

Alterações cardíacas em cães com leishmaniose visceral*

Nicolle Pereira Soares¹⁺, Alessandra Aparecida Medeiros², Antônio Vicente Mundim², Geórgia Modé Magalhães³, Marcus Vinícius Caetano Sousa⁴ e Pedro Henrique de Oliveira Viadanna⁵

ABSTRACT. Soares N.P., Medeiros A.A., Mundim A.V., Magalhães G.M., Souza M.V.C. & Viadanna P.H.O. [Cardiac abnormalities in dogs with visceral leishmaniasis.] Alterações cardíacas em cães com leishmaniose visceral. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(4):339-344, 2015. Laboratório de Patologia Animal, Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Ceará, s/n, Bloco 2T, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil. E-mail: nicolle.pereira@hotmail.com

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a chronic disease, endemic and multisystemic, plus a zoonosis. The infected dog may develop various symptoms affecting multiple systems, including the cardiovascular system. For this reason, we used 43 animals positive for leishmaniasis in order to identify the macro and microscopic alterations of the myocardium and relate them to the levels of the enzyme creatine kinase (CK) and Total CK-MB isoenzyme in serum. On macroscopic examination revealed a dilation of the cardiac chambers, thickening of the muscles of the left ventricle with narrowed lumen and thinning of the right ventricular wall with increased chamber. Histologically, the most frequent findings were coagulation necrosis, myofibrillar degeneration and myocarditis. The CK values ranged from 20 to 1236.4 U / L with an average of 263.31 U / L for CK-MB while the average was 937.34 U / L, ranging from 234.94 U / L to 5477, 83U / L, both above the levels established for the canine species. The CK analyzed together with CK-MB isoenzyme are sensitive indicators for muscle injury in humans and domestic animals. Thus, in seropositive dogs, *Leishmania* causes nonsuppurative lymphoplasmocytic myocarditis, myocardial necrosis, accompanied by an increase in the CK and CK-MB.

KEY WORDS. Creatine kinase (CK), CK-MB isoenzyme, *Leishmania* sp, cardiac lesions, myocardium.

RESUMO. A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença de caráter crônico, endêmica e multissistêmica, além de uma zoonose. O cão infectado pode desenvolver sintomatologia variada, afetando vários sistemas, inclusive o sistema car-

diovascular. Por essa razão, utilizou-se 43 animais soropositivos para *Leishmania* com o objetivo de identificar as alterações macro e microscópicas do miocárdio e relacioná-las com os níveis da enzima creatinoquinase (CK) total e a isoenzima CK-

* Recebido em 24 de junho de 2013.

Aceito para publicação em 23 de junho de 2014.

¹ Laboratório de Patologia Animal, Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Av. Ceará, s/n, Bloco 2T, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil. ⁺Autor para correspondência, E-mail: nicolle.pereira@hotmail.com

² Médico-veterinário, Laboratório de Patologia Animal, FAMEV, UFU, Av. Ceará, s/n, Bloco 2T, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902. E-mails: medeirosaavet@yahoo.com.br; amvmundim@demea.ufu.br

³ Curso de Pós-Graduação, Hospital Veterinário, Universidade de Franca (Unifran), Av. Dr. Armando Salles Oliveira, 201, Cx. Postal 82, Pq. Universitário, Franca, SP 14404-600, Brasil. E-mail: georgiamode@hotmail.com

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, FAMEV, UFU Av. Ceará, s/n, Bloco 2T, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902. E-mail: sousa.marcusviniciusmvvet@hotmail.com

⁵ Programa de Pós-Graduação em Patologia Comparada de Animais Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270. Brasil. E-mail: pedroh1986@gmail.com

