



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

FABIO ZACHEU CONTI
GUILHERME AUGUSTO ALVES NASCIMENTO

USO DE MODELO PREDITIVO EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA UNIDADE DE VIGILÂNCIA EM
ZOONOSES DO DISTRITO FEDERAL - DF

BRASÍLIA

2022



FABIO ZACHEU CONTI

GUILHERME AUGUSTO ALVES NASCIMENTO

**USO DE MODELO PREDITIVO EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA UNIDADE DE VIGILÂNCIA EM
ZONOSSES DO DISTRITO FEDERAL - DF**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Lucas Edel Donato

BRASÍLIA

2022

AGRADECIMENTOS

Esse projeto foi de grande aprendizado, com dificuldades apresentadas a cada novo momento e contornados com condizente resiliência de quem trabalha com as variáveis da ciência. Foi agregador na trajetória acadêmica e somos gratos a todos que de alguma forma compartilharam deste momento conosco.

Agradecemos inicialmente e merecidamente ao professor e orientador Lucas, nosso mentor nos momentos de dificuldade, e esclarecedor na forma de ensinar, nossa admiração e respeito vem desde as primeiras matérias de doenças infecciosas e parasitárias ministradas por ele e continua diante da parceria celebrada no desenvolver do curso. Seu empenho na condução firme de nosso trabalho, com compreensão e credibilidade em nosso potencial. Essa pesquisa inclusive foi despertada na segunda aula que tivemos contigo, sobre a doença no qual demonstra imenso conhecimento a leishmaniose visceral canina (LVC), quando ao falar sobre a onicogribose levantou nestes pesquisadores a ensejo de descobrir sobre os caminhos das patogenias que levavam aos sinais clínicos. Nossos sinceros agradecimentos, Lucas Edel Donato.

À nossas famílias, pais, mães, irmãos e parentes, que sempre demonstraram apoio incondicional, por serem alicerce na construção de todas etapas. Obrigado por todos os suportes e incentivo doados.

Eu, Fabio Zacheu Conti, agradeço especialmente a minha esposa Ludmilla Pereira de Souza Conti que, mesmo diante de todas as dificuldades que as condições da vida nos permeiam, esteve a meu lado com todo seu apoio ao meu desenvolvimento, reestruturação profissional e realização de um sonho, e também por nossos filhos, Matheus, Camilla e Eduarda que me motivam a continuar sempre. A meu companheiro de pesquisa Guilherme por enfrentar as adversidades apresentadas junto comigo. A meu amigo Lucas Costa de Faria, que me iniciou nas atividades de pesquisa e foi fundamental em todos os momentos e processos.

Gostaríamos de agradecer a todos os funcionários da unidade de Zoonoses da Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde do Distrito Federal, representados na figura dos médicos veterinários Dr. Lauricio Monteiro Cruz e Dr. Isaias Silva Chianca. A motivação de vocês em trabalhar em prol da medicina veterinária e pelo esforço colaborativo

multidisciplinar da saúde única, garantindo a busca da excelência na saúde conjunta de seres humanos, animais e meio ambiente.

Agradecemos imensamente a todos os colaboradores do Labocien do Ceub e de toda a instituição pelo compartilhamento e cooperação no desenvolvimento desta oportunidade de crescimento na graduação de nossas futuras profissões. A todos os funcionários na Assessoria de Pesquisa e Extensão que de forma profissional e humana colaboraram para que chegássemos até a elaboração deste relatório final.

Aqueles que não tiveram seus nomes citados, mas direta ou indiretamente acrescentaram a esta pesquisa, gratidão.

RESUMO

O Brasil posiciona-se como o maior notificador de casos humanos infectados por *Leishmania spp.* nas Américas. A leishmaniose visceral canina (LVC) permanece um desafio constante na rotina de médicos veterinários, pela sintomatologia diversificada e complexa, sendo seu diagnóstico instigante aos profissionais de saúde. As metodologias disponíveis na identificação da infecção em cães são geralmente associações entre observação de sinais clínicos, testes imunocromatográficos, imunoenzimáticos e parasitológicos. Obter uma identificação ágil pode definir o prognóstico dos animais e atuação no controle zoonótico, para tal torna-se importante a construção de modelos de predição baseados em exames oportunos e viáveis em toda a disposição territorial do país, inclusive nas áreas mais remotas. Alguns sintomas são frequentes na rotina clínica, porém os diagnósticos diferenciais são numerosos. Alterações hepáticas e renais apresentam-se com o curso sistêmico da doença, e dependem de análises laboratoriais para sua determinação. Emagrecimento/caquexia, lesões ulcerativas, descamações, atrofia muscular, dermatites e onicogrifoses são sintomas frequentes. Em modelos preditivos são dispostos escores a cada sintoma, com verificação de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos, gerados a partir de estatística da razão de chances entre a associação dos fatores examinados. Essa técnica pode incluir ainda critérios laboratoriais como resultados de testes rápidos, hematológicos e bioquímicos. O entendimento destes exames auxiliam ainda na patogenia da doença, falhas de sistemas ou órgãos, sintomas e modificação em elementos basais. A onicogribose é citada em 40% a 63% dos animais sintomáticos, porém sua definição comum é de crescimento exagerado das garras. No entanto, além do avanço superior a 1,9mm por semana, a curvatura demonstrou-se fator relevante em sua identificação. A comparação com o desenvolvimento deste fenômeno em humanos, trouxe o questionamento da interferência de concentrações séricas de cálcio e ferro. Outros achados com relações importantes ao progresso anormal das garras são descamações e ulcerações dérmicas. As técnicas de previsibilidade da doença verificadas apresentaram respostas práticas aos resultados esperados das amostras analisadas, indicando, porém, a necessidade de introdução de novas variáveis com compreensão avançada. Este trabalho considerou bastante significativo os conhecimentos produzidos, e estimula o desenvolvimento de novos estudos na construção de novos modelos.

Palavras-chave: leishmaniose visceral canina; sintomatologia; onicogribose; diagnóstico; modelo preditivo;

LISTAS DE FIGURAS, TABELAS, QUADROS, GRÁFICOS, SÍMBOLOS E ABREVIações

Tabela 1. Valores e parâmetros das quantidades de reagentes, padrões dos reagentes e amostra de soro de cada animal para formação da solução de leitura em espectrofotômetro na leitura de absorbância indicada pelo fabricante32

Figura 1 - a) descamação furfurácea generalizada; b) alopecia periocular e ceratoconjuntivite; c) distúrbio de queratinização em borda de orelha; d) onicogribose; e) atrofia muscular; f) alopecia periocular, descamação, vasculite e atrofias em ponta de orelha g) ulceração grave e distúrbio de queratinização(orelha), alopecia periocular, blefarite com ceratoconjuntivite seca; h) alopecia generalizada33

Tabela 2. Resultados obtidos e avaliados conforme modelo preditivo de Gouvêa (2011) ..34

Tabela 3. Resultados obtidos e avaliados conforme modelo preditivo de Lima Júnior (2012).....34

Tabela 4. Resultados de exames hematológicos e bioquímicos das amostras coletadas.....35

Figura 2. a) Secção mediana sagital do terceiro dígito torácico de cão com leishmaniose visceral. (1) Tendão do músculo flexor profundo dos dedos, (2) Parte da falange média do terceiro dígito, (3) Tendão do músculo extensor profundo dos dedos, (4) Epiderme/derme dorsal, (5) Matriz ungueal dorsal, (6) Parede da unha, (7) Parte da falange distal do terceiro dígito, (8) Matriz ungueal ventral, (9) Epiderme/derme ventral (coxim digital) - (BERTOLLO, 2017);
b) Estrutura da garra canina.....37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
3.1. Diagnóstico e Sintomatologia	11
3.2. Alterações Hematológicas e Bioquímicas	12
3.3. Modelo Preditivo	14
3.4. Onicogribose	20
4. MÉTODO	26
4.1. Tipificação	26
4.2. Caracterização do local de pesquisa	26
4.3. Objeto de estudo	27
4.4. Delimitação e universo da amostra	27
4.5. Instrumentos de coleta ou de geração de dados	27
4.6. Procedimentos metodológicos	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
7. REFERÊNCIAS	40
APÊNDICES	47

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma notória zoonose cosmopolita, ocorre tanto em seres humanos como em animais (LIMA, 2018). Causada pelo protozoário intracelular *Leishmania infantum*, esta enfermidade foi descrita pela primeira vez, em crianças na Tunísia, pelo bacteriologista francês Charles Jules Henry Nicolle em 1908. No mesmo ano, juntamente com Charles Comte, ele também encontrou o parasito em cães, sendo relatado como um importante reservatório para o seu ciclo zoonótico (SAITO *et al.*, 2008; STEVERDING, 2017).

As leishmanioses possuem distribuição mundial e são transmitidas tanto entre animais quanto seres humanos (SCHIMMING; SILVA, 2012). Frehse (2008) já demonstrava preocupação com o crescente número de casos da afecção causada pelo protozoário *Leishmania spp.* no Brasil, tanto em humanos, como em caninos em áreas endêmicas. Atualmente a forma mais grave entre as leishmanioses, é a visceral, visto que é uma enfermidade crônica e sistêmica. Além disso, cerca de 90% dos casos da América Latina, são registrados no Brasil (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2014) (BERTOLO, 2017).

A transmissão do parasito da LVC é realizada por insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, sendo a principal disseminadora do protozoário *Leishmania infantum* a fêmea deste flebotomíneo (OLIVEIRA, 2018). Ademais, outras espécies do *Lutzomyia* também são responsáveis pela disseminação do protozoário, como o *L. cruzi*, que está presente principalmente no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (GONÇALVES, 2014; TANURE, 2017).

No período de 2001 – 2017, foram registrados 59.769 novos casos na América do Sul, e que apenas em 2017 foram notificados 4.239 casos de LV, e nesse cenário, o protozoário causador dessa enfermidade, é um problema de saúde pública, principalmente em áreas endêmicas (BRASIL, 2019; STEVERDING, 2017).

O principal agente transmissor da leishmaniose visceral no Brasil, em meios urbanos e rurais, é o flebotomíneo conhecido popularmente como mosquito palha (BERTOLO, 2017). Trata-se de inseto pequeno, cuja reprodução se adapta bem em locais onde há abundância de matéria orgânica em decomposição (SCHIMMING; SILVA, 2012). A transmissão do parasito ocorre mediante o repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas do *L. longipalpis*, em animais vertebrados.(GONÇALVES, 2014).

O diagnóstico da LVC é considerado complexo, com isso se faz necessário a utilização de uma combinação de técnicas diagnósticas para aumentar a acurácia (SILVA, 2007). A avaliação bioquímica é relevante no quesito de acompanhamento dos estágios clínicos da doença (GARCÍA REYES, 2013). Além disso, o conhecimento do comportamento dos marcadores bioquímicos nos casos de LVC, pode facilitar o diagnóstico e o entendimento das alterações causadas pela doença (GODOY et al., 2017).

