórios com frequência aproximada às do presente estudo e por outros trabalhos que utilizaram a espécie canina como modelo (Morais et al. 1988, Alves et al. 2010, Rosa et al. 2014). Esses dados reforçam o uso do cão como excelente modelo experimental para estudo do envolvimento cardíaco provocado pela parasitose (Hommel et al. 1995, Alves et al. 2010).

A presença de infiltrados inflamatórios de intensidade discreta à moderada no tecido cardíaco dos animais estudados assemelham-se às observações de Alves et al. (2010) e Rosa et al. (2014), no entanto diferem nos tipos celulares envolvidos na inflamação, com predomínio do tipo linfocítico. O mecanismo fisiopatológico desencadeado pela doença pode ser responsabilizado pelo influxo de células ao tecido. Até momento não há um consenso se a resposta cardíaca é reacional, em decorrência da ação dos anticorpos circulantes e deposição de imunocomplexos no miocárdio, ou induzida pela ação direta do parasito ao órgão (Morais et al. 1988, Rosa et al. 2014, Mendes et al. 2014).

A observação de focos inflamatórios, fibrose, vasculite e infiltrados de adipócitos observadas no miocárdio dos cães, mesmo na ausência de transtornos elétricos, sugere que a evolução do processo inflamatório pode levar a fibrose difusa ou perivascular. Essas modificações teciduais podem alterar a função cardíaca, uma vez que leva à rigidez miocárdica, redução do fluxo sanguíneo e isquemia no órgão (Weber et al. 1989, Willenheimer 2000, Frühbeck et al., 2001). As alterações microscópicas identificadas no miocárdio foram independentes dos achados laboratoriais, eletrocardiográficos e quadro clínico externo apresentado pelos animais estudados.

Esses dados alertam para a dificuldade de identificação de cardiopatia em cães com leishmaniose visceral, quando utilizados esses métodos de investigação, e ressalta a importância de incluir a leishmaniose visceral no diagnóstico de patologias cardíacas principalmente em regiões endêmicas para o agente.

REFERÊNCIAS

- Alexandre-Pires G., Brito M.T., Algueró C., Martins C., Rodrigues O.R., Fonseca I.P. & Santos-Gomes G. 2010. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 137(34):275-83.
- Alves G.B.B., Pinho F.A., Silva S.M.M.S., Cruz M.S.P. & Costa F.A.L. 2010. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 43(3): 310-315.
- Ashford R.W. 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*. 4(5): 523-532.
- Barr S.C., Warner K.L. & Kornreic B.G. 2005. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 49:5160–5161.
- Carretón E., Grandi G. & Morchón R. 2012. Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (*Dirofilaria immitis*): immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. 26(189):390-393.