-MB no soro sanguíneo. No exame macroscópico evidenciou-se dilatação das câmaras cardíacas, espessamento da musculatura do ventrículo esquerdo com estreitamento lúmem e adelgaçamento da parede ventricular direita com aumento de câmara, enquanto na microscopia, os achados mais frequentes foram necrose de coagulação, degeneração miofibrilar e miocardite. Os valores de CK variaram de 20 a 1236,4 U/L com média de 263,31 U/L enquanto para CK-MB a média foi de 937,34 U/L, variando de 234,94 U/L a 5477,83U/L, ambos, acima dos níveis estabelecidos para a espécie canina. A enzima CK analisada juntamente com a isoenzima CK-MB são indicadores sensíveis para lesão muscular nos humanos e nos animais domésticos. Assim, em cães soropositivos, a *Leishmania* provoca miocardite não supurativa, linfocitoplasmocítica, necrose de miocárdio, acompanhado pelo aumento da enzima CK e CK-MB.

PALAVRAS-CHAVE. Creatinoquinase (CK), isoenzima CK-MB, *Leishmania* sp, lesões cardíacas, miocárdio.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença de caráter crônico, endêmica e multissistêmica, além de uma zoonose. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS 2007) é uma doença grave e fatal, estando entre as seis endemias mundiais de prioridade absoluta. É causada pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania* sp e o cão doméstico é o principal hospedeiro do ciclo e também, fonte de infecção para o homem. Ao infectar-se, o animal geralmente desenvolve a leishmaniose visceral (Soares et al. 2011).

O caráter multissistêmico da doença, no cão, dificulta o diagnóstico, resultando em sintomatologia clínica diversa e dentre os sistemas afetados está o cardiovascular. Clinicamente os animais apresentam principalmente arritmias, dispneia, aumento da área cardíaca auscultável (Marques 2008). À necropsia observa-se espessamento da parede do ventrículo esquerdo e diminuição da respectiva cavidade (Font et al. 1993), aumento da câmara cardíaca direita, flacidez e adelgaçamento da musculatura caracterizando uma insuficiência cardíaca (Zabala et al. 2005).

Dentre as alterações microscópicas destacam-se miocardite não supurativa provocada por infiltração linfocitoplasmocitária (Pocai et al. 1998), infarto associado à vasculite por deposição de imunocomplexos (Luvizzoto 2000), perda das estriações transversais (Zabala et al. 2005), necrose de coagulação, necrose miofibrilar (Silva 2007, Alves

et al. 2010) e presença de amastigota no miocárdio e no pericárdio (Font et al. 1993).

Os marcadores moleculares cardíacos são utilizados no auxílio de diagnóstico clínico de animais com doenças musculares. Dentre esses marcadores, destaca-se a creatinoquinase (CK), enzima que quantifica os danos do músculo cardíaco e da musculatura esquelética (Lopes et al. 2005, Kaneko et al. 2008, Ferreira et al. 2010).

A creatinoquinase (CK) é uma molécula constituída por duas subunidades, M e B, capaz de formar as isoenzimas: CK-BB (CK1), CK-MB (CK2) e CK-MM (CK3). A CK-MB é uma isoenzima liberada para o meio extracelular quando há necrose de miocárdio, sendo um recurso importante para a detecção de lesão cardíaca (Yonezawa et al. 2009).

O objetivo do trabalho foi avaliar as alterações cardíacas macroscópicas e microscópicas e dosar a enzima CK e a isoenzima CK-MB no soro de cães soropositivos para leishmaniose visceral, visando contribuir com informações acerca desta enfermidade e subsidiar os médicos veterinários quanto ao diagnóstico da leishmaniose.

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais foram submetidos aos testes de ELISA e Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ao exame clínico no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Uberlândia e aqueles soropositivos para LVC foram eutanasiados. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal de Uberlândia (processo: CEUA-UFU 007/10).

A coleta de sangue foi realizada por punção venosa utilizando-se tubos de coleta a vácuo, estéreis e sem anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos e o soro coletado, fracionado em alíquotas e congelado a -20° C para a posterior dosagem de enzimas CK e CK-MB.

A técnica padrão de necropsia utilizada baseou-se nos procedimentos de Cabana (2008), com ênfase ao coração. Após abertura e análise do mesmo, a região de coleta do miocárdio foi padronizada e corresponde ao ápice cardíaco, na transição entre os dois ventrículos.