Além dos exames bioquímicos, os dados hematológicos fornecem importantes subsídios para a avaliação do estado clínico e do prognóstico de evolução da doença (SILVA, 2007). Vale a pena ressaltar que, no hemograma, as principais alterações laboratoriais encontradas em cães infectados/doentes pela doença são a anemia, a redução da quantidade de eritrócitos e de plaquetas no sangue (COSTA et al., 2021).

A possibilidade de mensuração categorizada de fatores, na classificação de pacientes, ostenta caráter de predição ao prognóstico destes, e na definição da terapêutica a ser utilizada, principalmente nos grupos onde as terapias alvo são mais específicas (HORTA et al., 2012).

Esse trabalho visou relacionar os achados hematológicos e bioquímicos e suas associações à onicogribose e outros achados clínicos, como fatores preditivos em cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral. Para tanto, foi selecionado o departamento de controle de zoonose para identificação dos dados, em virtude dos animais já terem diagnóstico positivo, confirmado, para Leishmaniose Visceral Canina (LVC).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a aplicabilidade de modelos preditivos contrastando com achados clínicos e exames complementares em cães diagnosticados com leishmaniose visceral canina da Unidade de Vigilância de Zoonoses do Distrito Federal - DF.

2.2. Objetivos Específicos

- descrever achados das alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas em animais naturalmente infectados com LVC;
- indicar associação entre achados clínicos e os resultados de hemograma e bioquímicos para comparar com fatores preditivos;
- estimar associação entre a onicogribose com alterações bioquímicas e hematológicas para auxiliar na caracterização deste sinal clínico;
- avaliar associação de variáveis preditivas ao gênero de animais infectados.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A interdisciplinaridade multisetorial é um atributo exemplificador proposto pelo conceito *One Health*, com a integração contínua entre ser humano, animais e meio ambiente. Alguns objetivos devem fazer parte do plano da saúde única, como prevenção, controle, monitoramento e tratamento da leishmaniose canina. Como uma proposta de avanço que modernize a visão dicotômica da situação do cão, onde o mesmo é visto simplesmente como vítima-reservatório, surge a discussão de inclusão de um nova condição de sentinela aos animais, visto que os eventos em animais antecedem as ocorrências em humanos em incidência, prevalência, contágio e proliferação. Demonstrando, portanto, a proposição deste contexto reservatório-vítima-sentinela (LEAL-LIMA et al., 2021).

A leishmaniose tem grande impacto na saúde pública tanto na forma visceral, com alta incidência e letalidade, quanto nas cutânea e mucosa, com a presença de feridas na pele e desfiguração facial e incidência muito mais alta comparativamente (HERWALDT, 1999; SCHIMMING; SILVA, 2012). Nas Américas, de 2001-2017, foram notificados um total de 940.396 novos casos de leishmaniose cutânea e mucosa com uma média de 55.317 casos por ano (BRASIL, 2019).

3.1. Diagnóstico e Sintomatologia

Esta patologia demonstrou-se nos últimos anos como problema relevante de saúde pública em nosso país, e que devido sua subestimação de incidência diagnóstica, tornou o Brasil uma das poucas nações a tornar a Leishmaniose como doença de notificação compulsória (RIBEIRO et al., 2019).

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina é dificultado pela variedade de sintomas que se tornam inespecíficos. Além disso, outro fator que contribui para essa dificuldade, são as formas diferentes como os animais infectados se apresentam - assintomática, sintomática e oligossintomática (GARCÍA REYES, 2013). A infecção sintomática está relacionada a produção de anticorpos e imunorregulação negativa da resposta celular com decrescente produção de interleucina-2, interferon- γ e fator de necrose tumoral α (SOARES et al., 2014).

Os sinais clínicos podem ser resultantes de danos causados pela ação direta do parasito nos tecidos, ocasionando lesões inflamatórias não supurativas na pele, fígado, intestinos, rins, olhos, ossos e outros (DIAS, 2008).

Dentro da sintomatologia clínica, a linfadenomegalia, hiporexia, onicogribose, emagrecimento progressivo, alterações hepáticas, alterações renais, lesões ulcerativas, atrofia da musculatura, são as mais comuns apresentados pelo animais infectados na sua forma sintomática (GARCÍA REYES, 2013). Ademais, as alterações dermatológicas são comumente encontradas em cães com leishmaniose, se destacando a dermatite com descamação, habitualmente encontrada na cabeça, orelhas e extremidades, podendo atingir outras partes do corpo (COSTA *et al.*, 2021).

Observar as alterações clínicas comumente encontradas, como hiperqueratoses, alopecias, despigmentações, paroníquias e as dermatites esfoliativa, ulcerativa, nodular ou postular. A onicogribose também é frequentemente verificada nas alterações dermatológicas, que podem conter ainda piodermite bacteriana secundária (MAIA, 2013)

A gravidade dos sinais clínicos da leishmaniose visceral canina pode influenciar no poder de predição dos testes diagnósticos (LIMA JÚNIOR, 2012). Com isso o diagnóstico, puramente clínico, se torna impossível levando em conta os quadros assintomáticos e os sinais clínicos inespecíficos que podem ser facilmente confundidos com outras doenças (SILVA, 2007).

3.2. Alterações Hematológicas e Bioquímicas

Testes como bioquímica, hemograma (PAYANO, 2018), avaliação de funções hepática e renal, mensuração eletrolítica e proporção albumina:globulina são alguns dos exames complementares que ao serem solicitados, associados à sintomatologia clínica, possibilitam um apoio na antecipação diagnóstica da Leishmaniose Visceral em cães (LIMA et al, 2013).

Alteração hematológica frequentemente observada, a anemia normocítica normocrômica, correspondente a diminuição dos números de hemácias, hemoglobina e do volume glomerular com manutenção referencial dos índices da hematimetria, como a concentração da hemoglobina corpuscular média e volume corpuscular médio (CUNHA,

2019). Esta variação de declínio no percentual de hematócrito, hemoglobinas e hemácias durante o eritrograma pode ser observado tanto em cães sintomáticos quanto nos assintomáticos naturalmente infectados para Leishmaniose Visceral Canina (DIAS, 2008).

O desenvolvimento do quadro crônico associado a doença, apresenta importância na variação patogênica dos achados, podendo variar conforme o desenvolvimento sistêmico no organismo do animal. A anemia por resposta inflamatória é o motivo mais significativo, porém outras situações também podem gerar a condição anêmica, como hemólise, hemorragia, supressão da medula óssea e problemas na sintetização de eritropoietina por insuficiência renal (MELENDEZ-LAZO et al., 2018; CUNHA, 2019).

Observa-se também trombocitopenia, linfopenia ou leucocitose que estão associadas a redução de leucócitos no sangue (LIMA et al., 2013). A frequência de linfopenia decorre da eliminação dos linfócitos pelo protozoário e pela retenção temporária destes nos linfonodos e baço, ocasionando por compensação a monocitose (WINCK; SILVA, 2018), típico também em condições crônicas de processos inflamatórios (BRAZ, 2015).

Valores leucocitários tendem a permanecer dentro das referências como tendência da cronicidade da patologia. Mas alterações nos padrões deste parâmetro podem variar conforme a condição imunológica do animal, associações secundárias de cenários infecciosos e parasitários, e ainda gravidade e intensidade de sinais clínicos (BRAZ, 2015). Observa-se presença de “leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda, quando há infecção bacteriana secundária” (WINCK; SILVA, 2018, v. 16, p. 6).

Vasculites ocasionadas por deposição de imunocomplexos na circulação sanguínea, destruição de plaquetas ou apresentação de anticorpos contra estas células, tal como distúrbios na produção destas, ocasionam em trombocitopenia (BRAZ, 2015; WINCK, SILVA, 2018).

As alterações bioquímicas visualizadas no desenvolvimento da Leishmaniose compreendem duplicação ou aumento de até três vezes os valores de aminotransferases, acréscimo dos níveis de bilirrubina, além de pequenas elevações séricas de ureia e creatinina, que concentradas modificam a capacidade funcional renal (ESCOBAR, 2019).

Com a progressão da doença, é possível identificar alterações protéicas na forma de hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (LIMA et al., 2013; PAYANO, 2018; ESCOBAR, 2019), com maior expressão em animais sintomáticos (DIAS, 2008). A hiperproteinemia pode ser observada em casos de leishmaniose devido à elevada produção de anticorpos (MONTARGIL et al., 2018), como consequência da ativação de linfócitos B, sendo considerada o segundo achado mais frequente por vezes (BRAZ, 2015).

A apresentação de valores bioquímicos renais e hepáticos também estão sendo relacionados a evolução da enfermidade, assim como a redução na proporção entre albumina e globulina (ESCOBAR, 2019) alcançando relação de inversão entre as proteínas (COSTA et al., 2020).

3.3. Modelo Preditivo

A patogenia da LV é multifatorial, envolvendo parasito e hospedeiro na condição imunológica e nutricional do animal parasitado (FREHSE, 2008). Os sinais clínicos, observados em cães, estão relacionados à prevalência de resposta imune Th2, humoral, sustentada por interleucina (IL) 4 e 10, atuando em órgãos linfóides com diminuição das células T. Nesse cenário, os sinais clínicos mais habituais nos animais infectados são linfadenomegalia, hiporexia, onicogribose, emagrecimento progressivo, dermatopatias oftalmopatias, entre outros (GARCÍA REYES, 2013).

A severidade dos sinais clínicos da leishmaniose visceral canina pode influenciar no poder de predição dos testes diagnósticos (LIMA JÚNIOR, 2012). Portanto, o diagnóstico, puramente clínico, se torna impossível levando em conta os quadros assintomáticos e os sinais clínicos inespecíficos que podem ser facilmente confundidos com outras doenças (SILVA, 2007).

De acordo com a ONG Brasileish (2018) que zela pela proteção a saúde animal e humana, e pelo desenvolvimento de condutas diagnósticas, preventivas e terapêuticas de animais afetados pela leishmaniose no Brasil e países vizinhos, podemos classificar os cães como não infectados sadios, expostos, infectados sadios e infectados doentes. Essa categorização é determinada conforme avaliação de presença de sinais clínicos, alterações laboratoriais, sorologia e diagnóstico conclusivo da doença.

A classificação dos animais pela Leishvet (2022) em quatro estádios expressa processo de associação de resultados sorológicos, exames laboratoriais e sinais clínicos que instituem o prognóstico e definem uma proposta de tratamento. No estágio I se observam sinais clínicos leves, perfil renal normal e baixa atividade imunológica, o que dificulta sua identificação por teste sorológico. No segundo estágio, somam-se aos sinais clínicos anteriores, algumas lesões na pele, onicogribose, anorexia, perda de peso, dermatite e epistaxe, com alteração na função renal verificada em concentrações proteicas e anemia arregenerativa encontrada em exame laboratorial. Os graus severos da doença começam a aparecer no terceiro estágio, quando além dos sinais clínicos dos estádio anteriores, podemos observar vasculite, uveíte, glomerulonefrite e artrite, com manutenção de resultados laboratoriais parecidos ao estágio II e necessidade de apoio terapêutico aos rins. O estágio IV é o mais severo da doença, com prognóstico desfavorável, por conta da propagação sistêmica e sinais clínicos acrescentados de tromboembolia pulmonar, síndrome nefrótica ou doença renal em estágio final (REBELO, 2021).

