



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**Avaliação ocular de cães com Leishmaniose visceral canina –
Relato de 11 casos**

Michelly Ayumi Iwamoto Moribayashi

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Paula Diniz Galera

BRASÍLIA - DF

JUNHO/2019



MICHELLY AYUMI IWAMOTO MORIBAYASHI

**Avaliação ocular de cães com Leishmaniose visceral canina –
Relato de 11 casos**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Diniz Galera

BRASÍLIA - DF
JUNHO/2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Moribayashi, Michelly Ayumi Iwamoto

Avaliação ocular de cães com Leishmaniose visceral canina – Relato de 11 casos. / Michelly Ayumi Iwamoto Moribayashi; orientação de Paula Diniz Galera. – Brasília, 2019.

20 p. : il.

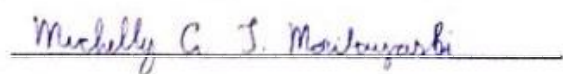
Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

Nome do Autor: Michelly Ayumi Iwamoto Moribayashi

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Avaliação ocular de cães com Leishmaniose visceral canina – Relato de 11 casos.

Ano: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.



Michelly Ayumi Iwamoto Moribayashi

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: MORIBAYASHI, Michelly Ayumi Iwamoto

Título: Avaliação ocular de cães com Leishmaniose visceral canina – Relato de 11 casos.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em 12 / 07 / 2019

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Paula Diniz Galera

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

MV. Dr^a. Ana Carolina da Veiga
Rodarte de Almeida

Instituição: ACR Oftalmologia Veterinária

Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

MV. Me. Rafaela Alves Ribon Tozetti

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovada

Assinatura: Rafaela Tozetti

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e aos meus pais Edvaine Hisao Moribayashi e Walmirian da Silva I. Moribayashi por me apoiarem sempre.

Aos meus amigos, especialmente aos que me acompanharam por toda a graduação. Ananda, Dara, Fernanda, Nathália e Wesley, obrigada por todo o apoio e companheirismo.

Agradeço à Prof^a. Paula Diniz Galera, pelos ensinamentos em Oftalmologia Veterinária e por ter aceitado ser minha orientadora. Se tornou um grande exemplo para mim.

Agradeço toda a equipe da Clínica Veterinária Tabanez, especialmente ao M.V. Paulo Tabanez por ter prontamente apoiado e disponibilizado sua clínica e pacientes, possibilitado a realização deste projeto.

Agradeço à M.V. Ana Carolina Rodarte da ACR Oftalmologia Veterinária, por aceitar compor minha banca e por ter sido fundamental na elaboração e realização deste projeto. Além de uma excelente profissional, se tornou uma ótima conselheira e me ensinou muito durante todo o período em que pude acompanhá-la.

Agradeço aos laboratórios do Hospital Veterinário da UnB que também contribuíram. À equipe do laboratório de Patologia Veterinária, especialmente ao Prof. Márcio Botelho de Castro e a residente Isabella. Ao laboratório de Patologia Clínica sob supervisão da Prof^a. Giane Paludo, e ao laboratório de Patologia molecular sob supervisão da M.V. Marcela Scalon.

Por fim, agradeço a todos que me acompanharam, servindo de exemplo e inspiração durante a graduação em Medicina Veterinária, professores, residentes, pós-graduandos, amigos e colegas. À toda equipe do Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB, em especial à M.V. Rafaela Tozzeti, por ter aceitado o convite para compor minha banca, e que também foi um dos meus primeiros contatos com a Oftalmologia Veterinária.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	4
3. RESULTADOS.....	7
4. DISCUSSÃO	10
5. CONCLUSÃO	14
6. REFERÊNCIAS.....	15

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Distribuição das oftalmopatias nos 8 animais com sinais oculares, e nos 15 olhos com alterações. Prevalência das alterações oculares encontradas no total de 11 animais, e total de 22 olhos avaliados.....8
- Tabela 2 – Valores médios para o Teste Lacrimal de Schirmer, Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal, e aferição da Pressão Intraocular por tonometria de rebote.....9
- Tabela 3 - Valores médios em segundos do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal obtidos (n=10)9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Presença de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. no interior de macrófagos (seta) em exame parasitológico conjuntival, coletado com escova interdental	10
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- CCS – Ceratoconjuntivite seca
- ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
- LVC – Leishmaniose Visceral Canina
- mmHg – Milímetros por mercúrio
- mm/min – Milímetros por minuto
- OD – Olho direito
- OE – Olho esquerdo
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PIO – Pressão intraocular
- RIFI – Reação de imunofluorescência indireta
- sp. – Espécie
- SRD – Sem raça definida
- TLS – Teste Lacrimal de Schirmer
- TR – Teste imunocromatográfico rápido
- TRFL – Teste de Ruptura do Filme Lacrimal

LISTA DE SIGLAS

ARVO – *Association for Research in Vision and Ophthalmology*

CEUA – Comissão de Ética de Uso Animal

DF – Distrito Federal

Avaliação ocular de cães com Leishmaniose visceral canina – Relato de 11 casos

RESUMO

A leishmaniose visceral canina é uma zoonose comum no DF, com alterações clínicas variáveis, que podem se manifestar ou não dependendo da evolução da doença. A literatura reporta a conjuntivite, blefarite, ceratoconjuntivite seca e uveíte, dentre as alterações oftálmicas mais frequentes. Objetivou-se identificar as principais alterações oculares observadas em 11 cães positivos para leishmaniose, avaliados entre dezembro de 2018 e fevereiro de 2019. O exame oftalmológico foi realizado de forma sequencial, iniciando com avaliação do teste de ameaça, ofuscamento, reflexos pupilares direto e consensual, seguido do Teste Lacrimal de Schirmer, aferição da Pressão Intraocular por tonometria de rebote, biomicroscopia com lâmpada em fenda, teste do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal, e teste de fluoresceína. Em seguida, sob anestesia tópica, foi realizada a coleta de material conjuntival para exame parasitológico por citologia esfoliativa, utilizando-se *swab* e escova de interdental cônica. Dos 11 animais avaliados, 8 (72,7%) apresentaram alterações no exame oftálmico, sendo 3 (37,5%) com sinais oculares e perioculares, e 5 (62,5%) com sinais apenas perioculares. Dentre os animais com alterações oftálmicas, 5 (62,5%) tinham apenas um tipo, enquanto 3 (37,5%) apresentaram mais de uma alteração no mesmo olho. Sinais oculares unilaterais foram observadas em 1 (12,5%) cão, e 7 (87,5%) apresentaram alterações bilaterais. A alteração qualitativa do filme lacrimal foi mais comum (100%), seguida da conjuntivite (40,9%), seguida por blefarite (22,7%), ceratite (13,6%) e uveíte anterior (9%). Não houve alteração evidente em Teste Lacrimal de Schirmer e Pressão Intraocular, no entanto todos os animais apresentaram redução no teste do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal. No exame parasitológico de conjuntiva, não foi encontrado o parasito nos 5 animais em que foi realizada a coleta por *swab*, contudo o exame realizado com escova interdental em 6 animais revelou positividade em 33,3%. A detecção do parasito neste teste foi mais frequente nas amostras oriundas de animais com sinais oculares mais intensos.