Foram confeccionadas lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) das amostras de coração fixados em formol 10% tamponado, segundo Tolosa et al. (2003). A avaliação semi-quantitativa das lesões encontradas no miocárdio foi feita pela descrição quanto à distribuição, natureza da lesão, presença de parasitas no tecido e quanto à severidade do infiltrado inflamatório, sendo (-) ausente, (+) discreto, (++) moderado e (+++) acentuado.

Para análise quantitativa do marcador CK utilizou-se kit comercial específico para CK total (Analisa®) de acordo com as recomendações do fabricante, em aparelho automatizado Chemwell (Awareness Technology Inc®). Utilizou-se Teste t de Student com intervalo de confiança de 95% e p<0,05 para comparação entre os grupos.

RESULTADOS

Foram analisados 43 cães soropositivos para leishmaniose visceral canina (LVC) sendo 26 fêmeas adultas e sem raça definida (60,46%) e 15 machos, adultos e sem raça definida (34,88%). Apenas dois cães (4,65%) eram filhotes sem raça definida: um macho e uma fêmea.

Em cinco animais (11,62%) não foram observadas alterações clínicas. Em 10 animais (23,25%), as arritmias foram detectadas, entre elas, apenas um (2,32%) animal apresentava taquiarritmia. As arritmias geralmente eram acompanhadas de aumento da área cardíaca auscultável. A frequência cardíaca apresentou-se alterada em cinco animais (11,62%), e o tempo de preenchimento capilar estava aumentado em nove animais (20,93%).

Na necropsia, 29 animais (67,44%) apresentaram pelo menos uma alteração cardíaca macroscópica. A mais frequente, observada em 18 animais (62,06%), foi o espessamento da parede esquerda e diminuição do lúmen ventricular (Figura 1-A). Coração globoso, com dilatação dos ventrículos direito e esquerdo, foi evidenciado em 17 animais (58,62%) (Figura

1-B), seguido do adelgaçamento do ventrículo direito com aumento da câmara cardíaca em 11 animais (37,93%) (Figura 1-C). Catorze animais (32,55%) não apresentaram alteração macroscópica cardíaca.

As principais alterações histopatológicas encontradas em 28 animais (65,11%) foram: necrose de coagulação, a mais frequente, observada em 17 animais (60,71%) (Figura 2-A), seguida de miocardite com infiltrado mononuclear, diagnosticada em 14 animais (50%) (Figura 2-B), hemorragia em 10 animais (35,71%), necrose miofibrilar em 5 animais (17,85%) e epicardite em 4 animais (14,28%) (Figura 2-C).

Na avaliação quanto à severidade do infiltrado inflamatório presente no miocárdio dos animais soropositivos para leishmaniose visceral: em 29 animais (67,44%) não foi diagnosticado infiltrado inflamatório, oito animais (18,60%) apresentaram infiltrado linfohistioplasmocitário discreto, quatro animais (9,30%) com infiltrado linfohistioplasmocitário moderado e apenas dois animais (4,65%) apresentaram miocardite severa.

A média dos valores de creatinoquinase total (CK) foi de 263,31U/L, variando de 20 a 1236,4