Anteriormente à apresentação do contexto de estadiamento, a classificação dos cães era baseada na ausência de sintomas, assintomáticos, ou presença de sinais clínicos, oligossintomáticos até 3 sintomas ou sintomáticos se apresentassem 4 manifestações ou mais. Como não apreciava alterações de órgãos internos, havia restrição de seu alcance. Com a classificação por estágios, é possível identificar além do diagnóstico, o prognóstico do animal, discutido sobre sorologia quantitativa, resultados de exames hematológicos e bioquímicos, magnitude de lesões, condição renal e sinais clínicos observados (SILVA et al., 2021)

O diagnóstico da leishmaniose em cães instiga os órgãos brasileiros responsáveis pelo controle epidemiológico de zoonoses, pois envolve condição sintomatológica do animal, exames laboratoriais diretos e indiretos (SILVA, 2015).

Pela inespecificidade e variabilidade dos sinais apresentados, a determinação de diagnóstico pela análise clínica da LVC apresenta certo grau de complexidade, principalmente devido a amplitude dos diagnósticos diferenciais apresentáveis. Com o objetivo de ampliar a especificidade na investigação por sinais clínicos, o emprego de padronizações no apontamento dos sintomas pela expressividade e regularidade de sinais característico através de um sistema de escores, têm sido empregado em alguns estudos (SOLCÀ, 2017)

A utilização de modelos preditivos pela descrição de marcadores clínicos e laboratoriais têm potencial de contribuição para auxiliar e ampliar estratégias de controle da leishmaniose, a partir de sua validação. Existe, portanto, a necessidade de examinar sua sensibilidade e especificidade dos parâmetros e fatores utilizados nestas representações (GOUVÊA, 2011).

O trabalho de (GOUVÊA, 2011) apresenta os principais fatores preditivos relacionados aos quadros observados na LV. A alopecia periocular, que é a perda de pelos na região dos olhos do animal, é um dos sinais clínicos observados em animais sintomáticos. A perda de peso, também chamada de caquexia, é apresentada tanto em animais sintomáticos como os oligossintomáticos, onde ocorre perda de massa muscular que pode ocorrer pela diminuição de atividades físicas (AYELE; SEYOUM, 2016). Ocorrem também diversos tipos de lesões, nas regiões do lábio, focinho e orelha, que geralmente são secundárias, sendo uma das principais características dessa doença sistêmica (AYELE; SEYOUM, 2016) (FABRETTI et al., 2018). Os sinais tegumentares mais comuns em cães com a *L. infantum* são úlceras e crostas (ANDRADE et al., 2018).

E finalmente, os linfonodos também são locais de lesão, local em que já foram encontrados as fases amastigotas da doença, por ter uma característica de linfoplasmohistiocitária e linfadenomegalia generalizada. (FABRETTI et al., 2018). Um ponto de notória observação é em relação às mucosas, é que no início da sintomatologia o animal pode apresentar palidez de mucosas, tendo em vista que elas podem estar normo ou hipocoradas, hiperêmicas ou ictéricas, dependendo do estado da evolução e desenvolvimento da doença (FABRETTI et al., 2018) (LIMA JÚNIOR; JUNIOR, 2012).

Por ser uma doença de curso crônico, que habitualmente ocasiona morte por insuficiência renal ou hepática, com ocorrências de sinais clínicos variáveis, a predição por reconhecimento de sinais clínicos mediante sua regularidade aponta relação entre sintomas e carga parasitária, possibilitando a capacidade de infecção dos vetores. Como aproximadamente metade dos cães infectados demonstram sinais clínicos, o emprego de fatores clínicos para predição da infecção em regiões endêmicas contribuiria satisfatoriamente para a identificação de animais com qualificação para essa propagação, impactando substancialmente no controle da doença (LIMA JÚNIOR, 2012).

Dos Santos Gazzinelli (2022), apresentou que, em áreas endêmicas, cerca de 40% a 50% dos cães infectados permanecem assintomáticos, e que os animais oligossintomáticos e sintomáticos apresentam maior capacidade de transmissão. Figueiredo et al. (2014) estabeleceu que cães infectados com sintomatologia clínica compatível têm a possibilidade de exprimir resultados positivos, em testes sorológicos, aumentada em 3 vezes quando comparado aos assintomáticos.

Gouvêa (2011) constatou que um modelo de predição respaldado em critérios clínicos e sorológicos demonstra ser uma excelente ferramenta na análise da infecção dos cães pela leishmaniose visceral, e promove diligência na redução do nível transmissivo ao moderar o ciclo através da intervenção junto ao cão. A combinação das duas medidas apresentou sensibilidade de 82,4%, especificidade de 81,6%, valor preditivo positivo (VPP) de 73,4% e valor preditivo negativo (VPN) de 88,2%, alcançando uma acurácia total de 81,9%. Quando levado em consideração apenas o modelo clínico, resultou em sensibilidade de 75,3%, especificidade de 66%, VPP de 63,3% e VPN de 77,5%.

Para validar um teste diagnóstico deve-se considerar alguns critérios, característicos ao teste e interação da doença com a população. A comparação de sua performance com um teste referencial, por meio dos indicadores de sensibilidade, especificidade e eficiência, atestam sua validade intrínseca. Para legitimar sua validação extrínseca é necessário atestar a prevalência da patologia no grupo de indivíduos, utilizando-se da reprodutibilidade, acurácia e precisão, como fatores que certificam o teste, através de seu desempenho, para identificação da existência da doença no ambiente populacional analisado (FERREIRA, 2013).

A avaliação clínica em modelo preditivo específico apresenta sensibilidade aproximada ao teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), servindo como exame de triagem ao veterinário que atua em ambiente externo à clínica, ou possui dificuldade de acesso a testes sorológicos. Sua utilidade é reforçada pela probabilidade elevada de cães sem a presença dos sinais clínicos, escolhidos na confecção do modelo clínico de Gouvêa (2011), apresentarem resultado negativo para leishmaniose visceral nos testes citados.

Com a prevalência estabelecida podemos definir os valores preditivos de seus resultados, podendo ser estes positivos ou negativos. O valor preditivo negativo define a

proporção de animais não doentes no grupo de indivíduos que apresentaram resultado negativo no teste. Enquanto que o valor preditivo positivo demonstra a probabilidade da existência da enfermidade dentre as confirmações apuradas no teste. Ou seja, valor preditivo positivo é igual a resultados positivos de animais doentes dividido pela soma dos resultados positivos do teste entre animais doentes e falsos positivos, animais não doentes (FERREIRA, 2013).

A relevância dos modelos clínicos de diagnósticos por fatores preditivos nas ciências da saúde, e na identificação da LVC, é proficiente uma vez que possibilita ao profissional uma atuação protocolar, entre observações, condutas e exames adicionais que auxiliem no diagnóstico precoce da doença (LIMA JÚNIOR, 2012).

A falta de acurácia dos testes, somada a presença de sintomas diversos, aumentam a conveniência deste tipo de metodologia (GOUVÊA, 2011) com aplicação de pontuações sobre as variáveis, caracterizando-os em seus valores totais e sobre sinais estatisticamente discrepantes (SILVA, K. et al., 2017).

A gravidade dos sinais clínicos da LVC pode influenciar no poder de predição diante os testes diagnósticos (LIMA JÚNIOR, 2012). Com isso o diagnóstico, puramente clínico, se torna impossível levando em conta os quadros assintomáticos e os sinais clínicos inespecíficos que podem ser facilmente confundidos com outras doenças (SILVA, 2007).

Teixeira (2019), relata estudo que demonstra sensibilidade de 82,1%, pelo teste imunocromatográfico TR-DPP, em animais confirmados através de avaliação imuno-histoquímica de amostras de pele e que apresentavam ou não os sintomas. Em outro trabalho com cães sintomáticos, confirmados por identificação parasitológica de aspirado de medula óssea e não reagentes em outros exames sorológicos, a sensibilidade do teste TR-DPP chegou a 98%.

O diagnóstico de leishmaniose em cães instiga os órgãos brasileiros responsáveis pelo controle epidemiológico de zoonoses, pois envolve condição sintomatológica do animal, exames laboratoriais diretos e indiretos (SILVA, 2015).

Pela inespecificidade e variabilidade dos sinais apresentados, a determinação de diagnóstico pela análise clínica da LVC apresenta certo grau de complexidade, principalmente devido a amplitude dos diagnósticos diferenciais apresentáveis. Com o objetivo de ampliar a especificidade na investigação por sinais clínicos, o emprego de padronizações no apontamento dos sintomas pela expressividade e regularidade de sinais característico através de um sistema de escores, têm sido empregado em alguns estudos (SOLCÀ, 2017)

Para desenvolver o modelo de predição, Gouvêa (2011), utilizou 2 grupos distintos de animais, um com 715 animais avaliados no ano de 2003, para elaboração do modelo, e outro em 2004 com 697 cães para a validação do modelo preditivo. Essa metodologia de utilização de um conjunto amostral e outro de validação é denominada de split-sample validation. No modelo clínico, após validação, ficou definida a utilização de escores variáveis apontados aos sinais clínicos, como segue: idade(-1), alopecia periocular (5), perda de peso/caquexia (3), lesões de pele (3), lesão de lábio/queixo (3), lesão no focinho (5), lesão na orelha (6) e lesão nos linfonodos (2).

Pela complexidade apresentada pela doença, apresentando sintomatologia variada e com diversos diagnósticos diferenciais, e com presença vasta de portadores assintomáticos percebe-se a necessidade de associações entre as técnicas existentes para sua diagnose, verificado que nenhuma destas tem sensibilidade absoluta (COSTA, 2020).

A elaboração de um modelo de predição para prognóstico de cães infectados, e políticas públicas para o controle e prevenção da leishmaniose, é oportuno, principalmente pelo viés que acompanha os testes para esta enfermidade. Apesar da especificidade que a investigação por microscopia permite ao localizar o parasito, sua sensibilidade reduz por conta das limitações e riscos que o exame apresenta (GOUVÊA, 2011).

Como a limitação do diagnóstico em regiões com recursos financeiros escassos é dificultada pela complexidade na execução de alguns métodos moleculares e sorológicos, sendo assim, um modelo de predição baseado em sinais clínicos e exames menos complicados, classificado por escores, viabiliza a atuação e gestão pelos profissionais em áreas endêmicas (SILVA, K. et al., 2017).

Além disso, a falta de acurácia dos testes somada a presença de sintomas diversos, aumentam a conveniência deste tipo de metodologia (GOUVÊA, 2011) com aplicação de pontuações sobre as variáveis, caracterizando-os em seus valores totais e sobre sinais estatisticamente discrepantes (SILVA, K. et al., 2017).

A relevância de referências como esta, para avaliação por fatores preditivos, têm no sistema de escores a opção de manifestação dos seus resultados, melhorando a acurácia e eficiência nas práticas aplicadas por médicos veterinários em atendimento externo (LIMA JÚNIOR, 2012).