- Champion T., Franco C., Neto G.B.P. & Camacho A.A. 2013. Electrocardiographic evaluation and serum cardiac troponin I levels in anemic dogs with blood parasitosis. *Semina: Ciências Agrárias*. 34(6): 2915-2924.
- Dantas-Torres F. & Brandão-Filho S. P. 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 48(3): 151-156.
- Diamantino T.C.C. 2010. Leishmaniose visceral: avaliação das repercussões cardiovasculares secundárias à doença e ao tratamento em crianças e adolescentes tratadas com três esquemas terapêuticos. Tese de Doutorado em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 221p.
- Diniz P.P.V.P., De Moraes H.A.S., Breitschwerdt E.B., & Schwartz D.S. 2007. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *Journal Veterinary Internal Medicine*. 22:1136-1143.
- Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J., Muruzábal F.J. & Burrell M.A. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 280(6):827-847.
- Hoffmann K. M., Grillitsch M., Deutschmann A., Högenauer C., Stojakovic T. & Hauer A. C. 2013. Serum macromolecular creatine kinase type 1 as a diagnostic clue in inflammatory bowel disease?. *European Journal Pediatrics*. 172(5): 699-701.
- Hommel M., Jaffe Cl., Travi B. & Milon G. 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 89(1):55-73.
- Kaneko J. J., Harvey J. W., Bruss, M. L. 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6 ed. San Diego California: Academic Press. 916p
- Lainson R. & Rangel E. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Instituto Oswaldo Cruz*. 100 (8): 811-827.
- Lee K. N. C., Sako G., Bernhardt P. & Elin R.J. 1994. Relevance of macro creatine kinase type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data. *Clinical Chemistry*. 40:1278-83.
- Lopez-Peña M., Aleman N., Munoz F., Fondevila D., Suárez M. L., Goicoa A. & Nieto J. M. 2009. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 51:20.
- Melo, M.M., Verçosa Júnior, D., Pinto, M.C.L., Silveira, J.B., Ferraz, V., Ecco, R., & Paes, P.R.O. 2008. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60(3): 631-640
- Mendes R.S., Gurjão T.A., Oliveira L.M., Santana V.L., Tafuri W.L., Santos J.R.S., Dantas A.F.M. & Souza A.P. 2014. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi: aspectos clínicos e patológicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(1): 79-84.
- Moraes C.F.; Duarte M.I.S.; Corbett A.E.P.; Reis M.M. 1988. Alterações morfológicas cardíacas no curso da leishmaniose visceral humana. Estudo baseado em 16 casos de necropsia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 51:441-445.
- Oliveira E. 2009. Parasitismo e alterações histológicas em hamsters infectados com tecido medular de pacientes portadores de leishmaniose visceral. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. 57p.
- Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J., Bernadina W., Del Real G. & Ruitenberg J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*. 62(1): 229-235.
- Pinto A.Y., Valente S.A., Valente V.C., Ferreira Junior A.G., Coura J.R. 2008. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41(6):602-14
- Rosa F.A., Leite J.H., Braga E.T., Moreira P.R., Baltazar F.H., Biondo A.W., Padua P.P., Vasconcelos R.O., Camacho A.A., Ferreira W.L., Machado G.F. & Marcondes M. 2014. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum* chagasi. *Veterinary Pathology*. 51(3):603-6.
- Shaw J.J. 2006. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi for the etiological agent of American visceral leishmaniasis. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. 101(5): 577-579.
- Silva L.C., Castro R.S., Figueiredo M.M., Michalick M.S., Tafuri W.L. & Tafuri W.L. 2013. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *Journal of Experimental Pathology*. 94(2):133-43.
- Silvestrini P., Piviani M., Alberola J., Rodríguez-Cortés A., Planellas M., Roura X., O'Brien P.J. & Pastor J. 2012. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. *Veterinary Clinical Pathology*. 41(4):568-574.
- Smith S. C., Ladenson J.H., Mason J.W. & Jaffe A.S. 1997. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis: experimental and clinical correlates. *Circulation*, 95(1):163-68.
- Sousa M.G., Carareto R., Silva J.G. & Oliveira J. 2013. Assessment of the electrocardiogram in dogs with visceral leishmaniasis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(5): 643-647.

- Souza A. I., Paulino-Junior D., Sousa M. G. & Camacho A. A. (2008). Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural*. 38(5): 1351-1356.
- Sturk A. & Sanders G.T.B. 1990. Macro Enzymes: Prevalence, Composition, Detection and Clinical Relevance. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*. 28: 65-81
- Torrent E., Leiva M., Segalés J., Franch J., Peña T., Cabrera B. & Pastor J. 2005. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *Journal of Small Animal Practice*. 46 (11): 549-52.
- Weber K.T., Pick R., Jalil J.E., Janicki J.S. & Carroll E.P. 1989. Patterns of myocardial fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 21(5):121-31.
- Willenheimer R. 2000. Left ventricular remodelling and dysfunction: can the process be prevented? *International Journal of Cardiology*. 72(2):143–150.
- Wolf R., Camacho A.A. & Souza R.C.A. 2000. Eletrocardiografia computadorizada em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 52:616-620.
- Yuu H, Ishizawa S, Takagi Y, Gomi K., Senju O. & Ishii T. 1980. MacroCreatineKinase: A Study on CK-Linked Immunoglobulin. *Clinical chemistry*. 26:1816-20.