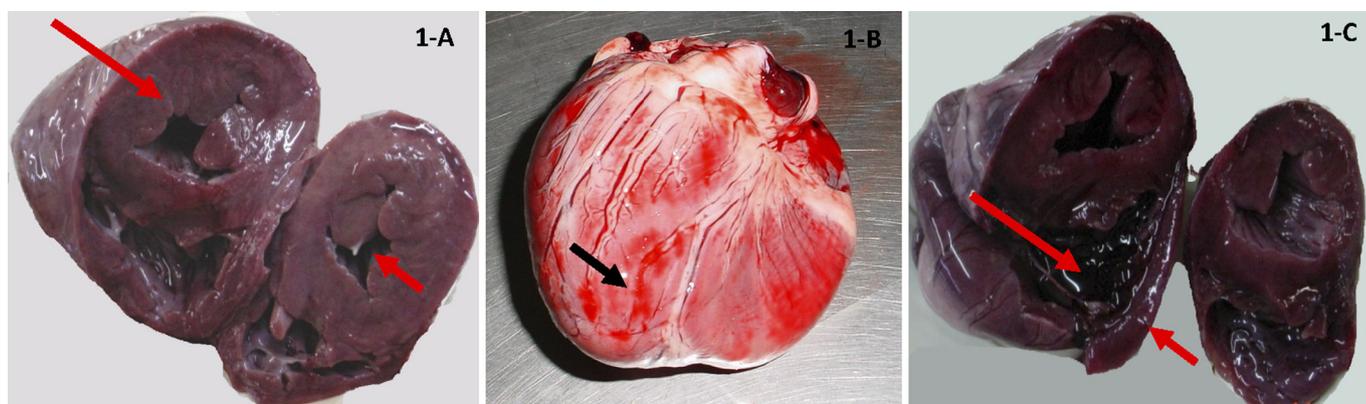


Figura 1. Em (A) coração de cão soropositivo para leishmaniose visceral, com espessamento de musculatura do ventrículo esquerdo (seta maior) e estreitamento de lúmen cardíaco (seta menor). Em (B) coração globoso de cão soropositivo para leishmaniose visceral, com presença de sufusões na musculatura (seta). Em (C) coração de cão soropositivo para leishmaniose visceral, com aumento da câmara cardíaca direita (seta maior) e adelgaçamento da parede do ventrículo direito (seta menor), Uberlândia-MG, 2009.

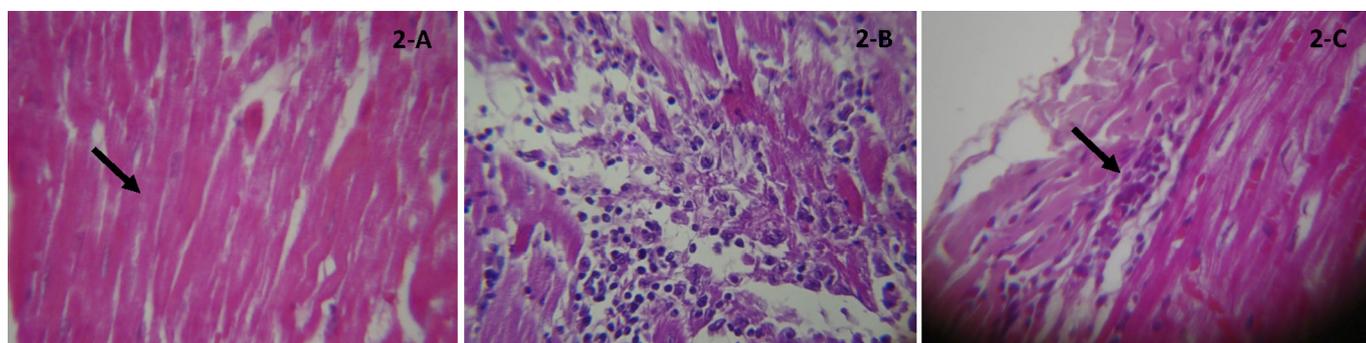


Figura 2. Em (A), fotomicrografia de corte histológico de coração apresentando fibras cardíacas anucleadas, sem estriações (seta) indicando necrose de coagulação. Corado em hematoxilina-eosina (HE), aumento de 40x. Em (B), miocardite linfoplasmocítica moderada em miocárdio, aumento de 40x, HE. Em (C), epicárdio com células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos), HE, aumento de 40x, Uberlândia-MG, 2010.

U/L. Quarenta e dois animais (97,67%) apresentaram níveis de CK acima do esperado para a espécie (1,15-28,4 U/L), e apenas um (2,32%) estava dentro da normalidade (Kaneko et al. 2008).