3.4. Onicogrifose

A onicogrifose, um dos sinais clínicos da LV, geralmente acompanhada de dor acentuada e cianose nos dígitos, descrita em cães, associada aos vasoespasmos da Síndrome de Raynaud, uma enfermidade incidente em humanos associada a vasoconstricção anômala de arteríolas periféricas, sob estímulos, em sua forma primária. Podendo aparecer como condição secundária a doenças como aterosclerose, esclerose sistêmica e lúpus eritematoso sistêmico (GONZALEZ; SILVA; MICHALANY, 2003).

Excluindo-se a LVC, diversas outras patologias dermatológicas e ungueais se associaram a onicogrifose, dentro da definição de hipertrofia e curvatura irregular das garras, ou deformação aparentemente alongadas e distorcidas. São elas os pênfigos foliáceo, eritematoso e vulgar, o lúpus eritematoso cutâneo, o penfigóide bolhoso, a epidermólise bolhosa congênita, a dermatomiosite, a ictiose, os distúrbios de queratinização, hiperqueratose nasodigital idiopática, neoplasia, necrose epidérmica linear por trauma, patológica ou atribuída ao avanço da idade. Podendo ser encontrada em cães com paroníquia, por conta do desenvolvimento acelerado das unhas acometidas, embora a frequência de sua associação seja extremamente baixa (KOUTINAS, 2010).

A definição de onicogrifose na Medicina Humana, considera esta, uma alteração disposta em lâmina ungueal, que regularmente deteriora a unha (DOURI, 2019). Caracterizada pelo distúrbio em seu crescimento, espessamento e opacidade em cor marrom-amarelada da lâmina ungueal (KO; LIPNER, 2018), por “hiperplasia epitelial

sub-ungueal do leito” (BARAN; NAKAMURA, 2011), com hiperqueratose macroscópica associada, prolongamento e acentuação na curvatura (KO; LIPNER, 2018; DOURI, 2019).

A lâmina cresce hipertrofiada, diferenciada de sua matriz, a princípio para frente e após desvia-se lateralmente para o lado que se desenvolve mais rápido, seja por insuficiência da matriz ungueal oposta, ou por atípica e majorada quantidade de queratina na unha (KO; LIPNER, 2018). As ocorrências de onicogribose em humanos estão associadas a ictiose, psoríase, onicomiose, mudanças na circulação sanguínea periférica, neuropatias, gota, alterações nos níveis ungueais, com deficiência de ferro e superiores de cálcio, habitualmente verificando-se hipercalcúria (BARAN; NAKAMURA, 2011).

As alterações por esclerodermia na região podem apresentar palidez acentuada reversível ou cianose, hiperemia e alcançar condição de isquemia tecidual na região dos dígitos. Essa isquemia quando duradoura e com presença posterior de fibrose na matriz ungueal pode ocasionar um fenômeno conhecido como “*pseudoclubbing*” - arqueamento longitudinal ampliado - com modificação de forma e índice de crescimento da placa (BARAN; NAKAMURA, 2011).

De acordo com Aqil et al. (2019), a patogênese de onicopatias é incerta, podendo estar diretamente relacionada a lesão renal, a complicações advindas desta ou a terapias associadas. Afirmou ainda que alguns autores demonstraram correlação entre alterações ungueais e a duração de hemodiálise. A anemia foi citada como uma condição importante de onicopatia, e em relação a proporção albumina:globulina, a insuficiência renal crônica tem na hipoalbuminemia um possível fator de alterações nas unhas, apesar de ainda não haver estudos com resultados significativos para essa correlação.

Koutinas et al (2010) define onicogribose como hipertrofia com curvatura anormal das garras, total ou majoritariamente. Observou em seus estudos várias lesões de pele como: dermatite esfoliativa, ulceração, hiperqueratose nasal, piodermite bacteriana, hiperqueratose do coxim plantar e paroníquia bacteriana. Também foram identificados: conjuntivite, blefarite, ceratite, uveíte, baixa no escore corporal, inflamação dos músculos vinculados à mastigação, rinite e epistaxe, estomatite ulcerativa, poliartrite, linfadenomegalia periférica, esplenomegalia, hepatomegalia e ascite.

Com um ciclo de crescimento normal longo, cerca de 1,9 mm por semana, em média, qualquer correção de alterações nas garras pode levar de 6 a 8 meses de intervenção. A presença em doenças parasitárias infecciosas que levam ao crescimento das unhas do cão, a demodicose acompanhada por paroníquia é um potencial estimulador, que também em associação à onicogribose na LVC, doença sistêmica, aumenta crescimento em cerca 25% das infecções. A dermatite causada por ancilostomídeos é capaz de produzir esse crescimento rápido, onicogribose e onicodistrofia (WARREN, 2013).

Não foram verificadas alterações de frequência ou severidade das lesões histológicas mais associadas a onicogribose, vacuolização de queratinócitos e fenda dermoepidérmica. A ulceração cutânea foi o achado comumente associado a essa onicopatía. Diferentemente do que se pensava ser, a dermatite esfoliativa que é considerada a acumulação de queratina, não possui correlação com a onicogribose, assim como comprovação de vínculo à alterações vasculares. Já na análise imunohistoquímica foi encontrado grande concentração de amastigotas quando realizado sua verificação em amostras que não passaram por processo de descalcificação (KOUTINAS et al., 2010).

Tanto *Ancylostoma spp* quanto *Uncinaria spp*, ancilostomídeos, apresentam esse desenvolvimento acelerado das garras acima dos 1,9mm semanais, característicos à onicodistrofia e a onicogribose. Na leishmaniose esse crescimento é conhecido por garras quebradiças e estranhamente longas. A onicodistrofia é definida como formação desenvolvimento anormal da garra, e possui como aspectos a seu desenvolvimento a onicodistrofia simétrica lupóide, a demodicose, a ancilostomose, surgir por presença de bactérias ou fungos, neoplasias ou trauma precursor. Enquanto a onicogribose se define pela curvatura anormal destas garras, por leishmaniose ou ancilostomose (ROUBEN, 2016).

A utilização de exames bioquímicos, hematológicos, proporção albumina:globulina e de avaliação do funcionamento dos rins e fígado são bastante utilizados como complemento para se chegar ao diagnóstico da leishmaniose em cães (LIMA et al, 2013).

As alterações laboratoriais mais comuns foram anemia, trombocitopenia, hiperglobulinemia, hiperproteinemia, hiperfosfatemia, azotemia e proteinúria renal. Não foram apresentadas ou evidenciados histórico ou clínica de onicopatía concomitante como traumas, dermatofitose, paroníquia associada a *Malassezia*, demodicose, dermatite por

ancilostomíase, oniquite lupóide, ou ainda narrativa ou constatação de corte recente das unhas (KOUTINAS et al., 2010).

Regularmente percebida em cães com a doença, a anemia é um achado interessante que se associa às funções renais. A redução de volume glomerular conjuntamente à queda quantitativa de hemácias e hemoglobina, é indicativo de anemia normocítica normocrômica (CUNHA, 2019). Tanto em cães assintomáticos quanto sintomáticos podem ser verificadas estas alterações do eritrograma na porcentagem de hematócrito, hemoglobinas e hemácias (DIAS, 2008).

Além da significância apresentada por essa anemia devido à resposta inflamatória, outras situações também podem levar a esse cenário, como hemólise, hemorragia, supressão da medula óssea e síntese comprometida de eritropoietina por incapacitação dos rins (CUNHA, 2019).

Albano et al. (2013) em um estudo com 30 animais identificou diminuição dos índices de ferro no sangue e saturação de transferrina, impulsionada pela leishmaniose visceral. Alterações no índice de saturação da transferrina e hipoferremia, compatibilizam com deficiência ou sequestro da substância, indicando queda dos valores referenciais de seu metabolismo. Em animais infectados estas variações ainda foram apresentadas conjuntamente com hiperproteinemia e anemia. Essa última causada possivelmente como consequência de processo inflamatório existente durante o progresso da doença, teoricamente responsável também pelo sequestro de ferro.

Testes bioquímico e hemograma (PAYANO, 2018), avaliação das funções hepática e renal, mensuração eletrolítica e proporção albumina:globulina são alguns exames complementares que aos serem solicitados, em associação à sintomatologia clínica, possibilitam um apoio na antecipação diagnóstica da Leishmaniose Visceral em cães (LIMA et al, 2013).

Alteração hematológica frequentemente observada, a anemia normocítica normocrômica, correspondente a diminuição dos números de hemácias, hemoglobina e do volume glomerular com manutenção referencial dos índices da hematimetria, como a concentração da hemoglobina corpuscular média e volume corpuscular médio (CUNHA, 2019).

Esta variação de declínio no percentual de hematócrito, hemoglobinas e hemácias durante o eritrograma pode ser observado tanto em cães sintomáticos quanto nos assintomáticos naturalmente infectados para Leishmaniose Visceral Canina (DIAS, 2008).

O desenvolvimento do quadro crônico associado a doença, apresenta importância na variação patogênica dos achados que podem variar conforme o desenvolvimento no organismo do animal. A anemia por resposta inflamatória é o motivo mais significativo, porém outras situações também podem gerar a condição anêmica, como hemólise, hemorragia, supressão da medula óssea e problemas na sintetização de eritropoietina por insuficiência renal (MELENDEZ-LAZO et al., 2018; CUNHA, 2019).

Observa-se também trombocitopenia, linfopenia ou leucocitose que estão associadas a redução de leucócitos no sangue (LIMA et al., 2013). A frequência de linfopenia decorre da eliminação dos linfócitos pelo protozoário e pela retenção temporária destes nos linfonodos e baço, ocasionando por compensação a monocitose (WINCK; SILVA, 2018), típico também em condições crônicas de processos inflamatórios (BRAZ, 2015).

As alterações bioquímicas visualizadas no desenvolvimento da Leishmaniose compreendem duplicação ou aumento de até três vezes os valores de aminotransferases, acréscimo dos níveis de bilirrubina, além de pequenas elevações séricas de ureia e creatinina, que concentradas modificam a capacidade funcional renal (ESCOBAR, 2019).

Com a progressão da doença, é possível identificar alterações protéicas na forma de hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (LIMA et al., 2013; PAYANO, 2018; ESCOBAR, 2019), com maior expressão em animais sintomáticos (DIAS, 2008). A hiperproteinemia pode ser observada em casos de leishmaniose devido à elevada produção de anticorpos (MONTARGIL et al., 2018), como consequência da ativação de linfócitos B, sendo considerada o segundo achado mais frequente por vezes (BRAZ, 2015).

A produção de albumina e de grande parte das globulinas, exceto imunoglobulinas, ocorre no fígado. Em geral, são os hepatócitos que sintetizam as proteínas plasmáticas, que podem ser quantificadas com uso de aparelhos de refratometria, pois a intensidade refratária do líquido aumenta conforme a concentração de suas moléculas no plasma. Essa técnica de estimativa tem por característica, ser rápida, econômica e com manipulação simples (BRANDÃO et al., 2022)

A apresentação de valores bioquímicos renais e hepáticos também estão sendo relacionados a evolução da enfermidade, assim como a redução na proporção entre albumina e globulina (ESCOBAR, 2019) alcançando relação de inversão entre as proteínas (COSTA et al., 2020).