Palavras-chave: leishmaniose, uveíte, blefarite, citologia ocular, conjuntiva.

Ocular evaluation of dogs with canine visceral leishmaniasis - Report of 11 cases

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis is a common zoonosis in DF, with variable clinical manifestations, which may be present depending on the evolution of the disease. The literature reports conjunctivitis, blepharitis, keratoconjunctivitis sicca and uveitis, among the most frequent ophthalmic signs. The objective of this study was to identify the main ocular manifestations observed in 11 dogs leishmaniasis positive, evaluated between december 2018 and february 2019. The eye exam was performed sequentially, starting with the evaluation of menace response, dazzle, direct and consensual pupillary light reflexes, followed by Schirmer Tear Test, Intraocular Pressure measurement by rebound tonometry, slit lamp biomicroscopy, Tear Breakup Time test and fluorescein test. Subsequently, under topical anesthesia the collection of conjunctival material was performed for parasitological exam by exfoliative cytology using swab and tapered interdental brush. Among the 11 animals evaluated, 8 (72.7%) had some alteration in ophthalmic exam, 3 (37.5%) presented ocular and periocular signs, and 5 (62.5%) only periocular signs. In the group of the animals with ophthalmic alterations, 5 (62.5%) had only one type, while 3 (37.5%) had more than one alteration in the same eye. Unilateral involvement were observed in 1 (12.5%) dog, and 7 (87.5%) presented bilateral signs. Conjunctivitis was the most common (40.9%), followed by eyelid disorders (22.7%), keratitis (13.6%) and uveitis (9%). There was no evident variation in Schirmer Tear Test and Intraocular Pressure, however all animals showed reduction in the Tear Breakup Time test. In the parasitological exam of conjunctiva, the parasite was not found in the 5 animals in which swab collection was performed, however, the interdental brush exam in 6 animals revealed positivity in 33.3%. The detection of the parasite in this test was most frequently in samples from animals with more intense ocular signs.

Key-words: leishmaniasis, uveitis, blepharitis, ocular cytology, conjunctiva.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é causada por protozoários flagelados [10] da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania* [45], que acomete seres humanos e animais, tanto domésticos quanto silvestres.

Atualmente são reconhecidas 3 espécies como agente etiológico: *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África, *Leishmania donovani* na Ásia e África, e *Leishmania chagasi* nas Américas [45]. Alguns autores sugerem que a *L. chagasi* e a *L. infantum* sejam a mesma espécie, devido a suas semelhanças estruturais [2,27,31,36]. Os cães são o principal reservatório para a *L. infantum/chagasi*, sendo esta, uma causa frequente da doença clínica em algumas regiões, e que constitui a forma mais grave da doença [2]. Animais silvestres como os carnívoros das espécies *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Lycalopex vetulus* (raposa-do-mato), e gambás da espécie *Didelphis albiventris* são descritos como reservatórios da doença, além de equídeos, roedores, e eventualmente os gatos [36].

Sua transmissão ocorre principalmente através da picada de insetos flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo (África e Eurásia) e do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas), conhecidos como mosquitos palha [2,31,40]. Também pode ocorrer a transmissão através de brigas, de transfusões sanguíneas, de agulhas compartilhadas, do coito, e da transmissão vertical [10]. O DNA de *L. infantum* já foi amplificado através de PCR (reação em cadeia da polimerase) em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* coletados em cães naturalmente infectados, sugerindo que é possível a transmissão por outros vetores como pulgas e carrapatos, seja mecanicamente ou biologicamente [38].

A doença é classificada em tegumentar e visceral [45], sendo que a visceral, também conhecida como calazar, é uma zoonose que ocorre em regiões subtropicais e tropicais [40]. Os cães tipicamente desenvolvem uma combinação da forma visceral e tegumentar da doença [17].

O ciclo de vida do parasito envolve um vetor flebotomíneo (mosquito palha) e um hospedeiro vertebrado susceptível [2,39]. As leishmanias apresentam duas formas: uma aflagelada ou amastigota, intracelular obrigatória, encontrada no interior de macrófagos de hospedeiros vertebrados, e outra flagelada ou promastigota, presentes no tubo digestório dos insetos vetores [31,45]. Após a infecção no hospedeiro vertebrado, dentro das primeiras horas ocorre a disseminação hematogênica e linfática para outros tecidos: linfonodos, baço, medula óssea [36] e fígado, causando uma infecção crônica [37].

Os sinais clínicos geralmente se desenvolvem de 3 meses a 7 anos após a infecção [10,36], porém alguns animais podem apresentar-se assintomáticos [3,16]. A maioria dos cães desenvolvem doença visceral ou sistêmica, sendo que 90% apresentam algum envolvimento cutâneo concomitantemente [36]. Como a leishmaniose visceral canina (LVC) reflete uma variedade de disfunções em diferentes órgãos, é possível a manifestação de diversos sinais clínicos [21].

São comuns alterações inespecíficas como: apatia, emagrecimento progressivo, hipertermia intermitente, hiporexia ou anorexia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e atrofia muscular [3,45]. Outros sinais incluem: anemia, colite [40], insuficiência renal (poliúria, polidipsia e vômito), poliartrite, poliomiosite [36], rinite, epistaxe, icterícia [3], hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e proteinúria. A glomerulonefrite e poliartrite ocorrem devido a formação de imunocomplexos [10]. Sinais dermatológicos são achados frequentes [39] como dermatite granulomatosa ou ulcerativa, hiperkeratose, descamação, úlceras mucocutâneas, onicogribose. Também podem ocorrer alterações respiratórias [17], e sinais neurológicos em decorrência de infecções oportunistas ou pela deposição de imunocomplexos [45].