Quando utilizado os parâmetros de Lopes et al. (2005), 19 (44,18%) dos cães estudados neste ensaio, apresentaram níveis elevados de CK total em detrimento de 24 (55,81%) animais normais. Concomitantemente ao elevado nível de CK total, 15 animais (34,88%) apresentaram lesões histopatológicas. Houve diferença estatística significativa entre o grupo de animais com CK elevada e o grupo de animais com CK normal. Quatro animais (9,30%) apresentaram níveis aumentados para CK total, todavia, na análise microscópica do miocárdio não foi diagnosticado nenhuma lesão. Treze animais (30,23%) apresentaram lesões microscópicas, porém os valores de CK estavam normais.

O comportamento das duas enzimas difere em diversos momentos (Figura 3). Observa-se que os níveis de CK-MB aumentam acompanhando a elevação de CK total e em alguns pontos os valores de CK total apresentaram-se baixos em relação aos valores de CK-MB, que deveriam ser semelhantes ou inferiores aos níveis de CK total.

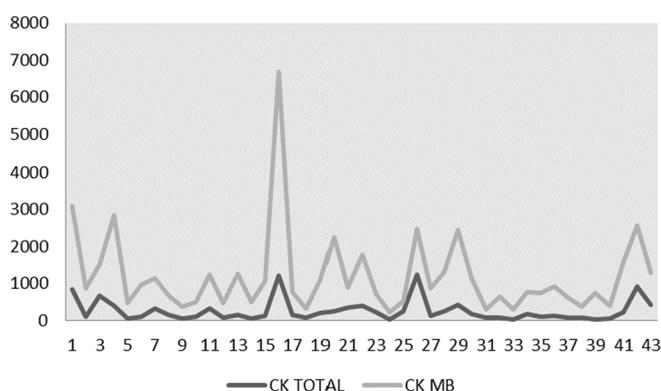


Figura 3. Distribuição dos níveis de CK total e CK-MB dosadas em U/L no soro sanguíneo dos cães soropositivos para leishmaniose visceral, Uberlândia-MG, 2010.

Quando se relaciona os níveis de CK-MB e CK total, 15 animais (34,88%) apresentaram valores elevados dessas enzimas. Estes animais apresentaram concomitantemente ao alto nível de enzimas, lesões histopatológicas como necrose de coagulação, degeneração miofibrilar, hemorragia, congestão ou miocardite. Nove cães (20,93%) apresentaram somente os valores de CK-MB elevados sem lesões histopatológicas.

DISCUSSÃO

Sinais clínicos como arritmia em associação à frequência cardíaca elevada, tempo de preenchi-

mento capilar (TPC) aumentado, depressão, apatia, fraqueza e edema pulmonar foram observados nos animais do presente estudo. Zabala et al. (2005) em relato de caso de cão filhote sem anormalidades congênitas, apático, com dificuldade respiratória, arritmia, frequência cardíaca alterado e palidez de mucosas diagnosticou insuficiência cardíaca provocada por *Leishmania* sp.

Alterações cardíacas macroscópicas mais frequentes no presente trabalho, tais como espessamento da parede do ventrículo esquerdo com estreitamento do lúmen cardíaco, coração globoso e adelgaçamento do ventrículo direito são semelhantes às relatadas por Zabala et al. (2005), em relato de caso de cão da raça boxer, com o diagnóstico de leishmaniose visceral canina. Font et al. (1993), em relato de caso de tamponamento cardíaco em um cão com leishmaniose, evidenciaram líquido na cavidade pericárdica e dilatação cardíaca.

Os achados histológicos em miocárdio de cães com leishmaniose relatados na literatura são: pericárdio infiltrado por linfócitos, plasmócitos e alguns macrófagos infectados pela *Leishmania* (Font et al. 1993); perda das estrias transversais, necrose de coagulação no músculo miocárdio, infiltração severa de linfócitos e plasmócitos no miocárdio e a presença de inúmeros amastigotas dentro de macrófagos (Zabala et al. 2005, Silva 2007); miocardite não supurativa acompanhada com pericardite (Pocai et al. 1998, Marques 2008). Alves et al. (2010) observaram em cães soropositivos assintomáticos e sintomáticos infiltrado de células mononucleares perivascular e intramuscular.