4. MÉTODO

O projeto ocorreu com animais testados positivos para leishmaniose visceral utilizando o protocolo diagnóstico da Unidade de Vigilância de Zoonoses da Diretoria de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde do Governo do Distrito Federal. Os animais são coletados pela unidade mediante suspeita ou confirmação da enfermidade em atendimento veterinário prévio de demandas sociais. O serviço de diagnóstico é oferecido pela unidade de forma gratuita, desde que o animal possua idade superior a 3 meses (DISTRITO FEDERAL, 2021). Os exames de sangue foram realizados na unidade do Labocien do Centro Universitário de Brasília, localizado na unidade da Asa Norte.

Para o estudo foram utilizados cães naturalmente infectados e diagnosticados pela Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde, através do protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, utilizando teste imunocromatográfico TR-DPP® para triagem com confirmação pelo teste imunoenzimático ELISA (EIE®-LVC) (BRASIL, 2011).

4.1. Tipificação

Foi realizado um estudo transversal e análise de caráter quantitativa, considerando o modelo exploratório para alcançar o estabelecimento da associação de fatores preditivos aos animais infectados, com observação de sinais clínicos e amostras de sangue doadas pela unidade de Zoonoses da Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde do Distrito Federal de cães naturalmente infectados e diagnosticados, para leishmaniose visceral. Foram realizadas avaliações clínicas e análise de exames hematológicos e bioquímicos, com o objetivo de constatar a eficiência de modelos preditivos já publicados, ampliar a identificação de conceitos dos sinais clínicos mais recorrentes, tornando possível a elaboração de modelos preditivos mais completos, que auxiliem na tomada de decisões e na elaboração de ações preventivas para que se tente reduzir o número de casos e a fatalidade da doença.

4.2. Caracterização do local de pesquisa

O estudo ocorreu em duas etapas, a primeira de observação de sinais clínicos e recebimento de doação de amostra de sangue dos animais que aguardavam procedimento

de eutanásia na Vigilância de Zoonoses do Distrito Federal, situado as coordenadas de 15°45'36.8"S e 47°55'07.5"W. Em um segundo momento as amostras doadas foram processadas e armazenadas no Laboratório de Ciências do Ceub, na sua unidade da asa norte, localizado nas coordenadas 15°45'57.1"S e 47°53'38.3"W.

4.3. Objeto de estudo

Foram utilizados para o estudos os sinais clínicos e amostras de animais testados e positivados conforme nota técnica conjunta nº 01/2011 do Ministério da Saúde do Brasil que regulamenta sobre o diagnóstico para leishmaniose visceral canina. O procedimento consiste no uso de testes sorológicos de triagem imunocromatográfico Dual Path Platform (TR-DPP®) e confirmatório imunoenzimático ELISA. O protocolo é efetuado de forma gratuita à população pela Unidade de Vigilância de Zoonoses do Distrito Federal.

4.4. Delimitação e universo da amostra

Serviram para realização do estudo 6 (seis) cães com idade superior a 2 anos que aguardavam pelo procedimento final permitido no protocolo definido na nota técnica conjunta nº 01/2011 do Ministério da Saúde do Brasil.

Critérios de inclusão:

Cães, de qualquer idade, raça ou gênero, com diagnóstico positivo para LVC confirmado por teste sorológico e imunoenzimático, pela Unidade de Zoonoses do DF, e que aguardavam pelo protocolo de eutanásia, após consentimento de seus tutores.

Critérios de exclusão:

Cães que não possuam a característica citada no critério de inclusão.

4.5. Instrumentos de coleta ou de geração de dados

De acordo com Feitosa (2014), a semiologia constitui o estudo de metodologias de exames clínicos, pela qual a interpretação dos sintomas verificados, contribui para construção do diagnóstico e presunção evolutiva das doenças. Foi necessário, portanto, a observação de alguns protocolos de prevenção, como higienização das mãos e colocação de luvas descartáveis. Preparou-se previamente os materiais a serem utilizados para coleta e

armazenamento, observando-se o correto manuseio destes e a destinação após uso (GALVÃO et al., 2019).

A manipulação do animal seguiu procedimentos de segurança tanto para o animal quanto para o veterinário da DIVAL que realizou os procedimentos, uma vez que, independente da índole observada ou divulgada do animal, a sensibilidade na região de manuseio poderia desencadear processos instintivos de defesa, como unhas, mordidas e outros comportamentos lesivos, não necessariamente caracterizando os cães como agressivos (FEITOSA, 2014).

As contenções físicas e químicas foram necessárias, precedendo a inspeção do cão. Essa averiguação observou o estado de consciência, coloração de mucosas, condição física, avaliação das propriedades funcionais e anatômicas na cabeça, qualidade e alterações na pelagem, estrutura abdominal e características respiratórias (GALVÃO et al., 2019), e observação de alteração nos linfonodos (PAYANO, 2018). A medição de temperatura retal foi um dos procedimentos de verificação utilizados.

A observação de sinais clínicos foi realizada pelos alunos, bolsista e voluntário, com participação do professor orientador, diretamente nas localizações definidas e direcionadas pelo profissional responsável no controle de zoonoses do Distrito Federal, com registro em imagens dos sinais clínicos dos animais. Houve doação das amostras sanguíneas que foram coletadas pelo médico veterinário chefe da seção e posteriormente identificadas pelos alunos. A coleta de sangue ocorreu após procedimento de antissepsia com gaze embebida em álcool 70% e contenção física. A flebotomia aconteceu por punção periférica em veia cefálica ou jugular, de acordo com a condição de cada animal, pressionando-se previamente nas proximidades do vaso eleito. Inseriu-se o bisel da agulha, voltado para cima, com ângulo entre 20 e 30 graus até alcance da veia, puxando o êmbolo da seringa, exercendo pressão negativa em direção ao cilindro (SILVA, 2019).

Retirado o garrote, pressionou-se o local da punção para que cessasse qualquer extravasamento de sangue possível. Despejou-se o volume necessário dentro de cada tubo, tomando cuidado na forma de derramar, evitando hemólise. Efetuou-se homogeneização posterior dos tubos preenchidos, para reação com os adjuvantes internos (VADEN et al., 2013).

A escolha prévia dos tubos de coleta adequados e a identificação dos materiais e respectivos animais foram etapas primordiais para resultados fidedignos, para isso foi

observada a sequência correta, tubo com ativador de coágulo, para teste bioquímico primeiro, e posteriormente o tubo com EDTA, para que não se prejudicasse o conteúdo da amostra. Os tubos com EDTA, de tampa roxa, para perfil hematológico, e o de tampa vermelha, com anticoagulante e sem gel, para perfil bioquímico (VADEN et al., 2013). Para identificação foram aplicadas nas etiquetas numeração sequencial conforme coleta ocorrida em cada animal, registrada por foto, associadas às amostras e respectivos formulários.

Depositado nos tubos o sangue, providenciou-se o armazenamento em caixa de isopor sob refrigeração, entre 2º e 8ºC, e encaminhamento da amostra ao laboratório em até 2 horas para realização dos exames hematológicos, com aliquotagem e preservação da amostra dos tubos com ativador de coágulo para realização posterior do exame bioquímico.

Procurou-se observar as alterações clínicas comumente encontradas, como hiperqueratoses, alopecias, despigmentações, paroníquia, onicogribose e as dermatites esfoliativa, ulcerativa, nodular ou postular. Para tanto, seguiu-se sintomatologia definida nos trabalhos de Lima Júnior (2012) e Gouvêa (2011), distribuídos em formulário específico (Apêndice A), desenvolvido para análise clínica.

A palpabilidade de linfonodos representa informações importantes sobre a localidade de processos inflamatórios ou infecciosos, sendo elegidos para o exame clínico os mandibulares, cervicais superficiais, poplíteos, inguinais e axilares. Os exames clínicos físicos conferem validade ao diagnóstico, e os exames complementares contribuem substancialmente (FEITOSA, 2014).

Para que fosse possível a identificação dos objetivos da pesquisa e obtenção de dados foi utilizado registro de sinais em meio digital (imagens e texto), esse procedimento ocorreu seguindo formulário, gerado em cima de dados de trabalhos com modelos preditivos, inserido nos anexos como roteiro semiológico.

Para análise de amostras doadas e obtenção de resultados laboratoriais foi necessário a utilização do equipamento de hematologia BC-2800 da marca Mindray e do espectrofotômetro digital modelo Q8980PT da marca Quimis que fazem parte do patrimônio da instituição de ensino CEUB.

4.6. Procedimentos metodológicos

Foram utilizados para o estudos os sinais clínicos e amostras de animais testados e positivados conforme nota técnica conjunta nº 01/2011 do Ministério da Saúde do Brasil que regulamenta sobre o diagnóstico para leishmaniose visceral canina. O procedimento consiste no uso de testes sorológicos de triagem imunocromatográfico Dual Path Platform (TR-DPP®) e confirmatório imunoenzimático ELISA. O protocolo é efetuado de forma gratuita à população pela Unidade de Vigilância de Zoonoses do Distrito Federal.

Para que pudesse haver a observação dos animais infectados, existia a necessidade que os animais estivessem presentes no prédio da Dival, pois não existe, atualmente, por parte do controle de zoonoses, a retenção ou alojamento de animais infectados com esta doença, e portanto a demanda ficou condicionada ao agendamento junto aos tutores para o procedimento de eutanásia dos animais com diagnóstico confirmado para Leishmaniose.

Durante grande parte do período da pesquisa, a Unidade de Vigilância em Zoonoses ficou desabastecido dos anestésicos e sedativos utilizados na técnica que induz ao óbito rápido e sem sofrimento aos cães atingidos por esta doença incurável em sua infecção, pois os insumos utilizados estavam sendo direcionados ao sistema hospitalar regional para combate da pandemia de SARS-COV-2. Ademais, a sanção da Lei 14.228/21 que dispõe sobre a eutanásia de cães e gatos no país causou um interpretaçãoes dúbias no que concerne a prática desta ação, fazendo com que o órgão público paralisasse as ações de recebimento dos cães.

Quando da presença dos animais na instituição no dia da eutanásia, os alunos se apresentaram junto ao órgão e efetuaram a observação e registro em meio digital de texto e imagens dos sinais clínicos visíveis nos animais.

O exame clínico ocorreu por observação e identificação dos sinais clínicos visíveis, trabalhados como variáveis pelo experimento produzido por Lima-Júnior (2012): idade (3 faixas: de 8 meses a menos de 1 ano, de 1 ano a menos de 7 anos; mais de 7 anos), mucosas (normocoradas, hipocoradas ou hiperêmicas/ictéricas), alopecia (ausência, localizada ou generalizada), linfadenopatia (ausência, regional ou generalizada), e outros sintomas como desidratação, lesões cutâneas, emagrecimento/caquexia, apatia, descamação cutânea furfurácea, pelo opaco, úlceras crostosas, onicogrifose, alterações oftálmicas, e

esplenomegalia (ausência ou presença). Entre os elementos de análise clínico acima, apenas a esplenomegalia não havia alcançado significância estatística.