A presença de alterações oftálmicas não é incomum [3], e pode ser o único sinal clínico de leishmaniose observado em alguns cães [33]. Vários estudos demonstram a

ocorrência de 16% a 80,5% [8,11,15,28,33], sendo observadas principalmente no segmento anterior do bulbo ocular [45], geralmente de forma bilateral [15]. A blefarite, ceratoconjuntivite seca e uveíte anterior vêm sendo descritas como as alterações oculares mais frequentes na LVC [11,33]. Comumente a blefarite está associada à dermatite facial e à ceratoconjuntivite seca [45].

O diagnóstico clínico da LVC é complexo devido à variedade de sinais que são comuns a diversas doenças [36,16], que constam desde animais aparentemente saudáveis, até estágios mais graves da doença [15]. O diagnóstico laboratorial vale-se dos métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares [36].

O Ministério da Saúde recomenda para o inquérito canino, que sejam feitos os testes imunocromatográfico rápido (TR) para a triagem de cães sorologicamente negativos e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste TR [5]. O diagnóstico parasitológico é considerado o teste de excelência, onde se observam as formas amastigotas da *Leishmania sp.* em esfregaços de aspirado de linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e esfregaços sanguíneos corados com corantes de rotina, tais como Panótico e Giemsa [3,36]. A citologia aspirativa é um método amplamente utilizado por ser de fácil execução [36]. Possui especificidade de 100%, mas a sensibilidade depende do grau de parasitismo, do tipo de material biológico coletado, do seu processamento e coloração, e da experiência do observador. Em amostras de medula óssea a sensibilidade pode ser de 50 a 83%, em linfonodo entre 30 a 85%, e quando analisado em ambos os tecidos, entre 71 a 91%. A sensibilidade do teste pode ser melhorada com o aumento do tempo de observação e do número de campos observados [3].

Dentre os métodos moleculares, destaca-se a PCR, que permite identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito [36]. O DNA pode ser extraído de várias amostras, como sangue, biópsias de pele, linfonodos, medula óssea e baço [34]. Existem outros

métodos, como o xenodiagnóstico, o cultivo parasitológico, e a inoculação experimental em hamster [36].

Vários estudos realizados em diversas regiões do mundo descrevem a presença de formas amastigotas do parasito em tecidos oculares, tanto em citologia [3,7,12], quanto em PCR conjuntival [1,14,20,23,33,42]. Pesquisas com imunistoquímica descrevem a presença do parasito em histiócitos e macrófagos na conjuntiva de terceira pálpebra em cerca de 90% das amostras [9,24], na córnea, limbo e esclera em 24%, íris e corpo ciliar em 20%, e ausentes em nervo óptico, retina e coroide [9].

A leishmaniose canina é uma doença comum no Distrito Federal (DF), tanto em áreas urbanas quanto rurais [19,35]. A identificação das principais alterações observadas em cães de nossa região pode facilitar a condução do diagnóstico, repercutindo em resultados terapêuticos mais favoráveis. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo identificar e descrever as principais alterações oculares observadas em 11 cães positivos para leishmaniose no DF.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (protocolo n. 15/2019) e todos os procedimentos realizados de acordo com a *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

Durante o período de dezembro de 2018 a fevereiro de 2019 foram avaliados 11 cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral canina (LVC) do Distrito Federal, 6 machos e 5 fêmeas de raças variadas, sendo 1 macho e 2 fêmeas castrados, com idades entre 1 e 10 anos, pesando entre 6 e 39 kg. Os animais eram provenientes da rotina de atendimento da Clínica Veterinária Tabanez (Brasília - DF), um centro de especialidades voltado ao

atendimento de pequenos animais, referência no tratamento de animais com leishmaniose. O critério de seleção dos pacientes para o presente estudo incluía o diagnóstico prévio de LVC confirmado por testes sorológicos (RIFI e ELISA) e por visualização direta do parasito (exame parasitológico direto de medula óssea) ou PCR. Houve consentimento e disponibilidade dos tutores em aderir a pesquisa. Foram excluídos os animais muito agitados e que foram submetidos ao tratamento tópico e/ou sistêmico prévio por um tempo prolongado.

Os animais foram submetidos à contenção física de forma gentil por equipe treinada, para a avaliação clínica e oftalmológica. Os métodos utilizados são considerados rápidos e não-invasivos, permitindo a coleta de dados com mínimo estresse para os indivíduos selecionados, visando também não interferir nos parâmetros avaliados.

2.2. Avaliação oftalmológica

O exame oftalmológico foi realizado de forma sequencial, iniciando pela avaliação do teste de ameaça, ofuscamento, reflexos pupilares direto e consensual seguida pela mensuração da produção lacrimal pelo Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) (Ophthalmos Fórmulas®, São Paulo, SP, Brasil), aferição da pressão intraocular (PIO) com tonômetro de rebote (Icare®, Tonovet plus) na calibragem para a espécie canina. Seguiu-se com a avaliação das estruturas oculares e perioculares pela biomicroscopia com lâmpada em fenda (Keeler® PSL Classic).

Ato contínuo, foi avaliado o Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) em 10 animais, instilando-se, na extremidade da tira de fluoresceína, uma gota de solução fisiológica estéril (aproximadamente 0,05 mL). A tira foi inserida no saco conjuntival inferior, mantendo contato direto durante 7 segundos. As pálpebras foram fechadas manualmente por 10 segundos e reabertas. A superfície ocular foi iluminada com a luz de cobalto da lâmpada em fenda, cronometrando-se o tempo até o aparecimento da primeira mancha seca (indicando a ruptura do

filme lacrimal na superfície corneana). Em seguida, as pálpebras foram novamente fechadas por 10 segundos e o teste foi repetido, totalizando 3 aferições. Após a realização do TRFL, os olhos foram lavados com solução fisiológica para avaliar a integridade da córnea pelo teste de fluoresceína. O valor final considerado foi a média entre as três avaliações.