No presente trabalho os cães soropositivos apresentaram resultados semelhantes em relação à miocardite linfoplasmocitária, necrose de coagulação, perda das estriações musculares (necrose miofibrilar) e a epicardite, porém não foram encontradas formas amastigotas no interior dos macrófagos, assim como a pericardite.

Na leishmaniose visceral, a carga parasitária tecidual parece ser importante na patogênese da reação inflamatória. O parasita estimula infiltrados celulares que determinam a intensidade local da lesão. Estudos têm demonstrado que a amastigota pode estar envolvida na degradação do meio extracelular componente da matriz da pele (Melo 2005), o que possivelmente ocorre em outros tecidos, como o músculo cardíaco, contribuindo para o desenvolvimento de alterações teciduais (Alves et al. 2010).

A resposta humoral do animal infectado favorece mecanismos imunopatogênicos, causados por

autoanticorpos e complexos imunitários. Eles são produzidos pela estimulação policlonal de células B, que levam à produção exagerada de imunoglobulinas específicas ou inespecíficas (Luvizzoto 2000), associados à inflamação linfocitoplasmocitária (Marques 2008), necrose e degenerações (Silva 2007). Apesar de não observadas formas do parasita no miocárdio dos animais avaliados, os mecanismos imunes humorais envolvidos na patogênese da doença, podem ter contribuído para o processo inflamatório identificado nos animais.

Porém, Lopes et al. (2005) utilizando 40 cães clinicamente saudáveis no Brasil, sem raça definida, de diversas idades, machos e fêmeas, indicam outra faixa de normalidade para CK total em cães, variando entre 24 e 170 U/L.

A média da dosagem da isoenzima CK-MB foi de 937,34 U/L, variando de 234,94 U/L a 5477,83U/L. Segundo Yonezawa et al. (2009) esses níveis são extremamente elevados em relação à referência para cães: 4 a 13% da atividade de CK total. 100% dos cães soropositivos para LVC deste trabalho apresentaram valores elevados para a isoenzima.

Apesar de CK quantificar principalmente danos de musculatura esquelética e cardíaca, ela pode detectar lesões de tecido nervoso, renal (bexiga e rins) e infecções no sistema gastrointestinal (Ferreira et al. 2010). Além disso, em casos de hipóxia e necroses musculares e rompimento de membrana plasmática as enzimas são liberadas para a corrente sanguínea, aumentando consideravelmente sua concentração plasmática (McGavin 2007, Ferreira et al. 2010). A determinação da CK também pode ser influenciada por hemólise e a hiperbilirrubinemia resultando em falsos aumentos da enzima (Yonezawa et al. 2009).

Devido à meia vida da molécula variar de 30 a 90 dias (Kaneko et al. 2008), alguns animais apresentaram alterações microscópicas sem alteração na dosagem da enzima CK.

A CK-MB não é um marcador específico de danos no músculo do miocárdio confiável para cães (González 2008, Yonezawa et al. 2009) por representar uma pequena percentagem da atividade da enzima CK total (Yonezawa et al. 2009) e apresentar uma meia vida curta de 48 horas aproximadamente (González 2008).

Todavia Lopes et al. (2005), Melo et al. (2008) e Ferreira et al. (2010), descrevem que a isoenzima CK-MB pode ser considerada um marcador de lesão miocárdica, desde que a enzima não seja avaliada de forma isolada, ou seja, a porcentagem de CK-MB em relação ao valor total de CK, fornece

um dado mais confiável quando se avalia uma possível lesão muscular.