O trabalho de Gouvêa (2011), forneceu os seguintes itens a serem identificados e catalogados posteriormente, conforme modelo-clínico designado, e passíveis de observação no momento da coleta: sexo, idade, e fatores a serem definidos por definição de presença (sim/não) como epistaxe, alopecia, linfadenomegalia, onicogribose, alopecia periocular, perda de peso/caquexia, e alterações ou lesões de pele, cabeça, lábio/queixo, focinho, orelha, olhos, corpo, membros.

A coleta de sangue para análise bioquímica e hematológica foi feita pelo médico veterinário da Dival, responsável pelo procedimento supracitado e doação aos pesquisadores. Após a entrega dos tubos com ativador de coágulo para análise bioquímica e dos tubos com anticoagulante EDTA para análise hematológica, os mesmos foram armazenados imediatamente em caixa de transporte de isopor, com a presença de gelo reutilizável rígido, para conservação do material à temperatura entre 2°C e 8°C.

Em um prazo de até duas horas após a coleta, as amostras foram levadas até o laboratório da instituição de ensino no bairro Asa Norte, onde as amostras de sangue em tubo de EDTA passaram por leitura no equipamento de hematologia. As amostras armazenadas nos tubos com ativador de coágulo foram centrifugadas por 12 minutos a 3.000 rotações por minuto para obtenção de soro. Para separação desse sobrenadante e armazenamento do conteúdo em microtubos de centrifugação eppendorf foi utilizada pipeta automática para volumes de 100 a 1.000 µL. As amostras de soro obtidas foram conservadas a uma temperatura de 18°C negativos.

Na semana seguinte à coleta, o material congelado foi revertido novamente à temperatura ambiente, para procedimento de espectrofotometria conforme as especificações dos reagentes de identificação de concentração de Cálcio ASX VET, Albumina VET, Creatinina VET, Proteína Total VET, Ferro CRX e Ureia adquiridos para a pesquisa do fabricante BioTecnica biotecnologia avançada, com controle interno da qualidade do ensaio pelo seu reagente quantitativo padrão, Quantinorm VET.

A leitura das concentrações dos índices bioquímicos foi feita sob a medida da unidade nanométrica de absorbância, conforme Tabela 1, e dimensionados com inclusão dos dados nas fórmulas de Fator de Calibração e posteriormente de Concentração dos indicadores. O fator de calibração é alcançado com a divisão da concentração padrão pelo

percentual de absorvância do padrão, definida pelo reagente de mesmo nome. A concentração do fator nas amostras é calculada multiplicando-se o fator de calibração obtido pela absorvância da amostra.

Reagente	Volume de reagente (µL)	Volume do padrão (µL)	Volume do amostra (µL)	Tempo de incubação (minutos)	Tempertura de incubação	Leitura da absorvância (nm)
Cálcio	2.000	20	20	02:00	15 a 30°C	650
Ferro	2.000	100	100	05:00	10 a 30°C	620
Proteína Total	2.000	40	40	10:00	ambiente	550
Albumina	2.000	10	10	10:00	15 a 30°C	630
Ureia	2.000	20	20	05:00	37°C	540
Creatinina	2.000	20	20	05:00	37°C	500

Tabela 1. Valores e parâmetros das quantidades de reagentes, padrões dos reagentes e amostra de soro de cada animal para formação da solução de leitura em espectrofotômetro na leitura de absorvância indicada pelo fabricante.

Após o processamento das informações e dados levantados, o cálculo do logaritmo de chance de resultado positivo em testes parasitológicos, foi feito em cima dos parâmetros de um modelo clínico-laboratorial incluindo a sintomatologia mais representativa: descamação furfurácea, emagrecimento/caquexia, onicogrifose e reagência ao teste imunocromatográfico Dual Path Platform (DPP). A apuração foi feita na fórmula “-6,270 + 0,904*descamação furfurácea + 2,032*onicogrifose + 2,571*emagrecimento/caquexia + 4,000*DPP”. O desenvolvimento desta técnica de utilização de escores, embasou-se na relação envolvendo coeficiente de regressão individual e o menor valor associativo desta constante entre as variáveis (LIMA JUNIOR, 2012).

O número de coletas efetuadas foi de um total de 6 (seis), reduzido, devido às condições de epidemia citadas, o que não permitiu a esse estudo emitir dados estatísticos. Portanto, para agregar valor ao projeto, a revisão de literatura tornou-se prioridade na reta final da elaboração do relatório final dessa pesquisa

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após coleta e processamento dos dados obtidos, foi possível identificar alguns sinais clínicos compatíveis com os observados na literatura para a leishmaniose visceral em cães. Os sintomas identificados foram: lesões cutâneas, emagrecimento/caquexia, apatia, descamação, alopecia, pelos opacos, úlceras crostosas, alterações oftálmicas, linfadenopatia e esplenomegalia. Também foram verificados blefarite, poliartrite, disfunções de queratinização, hiperqueratose, atrofia muscular e em ponta de orelha, ceratoconjuntivite e vasculite (Figura 1).

Figura 1. a) descamação furfurácea generalizada; b) alopecia periocular e ceratoconjuntivite; c) distúrbio de queratinização em borda de orelha; d) onicogribose; e) atrofia muscular; f) alopecia periocular, descamação, vasculite e atrofia em ponta de orelha g) ulceração grave e distúrbio de queratinização(orelha), alopecia periocular, blefarite com ceratoconjuntivite seca; h) alopecia generalizada



Fonte: autores (2022)

A temperatura retal dos animais variou entre 37,7°C e 38,7°C, na hora da análise clínica, dentro dos padrões normais de temperatura observado em cães, que é de 37,5°C a 39,2°C (FEITOSA, 2014).

Com a sintomatologia verificada, foram colocados em análise o padrão dos modelos preditivos por escore de Lima Junior (2012) e Gouvêa (2011). Os resultados estão dispostos na Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2. Resultados obtidos e avaliados conforme modelo preditivo de Gouvêa (2011)

Variáveis	Score	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
Alopecia periocular	5	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Perda de Peso/Caquexia	3	sim	não	sim	sim	não	não
Lesões de pele	3	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Lesão no lábio/queixo	3	não	não	não	sim	não	não
Lesão no focinho	5	sim	sim	não	não	não	sim
Lesão na orelha	6	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Lesão nos Linfonodos	2	sim	sim	sim	sim	sim	sim
idade	-4	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Score Total	23	20	17	15	18	12	17

Tabela 3. Resultados obtidos e avaliados conforme modelo preditivo de Lima Júnior (2012)

Variáveis	Score	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
Teste rápido DPP-LVC	4	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Emagrecimento/Caquexia	3	sim	não	sim	sim	não	não
Onicogrífose	2	sim	não	sim	sim	sim	não
Descamação Fúrfurácea	1	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Score	10	10	5	10	10	7	5

A análise (Tabela 2) conforme o modelo preditivo de Gouvêa (2011) seria de positividade para todos os animais, visto que o ponto de corte atribuído para seu modelo clínico era de 8 pontos, tendo entre 53% a 60% de sensibilidade. Lembrou o autor, também, que a sensibilidade de aspirado de medula e linfonodos pode variar de 30% a 95%.

Este primeiro modelo descrito, apresentou dimensões inespecíficas em relação a sintomatologia da leishmaniose visceral canina, variando sua positividade no modelo clínico atrelada a soma de 4 a 6 variáveis.

Já no modelo de Lima Júnior (2012) os resultados (Tabela 3) repetiriam a positividade em seu modelo clínico com score 5, com uso de teste imunocromatográfico DPP, que tem sensibilidade de 62,3%, especificidade de 92,6%, VPP de 39,1% e VPN de 97,0%, média entre amostras de desenvolvimento do teste e validação. Esse autor também desenvolveu escores de pontuação 6 e 7 que tiveram desempenho menor em sua sensibilidade. O teste DPP, em análise solitária, obteve sensibilidade de 92,3%, especificidade de 71,1%, VPP de 19,7% e VPN de 99,2%.

Em observação dos resultados alcançados, identificou-se bom desempenho destes modelos de avaliação clínica, tendo o segundo modelo apresentado alcançado boas indicações para realização de teste de triagem DPP-LVC quando observadas a associação de 2 ou 3 das variáveis descamação furfurácea, onicogrífose e emagrecimento/caquexia.

Em uma avaliação das dificuldades encontradas por veterinários a campo ou pelo alto custo de alguns exames, e na verificação de uma nova pesquisa na área, colocaríamos como oportuna a inclusão da variável hiperproteinemia, resultado do aumento na quantificação das proteínas plasmáticas, verificado com exame de refratometria.

Dentre os resultados hematológicos mais frequentes, ficaram a anemia normocítica normocrômica e hiperproteinemia. A anemia na doença pode decorrer de eritropoiese reduzida, hemorragias, hemólise, retenção de hemácias por sequestro esplênico e pela condição crônica da LVC. O aumento da concentração de proteínas no sangue está relacionada à alta produção de imunoglobulinas resultante da ativação policlonal de linfócitos B, que se elevam acima dos valores referenciais, mesmo quando identificados quadros de hipoalbuminemia (BRAZ et al., 2015).

As amostras de sangue doadas, dispostas em tubos com ativador de coágulo (tampa vermelha), passaram por leitura no analisador hematológico, e apresentaram como característica geral a anemia normocítica normocrômica (Tabela 4), porém a leitura de CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) apresentou leve expressão de hipocromia.

Tabela 4. Resultados de exames hematológicos e bioquímicos das amostras coletadas.

Eritrograma	Valores Referenciais	amostra 1	amostra 2	amostra 3	amostra 4	amostra 5	amostra 6
Leucócitos	6 a 17	10,8	10,2	13,8	14,4	9,9	5,9
Hemoglobina	12 a 18	10,1	13,9	10,7	8,5	10,6	10,7
Eritrócitos	5,5 a 8,5	4,98	6,38	5,2	4,31	4,85	5,11
Hematócrito	37 a 55	34,1	47,5	35,5	28,8	35,8	35
VCM	60 a 77	68,5	74,5	68,4	66,9	73,9	68,6
HCM	19 a 23	20,2	21,7	20,5	19,7	21,8	20,9
CHCM	31 a 36	29,6	29,2	30,1	29,5	29,6	30,5
Plaquetas	200 a 900	318	376	69	249	222	280

Bioquímico	Valores Referenciais	amostra 1	amostra 2	amostra 3	amostra 4	amostra 5	amostra 6
ALBUMINA	2.6 a 3.3	1,3	4,6	3,9	1,9	2	2,5
CÁLCIO	9.0 a 11.3	9	13	13	13	12	10
CREATININA	0.5 a 1.4	4,3	0,7	0,7	0,7	1,4	3,6
FERRO	30 a 180	95	181	118	96	155	144
PROTEINA TOTAL	5.7 a 7.1	13,7	10,4	10	14	4,7	7,3
UREIA	21,4 a 59,92	24,5	23,6	29,8	35,5	85	20,3

Conforme Lages (2010), essa alteração de (CHCM), que pode alterar quando a hipocromia, ocorre por suposto aumento em microhematócrito, ou pela sua diminuição durante o avanço da hipocromia lida em equipamentos mais modernos. Podem também

ocorrer erros em sua diminuição gerando resultados discrepantes, principalmente entre CHCM e HCM, fato que pode ser confirmado como equívoco se houver aumento no índice de VCM na contabilização de eritrócitos com formação de plaquetas gigantes e cenários de hiperosmolaridade. O resultado de HCM representa mais adequadamente o estado hipocrômico do que CHCM.