Seguiu-se o teste de fluoresceína (Ophthalmos Fórmulas, São Paulo, SP, Brasil), e por último foi realizada a coleta de material conjuntival para exame parasitológico.

2.3 Exame parasitológico de citologia esfoliativa conjuntival

Instilou-se colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5%, (Anestalcon®; Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo - SP, Brasil) em ambos os olhos, previamente à coleta de amostra para citologia para exame parasitológico. Foram utilizados dois métodos de coleta, o *swab* e a escova interdental, sendo um único método empregado em cada animal. Nos quatro primeiros casos atendidos, foram coletadas amostras com o *swab* umedecido com uma gota de solução fisiológica estéril, armazenada em flaconetes de plásticos de 10ml cada, posteriormente foi realizada suave escarificação da conjuntiva bulbar, palpebral inferior e da conjuntiva palpebral da terceira pálpebra. O material obtido foi depositado suavemente sobre a lâmina de microscopia, com movimentos de rolagem, totalizando 2 lâminas por olho.

Nos seis animais seguintes, as amostras foram coletas com auxílio de escova interdental cônica com 3 a 7 mm, e da mesma forma foi empregada suave escarificação da conjuntiva palpebral inferior, da conjuntiva bulbar inferior e da conjuntiva palpebral da terceira pálpebra. Ato seguinte o material foi depositado na extremidade de cada lâmina, e espalhado por sobre ela, com o movimento de *squash*, confeccionando-se 3 lâminas para cada amostra.

As lâminas foram coradas com panótico de acordo com as recomendações do fabricante, e avaliadas com o auxílio do setor de Patologia Veterinária da UnB. A leitura foi feita em microscópio óptico de luz.

3. RESULTADOS

Dos 11 animais avaliados, 8 (72,7%) apresentaram alterações no exame oftálmológico, sendo 3 (37,5%) com sinais oculares e perioculares, e 5 (62,5%) com sinais apenas perioculares. Dentre os animais com alterações, 5 (62,5%) apresentavam apenas um tipo de sinal oftálmico, enquanto 3 (37,5%) apresentaram mais de uma alteração no mesmo olho. Sinais oculares unilaterais foram observados em 1 cão (12,5%), e em contrapartida 7 animais (87,5%) apresentaram alterações bilaterais. As principais alterações oculares observadas foram a conjuntivite, a ceratite, a uveíte e as alterações em pálpebras (Tabela 1).

Todos os animais apresentaram o teste de ameaça, ofuscamento, reflexos pupilares direto e consensual dentro da normalidade. Em relação ao total de olhos e anexos analisados (n=22), 15 (68,1%) apresentaram alguma alteração, sendo que um animal apresentou sinais unilaterais. Dentre as alterações oculares encontradas neste estudo (n = 15), a conjuntivite foi a alteração mais comum, sendo observada em 9 olhos (60%). Os principais sinais oftálmicos observados na conjuntivite foram hiperemia conjuntival (n=9 - 60%), quemose (n=3 - 20%), secreção ocular (n=2 - 13,3%), sendo que um animal apresentou espessamento bilateral de conjuntiva palpebral e bulbar superior e inferior, mais intenso no olho direito. Conjuntivite folicular na terceira pálpebra bilateral foi encontrada em um caso que estava associado a epífora. Além disso, também foi observado hiperemia com edema em terceira pálpebra unilateral. A ceratite foi reportada em 3 olhos (20%), assim como a episclerite. A ceratite, por sua vez, foi caracterizada por edema de córnea (n=3 - 20%), vascularização (n=2 - 13,3%) e melanose (n=2 - 13,3%). Esteve associada a conjuntivite e uveíte anterior em 2 olhos e a blefarite em 1 olho. Adicionalmente, foi observada distrofia corneal unilateral em um cão, e outros dois apresentavam uma mácula corneal unilateral.

As alterações em pálpebras ocorreram em 5 olhos (33,3%), se manifestaram através do blefarodema (n=4 - 26,6%), de lesão cutânea ulcerativa superficial em pálpebra (n=4 -

26,6%), do blefaroespasma (n=2 - 13,3%) e alopecia periocular (n=1 - 6,6%). Um animal apresentou uveíte anterior bilateral, caracterizada por intensa hiperemia conjuntival, edema de íris com perda de pigmentação do estroma, *flare* moderado, hifema difuso, vascularização corneal curta e profunda (injeção ciliar), edema corneal e melanose em canto nasal. O olho direito mostrou-se buftálmico, porém com a PIO dos valores de normalidade, sendo 14 mmHg no olho direito e 16 mmHg no olho esquerdo.

Tabela 1 Distribuição das oftalmopatias nos 8 animais com sinais oculares, e nos 15 olhos com alterações. Prevalência das alterações oculares encontradas no total de 11 animais, e total de 22 olhos avaliados.

Sinal ocular	Animais acometidos		Prevalência (animais)	Olhos com alterações		Prevalência (olhos)
	n	%	%	n	%	%
Conjuntivite	5	62,5	45,4	9	60	40,9
Hiperemia	5	62,5	45,4	9	60	40,9
Quemose	2	25	18,1	3	20	13,6
Espessamento de conjuntiva	1	12,5	9	2	13,3	9
Blefarite	3	37,5	27,2	5	33,3	22,7
Blefarodema	2	25	18,1	4	26,6	18,1
Lesão cutânea em pálpebra	2	25	18,1	4	26,6	18,1
Alopecia periocular	1	12,5	9	1	6,6	4,5
Blefaroespasma	1	12,5	9	2	13,3	9
Episclerite	2	25	18,1	3	20	13,6
Ceratite	2	25	18,1	3	20	13,6
Vascularização corneal	2	25	18,1	2	13,3	9
Edema de córnea	2	25	18,1	3	20	9
Melanose	1	12,5	9	2	13,3	9
Uveíte	1	12,5	9	2	13,3	9
Conjuntivite folicular em 3ª pálpebra	1	12,5	9	2	13,3	9

O TLS variou de 16mm/min a 35mm/min (Tabela 2), e o TRFL de 5 a 10 segundos (Tabela 2 e 3), sendo a média dos maiores valores pertencentes aos animais sem sinais oculares. Apenas um animal apresentou epífora com secreção serosa moderada em ambos os olhos, com TLS 35mm/min no olho direito, 25mm/min no olho esquerdo, e conjuntivite folicular no olho direito.