Quando se observa o aumento de CK-MB não acompanhado de aumento da molécula CK total, a porcentagem da isoenzima fica elevada, concomitante às alterações microscópicas identificadas, comprova-se lesão no músculo cardíaco (Melo et al. 2008, Ferreira et al. 2010). Entretanto o comportamento de tendência à elevação da CK-MB dos animais sem alterações histológicas, não pode estar relacionado diretamente a tal comprometimento do miocárdio (Ferreira et al. 2010), uma vez que, dentre outros motivos, a CK-MB também é encontrada, em menor quantidade, em outros tecidos como renal e gastrointestinal (Yonezawa et al. 2009).

CONCLUSÃO

Cães naturalmente infectados por *Leishmania* podem apresentar miocardite e desenvolver cardiomiopatias, juntamente com aumento das enzimas CK e isoenzima CK MB.

REFERÊNCIAS

- 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*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, 43:310-315, 2010.
- 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 (ecmo) durante um período de três horas. *Ciênc. Anim. Bras.*, Goiânia, 11:705-712, 2010.
- Font A., Durrall N., Domingo M., Closa J.M., Mascort J. & Ferrer L. Cardiac tamponade in a dog with Visceral Leishmaniasis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, Barcelona, 29:95-100, 1993.
- González F.H.D. & Scheffer J.F. Enzimologia em clínica veterinária. 2008. Disponível em < http://www.ufrgs.br/lacvet/outras_publicacoes.php?id_publicacao=73 >. Acesso em: 07. Nov, 2010.
- Griensven J.V. & Diro E. Visceral Leishmaniasis. *Infectious disease clinics of North America*. Amsterdam, 26:309-322, 2012.
- Labat E., Carreira J.T., Matsukuma B.H., Martins M.T.A., Lima V.M.F., Bomfim S.R.M., Perri S.H.V. & Koivisto M.B. Qualidade espermática de semen naturalmente infectados por *Leishmania* sp. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, 62:609-614, 2010.
- Lopes S.T.A., Franciscato C., Teixeira L.V., Oliveira T.G.M., Garmatz B.C., Medeiros A.P. & Mazzanti V.A. Determinação da creatina quinase em cães. *Revista da FZVA, Uruguaiana*, 12:116-122, 2005.
- Luvizzoto M.C., Feitosa M.M., Ikeda F.A. & Perri S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba. *Clín. Vet.*, São Paulo, 5:36-44, 2000.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6ª ed. Academic Press, San Diego, California, 2008. 916p.
- Marques M.I.L.M. *Leishmania Canina*. Dissertação, Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008. 131p. (Disponível em: <<https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/950>>)
- Melo F.A. Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados. Tese, Doutorado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2005. 75p. (Disponível em: < <http://www.tede.ufv.br/te>

- desimplificado/tde_arquivos/8/TDE-2007-01-17T143008Z-240/Publico/texto%20completo.pdf>)
- Melo M.M., Verçosa Júnior 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, 60:631-640, 2008.
- McGavin M.D. & Zachary J.F. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4th ed. Elsevier, St. Louis, 2007. 1476p.
- Pocai E.A., Frozza L., Headley S.A. & Graça D.L. Visceral Leishmaniasis (kala-azar). Five cases in dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul, South Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 28:501-505, 1998.
- Silva F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Ambientais*, Chapadinha, 1:20, 2007.
- Soares M.R.A., Mendonça I.L., Bonfim J.M., Rodrigues J.A., Werneck G.L. & Costa C.H.N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica*, Miami, 117:6-9, 2011.
- Tolosa E.M.C., Rodrigues C.J., Behmer O.A. & Freitas Neto A.G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2^a ed. Editora Manole, Brueri, 2003. 331p.
- WHO. Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection Addis Ababa, Ethiopia, 20-22 March 2007 World Health Organization 2007.
- Yonezawa L.A., Silveira V.F., Machado L.P. & Kohayagawa A. Marcadores cardíacos na medicina veterinária. *Ciência Rural*, Santa Maria, 40:222-230, 2010.
- Zabala E.E., Ramízes O.J. & Bermúdez V. Leishmaniasis Visceral en un canino. *Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, Maracay, 46:43- 50.