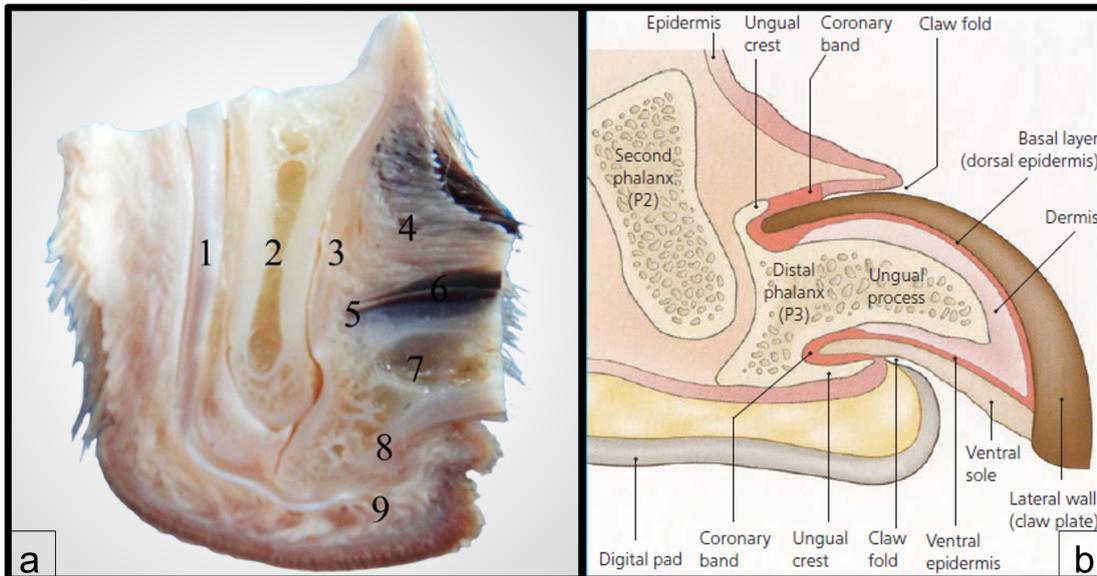
Em anemias ferropênicas rigorosas se observaria valor de hemoglobina abaixo dos valores referenciais, e redução de CHCM a limites inferiores a 25%, apresentando VCM reduzido em caráter crônico, nessa situação se classificaria em uma anemia microcítica, o que não ocorreu nesta pesquisa. Nestas condições, com queda de CHCM, ocorre baixa disposição de ferro em 95% dos resultados hematológicos. A concentração de hemoglobina caracteriza a amostra normocrômica, assumindo a posição da hipocromia em anemia normocítica. A anemia ferropênica mostra momentos amostrais de normocromia e hipocromia, assim como características normocíticas e microcíticas (FAILACE; FERNANDES, 2015).

A identificação na hipoferremia no sangue e quantidade de transferrina circulante, impulsionada pela leishmaniose visceral foi anteriormente observada, e compatibilizam com deficiência ou sequestro da substância, indicando queda dos valores referenciais de seu metabolismo. Nos cães infectados estas variações foram apresentadas em associação a hiperproteinemia e anemia, como possível consequência de processo inflamatório ao progresso da doença, teoricamente responsável também pelo sequestro de ferro (ALBANO et al., 2013).

A ausência na oferta de ferro, ocasionado por reserva primária à reticulócitos e macrófagos conhecido como ferropenia funcional, para o processo de eritropoiese é compatível com a patogenia de doenças crônicas que se iniciam em anemia normocítica e desenvolvem para microcítica (FAILACE; FERNANDES, 2015). Bertolo (2017) observou a predominância de infiltrado inflamatório por células mononucleares, em seção onde se desenvolve a garra (Figura 2-a), e de formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos suprimidos da falange medial dos cadáveres (BERTOLO, 2017).

As ocorrências de onicogrifose em humanos estão associadas a ictiose, psoríase, onicomiose, mudanças na circulação sanguínea periférica, neuropatias, gota, alterações nos níveis ungueais, com deficiência de ferro e superiores de cálcio, habitualmente verificando-se hipercalcúria (BARAN; NAKAMURA, 2011).

Figura 2. a) Secção mediana sagital do terceiro dígito torácico de cão com leishmaniose visceral. (1) Tendão do músculo flexor profundo dos dedos, (2) Parte da falange média do terceiro dígito, (3) Tendão do músculo extensor profundo dos dedos, (4) Epiderme/derme dorsal, (5) Matriz ungueal dorsal, (6) Parede da unha, (7) Parte da falange distal do terceiro dígito, (8) Matriz ungueal ventral, (9) Epiderme/derme ventral (coxim digital) - (BERTOLLO, 2017); b) Estrutura da garra canina.



Fonte: a) Bertollo (2017); b) Warren (2013)

A ocorrência da redução de índices de cálcio total é dependente de estágio da doença renal crônica, ocasionado pela diminuição na produção de calcitriol nos túbulos renais comprometidos, reduzindo conseqüentemente a absorção de cálcio nos intestinos. A continuidade da hipocalcemia gera feedback positivo, levando a produção do paratormônio, que possui como função prioritária a manutenção das concentrações séricas de cálcio. No entanto, como a absorção de cálcio no trato gastrointestinal está comprometida, permanece o influxo secretor de paratormônio, estabelecendo-se um quadro de hiperparatireoidismo secundário renal. Nestas condições de excessiva produção de paratormônio transcorre a hipercalcemia, com potencial resultante de reabsorção óssea e osteodistrofia fibrosa. Conforme o estágio da doença renal crônica, a concentração sérica de cálcio pode mostrar-se normalizada, aumentada ou reduzida (ROSA et al., 2021).

Outro distúrbio associado à hipercalcemia - que pode ocorrer por hiperparatireoidismo, destruição de tecido ósseo, transtornos ligados à vitamina D e hiperparatireoidismo secundário por insuficiência renal - é a calcificação metastática verificada em tecidos normais quando da alteração dessa concentração que também evidencia a calcificação distrófica (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2016).

Lesões vasculares podem causar danos na resposta do músculo liso, levando a espessamento endotelial por hipóxia por atuação da angiotensina 2, um peptídeo vasoativo atuante em receptores vasculares, ativando por consequência a PKA (proteína quinase do tipo A). Sua sinalização amplia a quantidade de cálcio no citoplasma realizando hiperplasia vascular e estimulando vasoconstrição periférica, que eleva a hipóxia já instaurada, intensificando danos vasculares. Foi verificado em cão infectado por leishmaniose lesão glomerular nos túbulos condizente com calcificação distrófica (ALVES, 2018)

A especialização da garra demonstra certa complexidade estrutural, pois é constituída da queratinização em material córneo, evoluindo diretamente da derme e epiderme. Grande parte de seu crescimento surge da seção coronária da camada basal epidérmica (Figura 2-b), expressando sua fisionomia curvada. A garra é protegida pela dobra que a pele faz ao seu redor, área essa sem presença de pelos. A derme prolonga-se do perióstio da falange distal até a crista ungueal, o que inibe a remoção da garra sem que a terceira falange seja amputada junto, sendo uma região vascularizada e inervada (WARREN, 2013).

A onicogribose apresenta frequência variável em animais infectados, entre 40% e 63,1%, e exibe associação entre inflamação local e estada parasitária, ainda sim a literatura referente a evolução desta onicopatia possui pouco material publicado (BERTOLO, 2017).

Diante das informações e literaturas coletadas, a associação de cálcio e ferro com a onicopatia avaliada demonstrou-se plausível, porém ainda não completamente esclarecida. Ficou entendido com as pesquisas realizadas que a onicogribose tem que ser levadas em consideração alteração de sua curvatura além do crescimento, por observação de alterações em regiões ungueais específicas. O estudo de novos modelos preditivos em observação detalhada de ulcerações cutâneas associativas, também é indicado.

Não foram encontradas relações que demonstrem diferenças entre os resultados para cães e cadelas, machos e fêmeas, neste estudo. Os resultados obtidos relacionados à quantidade de dados coletados não foram condizentes com a grandeza dos objetivos deste trabalho, mas ainda assim foram valorosos para demonstrar a importância da continuidade dos estudos necessários para construção de conhecimento para essa doença que afeta cães, humanos e alguns outros mamíferos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Reconhecemos que a observação das informações apuradas, possibilitaram a indicação de valor considerável à aplicação de modelos preditivos no apoio aos profissionais de medicina veterinária para a identificação da doença. Os materiais e exames clínicos e laboratoriais realizados durante o estudo possibilitaram o levantamento de dados suficientes para verificação da aplicabilidade de estudos prévios no assunto, e incorporação de literatura na área. No entanto, as dificuldades encontradas na execução deste trabalho não permitiram a obtenção de números expressivos para geração de dados estatísticos que agregariam qualidade aos resultados.

Indícios de efetividade nos modelos preditivos avaliados demonstraram que a capacidade de usá-los em rotinas clínicas é positiva, a associação de outras técnicas facilita o diagnóstico e prognóstico da leishmaniose, é portanto, necessária a continuidade de estudos. Quanto aos avanços junto ao conhecimento de sinal clínico tão específico como a onicogribose mostrou-se bastante oportuno e com implicações maiores da junta de informações de associações bioquímicas e hematológicas como este trabalho conseguiu iniciar a comprovação.

Consideramos que os objetivos propostos são relevantes e que é oportuna a realização de novos estudos na área devido a importância epidemiológica que a leishmaniose visceral possui no Brasil. Os cães apresentam características de reservatório e hospedeiro, essa condição reserva ao animal grande risco e, em contrapartida, importância nos estudos de controle e prevenção desta zoonose. A existência de diferentes variáveis a serem aplicadas na formação de modelos de predição para a patologia podem ampliar significativamente a validade de estudos similares futuros.