A PIO (Tabela 2) variou de 13 mmHg a 27 mmHg (Tabela 2). O valor mais alto (27 mmHg) foi observado no olho esquerdo em um animal, além de hiperemia e edema de 3ª pálpebra no olho direito, blefaroespasma e lesão de pele em ambos os olhos.

Tabela 2 Valores médios para o Teste Lacrimal de Schirmer, Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal, e aferição da Pressão Intraocular por tonometria de rebote.

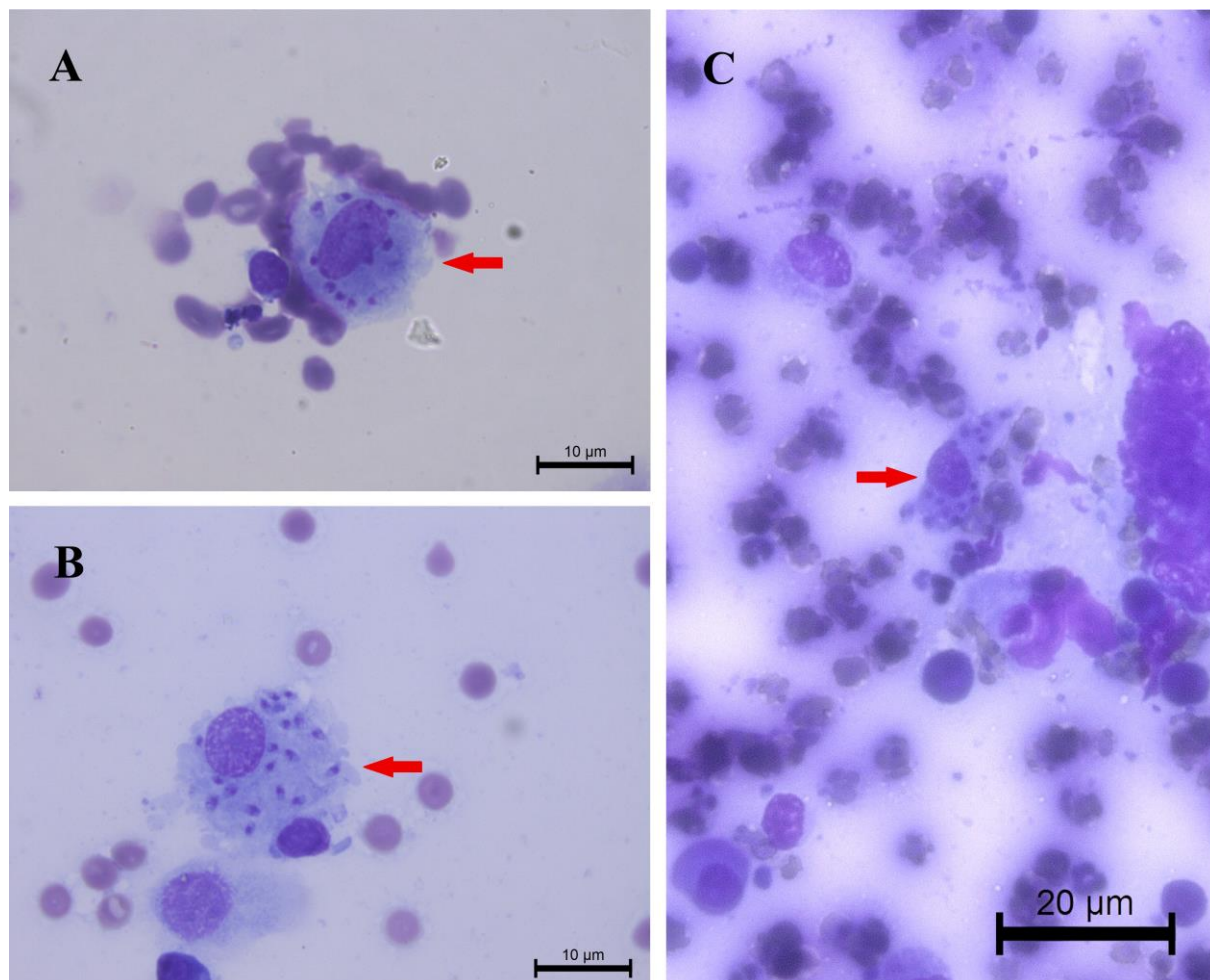
	TLS		TRFL		PIO	
	OD	OE	OD	OE	OD	OE
Média	21,6	21	7,9	7,8	19,3	19,7
Mediana	20	21	9	8,5	20	20
Desvio Padrão	5,5	2,9	1,7	1,7	4	3,8

Tabela 3 Valores médios em segundos do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal obtidos (n=10).

Raça	Olho direito	Olho esquerdo
American Bully	7,6	7,6
Beagle	10	8
Buldogue Francês	7,3	8,6
Jack Russell Terrier	7	6
Shih Tzu	5	5,6
Spitz Alemão	7,6	9,3
SRD	7,3	6,3
SRD	8	9,3
SRD	9	8
SRD	10,3	9

Dos cinco animais em que foi realizada a citologia por *swab*, 4 apresentavam algum sinal oftálmico, e nenhum foi positivo ao exame parasitológico. Nos seis seguintes, quatro apresentavam alterações oculares, sendo dois animais positivos no exame por escova interdental (Figura 1). Ambos animais positivos apresentavam intensa conjuntivite e/ou blefarite.

Figura 1 Presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.* no interior de macrófagos (seta) em exame parasitológico conjuntival, coletado com escova interdental.



4. DISCUSSÃO

Os resultados do estudo sugerem que as alterações oculares e perioculares na leishmaniose ocorreram com frequência nos animais avaliados, ocorrendo em 72,7% dos cães (8 em 11 animais) e em 68,1% dos olhos examinados (15 em 22 olhos). A frequência foi baixa comparativamente à obtido por Molleda et al. [28] em 1993, que relataram alterações oculares em 80,5% dos cães; e alta comparativamente a outros estudos, que reportaram de 16% à 24,4% [11,21,33]. No que diz respeito a outras pesquisas brasileiras, a frequência de alterações oculares deste estudo foi mais alta do que a encontrada por Fulgêncio et al. [15] em 2006 no estado de Minas Gerais, Brasil, sendo 48% dos cães acometidos e com alterações em 38% dos olhos avaliados e similar ao descrito por Brito et al. [8] em 2006, no estado de Pernambuco,

com acometimento de 76% dos cães pela leishmaniose, e 72% dos olhos com alterações. As diferenças encontradas provavelmente são devido a patogenicidade da *Leishmania* envolvida e resposta imune individual do animal [8].

As alterações oculares ocorreram predominantemente de forma bilateral (87,5%), semelhante ao anteriormente descrito por outros autores, variando de 79,2 a 89,5 % [8,15,32]. A alta frequência pode ser correlacionada ao caráter sistêmico da doença principalmente em casos crônicos [8], embora estágios iniciais podem apresentar-se com alterações unilaterais [15]. Também foi mais comum que os animais apresentassem apenas um tipo de alteração (62,5%), assim como reportado por outros autores, com resultados de 64,6% e 73,7% [8,15]. Sinais como alopecia periocular, blefarite, conjuntivite, ceratoconjuntivite seca, ceratite e uveíte são frequentemente associados à LVC [8,15,21,32].

A conjuntivite foi um sinal evidente, estando presente em 45,4% dos cães positivos para LVC, observada em 40,9% do total de olhos avaliados, sendo considerada um achado frequente nesta afecção [21], afetando a conjuntiva palpebral, bulbar, e da terceira pálpebra [44]. Na leishmaniose a conjuntivite pode ocorrer de forma primária ou secundária, por afetar as pálpebras e o aparelho lacrimal, repercutindo em alterações de superfície ocular [32]. Foram observadas hiperemia conjuntival, secreção ocular, quemose e espessamento de conjuntiva. Segundo a literatura, ocasionalmente também podem ser observados nódulos discretos multifocais de coloração esbranquiçada na conjuntiva [4,33], mas este achado não foi detectado nos cães avaliados neste estudo.

A ceratite ocorreu em 13,6% (3 olhos, n=22), associada a conjuntivite e uveíte anterior em 2 olhos, e a blefarite em 1 olho. Esta alteração raramente ocorre de forma isolada na leishmaniose canina, geralmente está associada a conjuntivite ou uveíte [4,44]. Foram observados sinais como edema corneal, neovascularização e pigmentação. Ao contrário do que

é frequentemente relatado por outros autores [9,30,44], sinais associados a ceratoconjuntivite seca (CCS) não foram observados em nenhum animal.

Foram observadas alterações na terceira pálpebra de 2 animais, um apresentou conjuntivite folicular bilateral, e outro hiperemia com edema unilateral em terceira pálpebra. A formação de folículos linfóides subconjuntivais é mais comumente observada na superfície bulbar da terceira pálpebra, geralmente acompanhada por epífora leve ou descarga mucoide e são frequentemente relacionados a situações alérgicas [25]. Não há evidência que ligue a formação de conjuntivite folicular a causas bacterianas ou virais [18], e alterações clínicas em terceira pálpebra não são comumente reportadas como consequência da LVC [4,33]. No entanto, outros estudos encontraram alterações histopatológicas em terceira pálpebra associadas a leishmaniose canina, como áreas subepiteliais de infiltrado mononuclear (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) [6,24,44], com maior intensidade na face bulbar [24], metaplasia escamosa de células epiteliais, e hiperplasia de células calciformes [6]. Podem ocorrer alterações microscópicas não inflamatórias, como a dilatação cística dos ductos e a atrofia acinar, mais evidentes nas regiões adjacentes ao infiltrado inflamatório [24]. O epitélio de revestimento da terceira pálpebra pode tornar-se fino, e as vezes ulcerado [9]. Além disto, Lima et al. [24] em 2005 descreveram a presença de amastigotas tanto no interior dos histiócitos quanto livres no interstício tecidual em conjuntiva da terceira pálpebra.

Alterações em pálpebras foram evidenciadas em 33,3% dos olhos, sendo o segundo sinal mais frequente. Foram observados blefaroedema, lesão ulcerativa superficial em pálpebra e alopecia periocular. A formação de nódulos cutâneos em pálpebra, devido a reação granulomatosa [33,41], classificada como blefarite nodular [39, 44], não esteve presente em nossos animais. Adicionalmente, as blefarites observadas no estudo são classificadas em: esfoliativa, caracterizada por alopecia periocular, seborreia e descamação; e ulcerativa, com ulcerações epiteliais, acúmulo de secreção e crostas [39, 44].

A uveíte anterior foi relatada por Brito et al. [8] em 2006 e Peña et al. [33] em 2000 como o sinal ocular mais comum nos cães avaliados com LVC. De ocorrência aguda, repercute em hiperemia conjuntival, edema de córnea e íris, fibrina intracameral, hifema, miose, formação de nódulos discretos e multifocais no estroma da íris [4] e, mais raramente, evoluindo para glaucoma [8]. No presente estudo esta manifestação ocular foi observada em apenas um animal, que apresentou de forma bilateral intensa hiperemia conjuntival, edema de íris com perda de pigmentação do estroma, *flare* moderado, hifema difuso, vascularização corneal curta e profunda (injeção ciliar), edema corneal, melanose em canto nasal e o olho direito com aspecto buftálmico, a despeito da PIO estar dentro do valor de referência em ambos os olhos. A buftalmia provavelmente decorreu devido a um glaucoma apresentado anteriormente em consequência do histórico de uveítes recorrentes do animal. A LVC pode predispor ao glaucoma pela presença de infiltrado inflamatório e parasitos no ângulo iridocorneal [32]. Histologicamente, as alterações mais comuns em íris, corpo ciliar e processo ciliar são congestão vascular, edema e perivasculite, com infiltrado de plasmócitos e macrófagos; além de deposição de fibrina e hemorragia no processo ciliar; fibrose, hemorragia e hiperplasia de fibras musculares no corpo ciliar [9]. Contudo, no presente estudo não foi realizado histopatológico de nenhum bulbo ocular.

Os valores do TLS apresentaram-se dentro do valor de referência em todos os animais, de 16mm/min a 35mm/min, indicando que não houve alteração quantitativa na produção lacrimal nos animais avaliados. Apesar de nenhum animal ter apresentado CCS quantitativa (Schirmer < 15mm/min) [26], o TRFL mostrou-se diminuído (5 a 10 segundos) em todos os animais comparado ao valor de referência (cerca de 15 - 25 segundos) [13], indicando alteração qualitativa do filme lacrimal. Isto pode ser causado por anormalidades ou deficiências nos componentes lipídico e mucoso da lágrima [29]. Acredita-se que o parasito pode causar a destruição das glândulas de meibômio, devido ao processo inflamatório granulomatoso ou

obstrução dos ductos destas glândulas [22]. Podem ocorrer alterações microscópicas não inflamatórias, como a dilatação dos ductos das glândulas [24,30] e a atrofia acinar [9,24,44], levando a retenção e acúmulo da secreção [30,44], mas os olhos avaliados não foram submetidos à biópsia.

Dois em 6 animais (33,3%) submetidos a citologia por escova, cujos sinais oculares eram os mais evidentes do grupo, tiveram o resultado positivo no exame parasitológico conjuntival. Um estudo semelhante que empregou *swab* conjuntival para avaliação citológica detectou 16% e 60% de positividade no grupo de cães sem e com intercorrências oftálmicas dignas de significação clínica, respectivamente [3], sugerindo que cães com manifestações oculares compatíveis para LVC podem ter seu primeiro diagnóstico através deste exame.

Nenhum animal foi positivo ao exame coletado por *swab*, em contraste ao exame realizado com escova em que houve positividade em 33,3%. Isto pode ter ocorrido devido a maior quantidade de material obtido com a escarificação exercida pelas cerdas da escova, mas também pelo pequeno grupo de animais avaliados. Além disto, os animais positivos apresentavam intenso blefaroedema e/ou conjuntivite, com maior presença de células inflamatórias, aumentando as chances de se encontrar um macrófago parasitado na amostra coletada. É mais frequente detecção do parasito em amostras obtidas de olhos com sinais clínicos [3,14,30], e citologia com escova é apontada como superior aos demais métodos citológicos [13,43]. Ambos os métodos realizados neste estudo para o exame parasitológico conjuntival forneceram boa preservação celular, mas com diferença notável na quantidade de células obtidas.

5. CONCLUSÃO

A leishmaniose visceral apresentou alta frequência de alterações oculares nos cães com diagnóstico de LVC. A alteração qualitativa do filme lacrimal foi mais comum, seguida da

conjuntivite, blefarite, ceratite e uveíte anterior. O exame parasitológico conjuntival por escova mostrou maior celularidade do que a coleta por *swab*, e a detecção do parasito foi mais frequente nas amostras oriundas de animais com sinais oculares mais intensos. O pequeno número de animais foi devido ao período limitado de avaliação, no entanto o presente estudo pode servir como piloto para pesquisas posteriores.

6. REFERÊNCIAS

- 1 **Aschar M., de Oliveira E.T.B., Laurenti M.D., Marcondes M., Tolezano J.E., Hiramoto R.M., Corbett C.E.P. & da Matta, V. L. R. 2016.** Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*. 225: 108-113.
- 2 **Baneth G. & Solano-Gallego L. 2015.** Doenças Causadas por Protozoários. In: GREENE C.E. (Ed). *Doenças infecciosas em cães e gatos*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.768-784.
- 3 **Barbosa V.T., Silva M.A.G, Sousa M.G, Gering A.P, Santos H.D & Laus J.L. 2012.** Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 64(6): 1465-1470.
- 4 **Bettio M. 2017.** Repercussões oculares e perioculares da leishmaniose visceral em cães. 49f. Porto Alegre, RS. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul.
- 5 **Brasil. 2016.** Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde [recurso eletrônico]. 1.ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 773p.

- 6 **Brito F.L.C., Alves L.C., Duque Ortiz J.P., Maia, F.C.L., Silva Junior V.A. & Laus J.L. 2004.** Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from the Olinda city, Pernambuco, Brazil. *Ciência Rural*. 34(3): 925-929.
- 7 **Brito F.L.C., Alves L.C., Maia F.C.L., Albuquerque A.R., Ortiz J. P. D. & Laus, J. L. 2007.** Amastigota forms resembling *Leishmania sp.* on corneal ulceration in a dog: case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59(1): 81-84.
- 8 **Brito F.L.C., Alves L.C., Maia F.C.L., Santos E.S.C., Laus J.L. & Meunier I.M.J. 2006.** Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58(5): 768–775.
- 9 **Brito F.L.C., Laus J.L., Tafuri W.L., Figueiredo M.M., Silva Júnior V.A., Maia F.C. L., & Alves L.C. 2010.** Histopathological findings and detection of parasites in the eyes of dogs infected naturally with *Leishmania chagasi*. *Ciência Rural*. 40(5): 1141–1147.
- 10 **Catharine J. & Scott-Moncrieff R. 2015.** In: Nelson R.W. & Couto C.G. (Eds). *Medicina interna de pequenos animais*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.1370-1372.
- 11 **Ciaramella P., Oliva G., De Luna R., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A. & Persechino A. 1997.** A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*. 141(21): 539-543.
- 12 **Eguchi G.U., Oliveira G.G., Babo-Terra V.J., Souza A.I., Barros R. & Palumbo M.I.P. 2017.** Ceratoconjuntivite nodular em um caso de leishmaniose visceral canina: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 69(6): 1480-1484.
- 13 **Featherstone H.J. & Heinrich C.L. 2013.** Ophthalmic Examination and Diagnostics - Part 1: The Eye Examination and Diagnostic Procedures. In: Gelatt K.N. (Ed). *Veterinary Ophthalmology*. 5th edn. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell (John Wiley & Sons), pp.533-613.

- 14 **Ferreira S.A., Leite R.S., Ituassu L.T., Almeida G.G., Souza D.M., Fujiwara R.T., Andrade A.S.R. & Melo M.N. 2012.** Canine Skin and Conjunctival Swab Samples for the Detection and Quantification of *Leishmania infantum* DNA in an Endemic Urban Area in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6(4): e1596-e1596.
- 15 **Fulgêncio G.O. 2006.** Prevalência de oftalmopatias em cães naturalmente infectados com *Leishmania (leishmania) chagasi* no município de Belo Horizonte - Estudo clínico e histopatológico. 48p. Belo Horizonte, MG. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 16 **Gontijo C.M.F. & Melo M.N. 2004.** Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 7(3): 338-349.
- 17 **Gould D. & Pappasouliotis K. 2013.** Clinical Microbiology and Parasitology. In: Gelatt K.N. (Ed). *Veterinary Ophthalmology*. 5th edn. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell (John Wiley & Sons), pp.300-500.
- 18 **Hendrix D.V.H. 2013.** Diseases and Surgery of the Canine Conjunctiva and Nictitating Membrane. In: Gelatt K.N., Gilger B.C. & Kern T.J. (Eds). *Veterinary Ophthalmology*. 5th edn. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell (John Wiley & Sons), pp.945-975.
- 19 **Herenio E.M., Fortes R.C. & Rincon G. 2014.** Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. *Journal of the Health Sciences Institute*. 32(2):126-129.
- 20 **Karakuş M., Töz S., Ertabaklar H., Paşa S., Atasoy A., Arserim S. K., Olgen M.K., Alkan Z., Durrant C. & Özbel, Y. 2015.** Evaluation of conjunctival swab sampling in the diagnosis of canine leishmaniasis: A two-year follow-up study in Çukurova Plain, Turkey. *Veterinary Parasitology*. 214(3-4): 295–302.

- 21 **Koutinas A., Polizopoulou Z., Saridomichelakis M., Argyriadis D., Fytianou A. & Plevraki K. 1999.** Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*. 35(5): 376–383.
- 22 **Koutinas A.F. & Koutinas C.K. 2014.** Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*. 51(2): 527–538.
- 23 **Leite R.S., Ferreira S.A., Ituassu L.T., de Melo M.N. & de Andrade A.S.R. 2010.** PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology*. 170(3-4): 201–206.
- 24 **Lima A.M.V., Santos A.S., Faleiro M.B.R., Moura V.M.B.D., Brito F.L.C. & Brito L.A.B. 2015.** Imunomarcacão de *leishmania sp.* E aspectos histológicos na terceira pálpebra de cães naturalmente infectados por *Leishmania (leishmania) chagasi*. *Ciência Animal Brasileira*. 16(4): 538–547.
- 25 **Maggs D.J. 2013.** Conjunctiva. In: Maggs D., Miller P.B. & Ofri R. (Eds). *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 5th edn. St. Louis, MO: Elsevier (Saunders), pp.140-158.
- 26 **Maggs D.J. 2013.** Diagnostic Techniques. In: Maggs D., Miller P.B. & Ofri R. (Eds). *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 5th edn. Sant Louis, MO: Elsevier (Saunders), pp.79-109.
- 27 **Mauricio I.L., Howard M.K., Stothard J. R. & Miles M.A. 1999.** Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. 119(3): 237-246.
- 28 **Molleda J.M., Novales P.J. & Ginel, A. 1993.** Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 48(4): 173-178.

- 29 **Moore C.P. 1990.** Qualitative Tear Film Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 20(3): 565-581.
- 30 **Naranjo C., Fondevila D., Leiva M., Roura X. & Peña T. 2005.** Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 133(1): 37-47.
- 31 **Pena H.F.J., Goulart P.R.M. 2010.** Protozoários. In: Bowman D.D. (Ed). *Georgis Parasitologia Veterinária*. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.81-109.
- 32 **Peña M.T., Naranjo C., Klaus G., Fondevila D., Leiva M., Roura,X., Davidson M.G. & Dubielzig, R. R. 2008.** Histopathological Features of Ocular Leishmaniosis in the Dog. *Journal of Comparative Pathology*. 138(1): 32-39.
- 33 **Peña M.T., Roura X. & Davidson M.G. 2000.** Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dog: 105 cases (1993-1998). *Veterinary ophthalmology*. 3(1): 35-41.
- 34 **Pereira V.F., Benassi J.C., Starke-Buzetti W.A., Silva D.T., Ferreira H.L., Keid, L. B., Soares R.M., Ruiz V.L.A. & Oliveira T.M.F.S. 2016.** Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 49(1): 104-106.
- 35 **Ribeiro C.R., Gonçalves C.A., Cruz L.M. & Galera P.D. 2019.** Prevalência da leishmaniose visceral canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal – Brasil. *Ciência Animal Brasileira*. 20:1-8
- 36 **Schimming B.S. & Silva J.R.C.P. 2012.** Leishmaniose visceral canina - Revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária (Periódicos Semestral)*. Ano X(19): 1-17.
- 37 **Silva F.F. 2007.** Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*. 1(1): 20-31.

- 38 **Solano-Gallego L., Rossi L., Scroccaro A.M., Montarsi F., Caldin M., Furlanello T. & Trotta M. 2012.** Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in Rhipicephalus sanguineus male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 5(1): 1-6.
- 39 **Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M., Ferrer, L., Bourdeau P., Oliva G. & Baneth, G. 2011.** LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 4(1): 1-16.
- 40 **Sousa T.C, Francisco A.K.P.R & Santos S.I.B. 2015.** Leishmaniose Canina em Brasília, DF: Uma Revisão da Literatura. *Tempus actas de saúde coletiva Brasília*. 9(3): 187-202.
- 41 **Stades F.C. & Woerdt A. 2013.** Diseases and Surgery of the Canine Eyelid. In: Gelatt K.N., Gilger B.C. & Kern T.J. (Eds). *Veterinary Ophthalmology*. 5th edn. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell (John Wiley & Sons), pp.832-893.
- 42 **Strauss-Ayali D., Jaffe C.L., Burshtain O., Gonen L. & Baneth G. 2004.** Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *The Journal of Infectious Diseases*. 189(9): 1729–1733.
- 43 **Venancio S.A.S., Vieira A.B., Alencar A.X. & Soares A.M.B. 2012.** Avaliação da técnica de esfoliação com escova citológica para coleta de células conjuntivais em gatos sadios: comparação entre a face palpebral da membrana nictitante e a conjuntiva palpebral. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(11): 1199-1204.
- 44 **Villagrasa M., Cascales M.J. & Bernaez S. 2002.** Manifestaciones oculares en la leishmaniasis canina. Revisión. *Revista AVEPA*. 22(4): 279-285.
- 45 **Zanette M.F. 2006.** Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. 75 f. Araçatuba, SP. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.