7. REFERÊNCIAS

- ALBANO, S. G. C. et al. Alterações séricas do metabolismo do ferro em cães com leishmaniose visceral canina. Revista de educação continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP: 40º CONBRAVET Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária 2013, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 81, 2013.
- ALVES, A. F. Leishmaniose visceral canina: estudo histológico e histoquímico renal com ênfase na fibropoese. 2018. Tese (Doutor em Patologia (área de concentração em Patologia Investigativa) - Programa de Pós Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2018.
- ANDRADE, T. S. de et al. Frequência de sinais observados ao exame físico de cães com leishmaniose visceral. Med trop 54o congresso de brasileira de medicina tropical, [S. l.], p. 20–11, 2018.
- AQIL, N. et al. Nail Disorders in Patients with Chronic Renal Failure. Journal of Dermatology Research and Therapy, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2019.
- AYELE, A.; SEYOUM, Z. A Review on Canine Leishmaniasis; Etiology , Clinical Sign , Pathogenesis , Treatment and Control Methods. Global Veterinaria, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 343–352, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2016.17.04.104151>
- BARAN, R.; NAKAMURA, R. Doenças da unha: do diagnóstico ao tratamento. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. ISBN 978-85-352-4852-4.
- BERTOLO, P. H. L. Relação entre as lesões histológicas e a carga parasitária da região ungueal de cães naturalmente infectados com Leishmania infantum. Orientador: Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. 2017. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal-SP, 2017.
- BRANDÃO, M. O. C. et al. Desvendando as proteínas plasmáticas. In: Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar (ISSN-2527-2500) & Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar. 2022.
- BRASIL. Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências., 2008
- BRASIL. LEISHMANIOSES Informe Epidemiológico das Américas. Informe de Leishmanioses No 7, v. 1, p. 1–27, 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica conjunta nº 1/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS, 2011.

BRASILEISH (Brasil). Grupo de Estudos em Leishmaniose Animal. Diretrizes para o Diagnóstico, Estadiamento, Tratamento e Prevenção da Leishmaniose Canina. Versão 10.11.6. [S. l.], 2018. 16p. Disponível em: <https://www.brasileish.com.br/revistadiretriz.html>. Acesso em: 10 setembro 2021.

BRAZ, P. H. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. *Acta Veterinaria Brasilica*, ano 87-90, v. 9, n. 1, p. 87-90, 2015.

COSTA, G. P. et al. Métodos de diagnóstico da leishmaniose canina: revisão de literatura. *Saber Científico*, Porto Velho, v. 9, n. 2, p. 95-104, 2020.

COSTA, S. S. et al.; Onicopatias em cães e gatos. *Clínica Veterinária: Revista de educação continuada do clínico veterinário de pequenos animais*, n. 95, p. 46-56, 2021.

CUNHA, G. M. C. Alterações laboratoriais nos casos de leishmaniose visceral canina atendidos no HVET-UNB. Orientador: Profa. Dra. Giane Regina Paludo. 2019. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2019.

DE FIGUEIREDO, M. J. de F. M. et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. *Ciencia Animal Brasileira*, v. 15, n. 1, p. 102–106, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5216/cab.v15i1.25097>

DIAS, C. A. Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com Leishmaniose naturalmente infectados no Distrito Federal. Orientador: Prof. Dr. Marcio Botelho de Castro. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Programa de pós-graduação em Saúde Animal - UNB, Brasília - DF, 2008.

DISTRITO FEDERAL (DF). Secretária de Saude. Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde. Versão 10.11.6. Brasília - DF, 24 mar. 2021. Disponível em: <http://www.saude.df.gov.br/servicos-dival/>. Acesso em: 1 maio 2021.

DOS SANTOS GAZZINELLI, S. et al. Análise espacial e temporal leishmaniose visceral no estado de Minas Gerais de 2008 a 2019. 2022.

DOURI, T. A Rare Cases of Onychogryphosis Caused by Paronychial Form of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of the Turkish academy of Dermatology: case report*, v. 13, n. 3, 2019.

ESCOBAR, T. A. Identificação molecular e avaliação clínica, bioquímica e hematológica em equinos e caninos com leishmaniose. Orientador: Prof.^a Dr.^a Vanusa Manfredini. 2019.

Dissertação (Doutorado em Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, Uruguiana - RS, 2019

FABRETTI, A. K. et al. Leishmaniose Visceral Canina. A Pesquisa nos Diferentes Campos da Medicina Veterinária, [S. l.], v. 16, p. 82–87, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.22533/at.ed.5442022058>

FAILACE, R.; FERNANDES, F. Hemograma: Manual de interpretação. Porto Alegre: Artmed, 2015.

FERREIRA, A. W. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes: correlações clínico-laboratoriais / Antonio Walter Ferreira e Sandra do Lago Moraes. - 3. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

FIGUEIREDO, M.J.F.M. et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. Ciência Animal Brasileira. v.15, n.1, p. 102-106, 2014

FREHSE, M. S. Vigilância ativa da leishmaniose visceral canina no município de São José dos Pinhais - PR: Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Área de Concentração: Patologia Veterinária, da Universidade Federal do Paraná. Orientador: Marcelo Beltrão Molento. São José dos Pinhais - PR. 2008.

GONÇALVES, A. L. Estudos comportamentais de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná, Brasil. Orientador: Profª. Drª. Edilene Alcântara de Castro. 2014. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Curitiba, 2014.

GONZALEZ, R.; SILVA, P. T. D.; MICHALANY, N. Onicopatía asociada a vasoconstricción de arteríolas dos dígitos. Braz. J. vet. Res. anim. Sci, São Paulo, v. 40, p. 171, 2003.

GOUVÊA, M. V. Desenvolvimento e validação de modelo preditivo e avaliação de testes de diagnóstico por classe latente para o parasitismo por *L. chagasi* em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFPI, Teresina. Orientador: Prof Dr. Guilherme Loureiro Werneck. 2011. Tese (Doutor em Epidemiologia) - Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. Seminar, Atlanta, v. 354, p. 1191–1199, 1999.

HORTA, R. S. et al. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno-histoquímica. Ciência Rural, Santa Maria, v. 42, n. 6, p. 1033-1039, 2012.

KO, D.; LIPNER, S. R. Onychogryphosis: Case Report and Review of the Literature. Skin appendage disorders: Novel Insights from Clinical Practice, 2018.

KOUTINAS, Alexander F. et al. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. *Veterinary dermatology*, v. 21, n. 6, p. 572-577, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (9 Ed.). Robbins & Cotran-Patologia. Elsevier Rio de Janeiro, 2016.

LAGES, G. F. G. Controle de qualidade em hematologia: enfoque para aparelhos automatizados. 2010. Monografia (Especialista em Análises Clínicas e Toxicológicas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, [S. I.], 2010.

LEAL-LIMA, A. et al. Tríade canina na Leishmaniose Visceral: Reservatório-vítima-sentinela. *Pubvet*, v.15, n.11, a952, p.1-14, Nov., 2021.

LEISHVET. Canine and feline leishmaniosis: practical management of canine and feline leishmaniosis. 4. ed. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2022. 27p. Disponível em: <<https://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2022/05/ALIVE-may22-web-EN.pdf>>

LIMA JÚNIOR, F. E. F. Fatores preditivos para leishmaniose Visceral Canina em quatro municípios endêmicos do Brasil. Orientador: Werneck, Guilherme Loureiro / Figueiredo, Fabiano Borges. 2012. Dissertação (Mestrado de Modalidade Profissional em Epidemiologia em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

LIMA, C.A. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma revisão. *PUBVET*, Londrina, V. 7, N. 25, Ed. 248, Art. 1641, Suplemento 1, 2013.

LIMA, I. D. S. Patologia da leishmaniose visceral canina: Ênfase no Significado da Resposta Inflamatória Granulomatosa no Fígado. UFBA FIOCRUZ, 2018.

MAIA, L. S. Leishmaniose Visceral Canina: Aspectos clínicos e hematológicos de casos suspeitos e confirmados atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília em 2011. Orientador: Ligia Maria Cantarino da Costa. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2013.

MELENDEZ-LAZO, A. et al. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Research in veterinary Science*, Londres, V.117, n.1, p.18-27, 2018.

MONTARGIL, S. M. A. et al. Clinical, Hematological and Biochemical Profiles of Dogs with *Leishmania infantum*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 46, n. 1548, 2018.

OLIVEIRA, C. S. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Trabalho de Conclusão de Curso, p. 121, 2018.

PAYANO, V. J. H. Avaliação dos achados clínicos, hematológicos e bioquímicos séricos em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* submetidos a tratamento experimental. Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves. 2018. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE, 2018.

REBELO, J. F. B. Contribuição para o estudo da leishmaniose canina e a sua importância em saúde pública. 2021. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2021

RIBEIRO, C. R. et al. Prevalência da leishmaniose visceral canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal - Brasil. *Cienc. Anim. Bras.*, Goiânia, v. 2, p. 1-8, 2019.

RIVERA, E. A. B. Ética na Experimentação Animal: em animais de laboratório: criação e experimentação. *Revista de Patologia Tropical*, Rio de Janeiro, v. 30, ed. 1, p. 9-14, 2001.

ROUBEN, C.; MCKAY, Lindsay. Claw and claw bed diseases. *Ask the experts, cliniciansbrief.com*, 2016

ROSA, D. B. S. K. et al. Avaliação do estresse oxidativo em cães com doença renal crônica. 2021.

SAITO, A. S. et al. Leishmaniose em Cães : Revisão De Literatura. *Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinaria*, p. 10, 2008.

SCHIMMING, B. C.; SILVA, J. R. C. P. e. Leishmaniose visceral canina – revisão de literatura,. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, p. 1–12, 2012.

SILVA, D. A. F. A influência de treinamento de habilidade no procedimento de punção venosa periférica em cães. Orientador: Prof.ª Dr.ª Rosa Maria Barilli Nogueira. 2019. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente - SP, 2019.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Trópica : Ciências Agrárias e Biológicas*, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 23-34, 2007.

SILVA, G. J. et al. Vigilância da Leishmaniose Visceral no Distrito Federal: aspectos organizacionais, situação epidemiológica e medidas intersetoriais. *Com. Ciências Saúde*, Brasília - DF, v. 28, n. 2, p. 149-157, 2017.

SILVA, K. R. Avaliação hematológica, bioquímica e clínica do uso de dietilditiocarbamato (DETC) no tratamento in vitro e in vivo da leishmaniose visceral canina natural e experimental. Orientador: Profa Dra Aldina Barral. 2016. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador-BA, 2016.

SILVA, K. R. et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 112, n. 1, p. 53-62, 2017. DOI 10.1590/0074-02760160305. Disponível em: memorias.ioc.fiocruz.br. Acesso em: 3 maio 2021.

SILVA, R. R. et al. Leishmaniose visceral em cães no Brasil: revisão de literatura. *Science and Animal Health*, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 54-75, 2021.

SOLCÀ, Manuela da Silva. Avaliação de biomarcadores de gravidade em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* classificados clinicamente e estratificados quanto à carga parasitária em estudos de corte transversal. 2016. Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, [S. l.], 2017.

SUBSECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE - DF, SECRETARIA DE SAÚDE (Distrito Federal). GDF. Ano 13 nº 1, março de 2021. Informativo Epidemiológico das Leishmanioses nº 1/ 2021 Comportamento epidemiológico das leishmanioses: no Distrito Federal, até a semana epidemiológica nº13, 2021, Brasília - DF, Março de 2021.

TANURE, A. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na localidade de Casa Branca, município de Brumadinho, área de transmissão para leishmanioses no Estado de Minas Gerais. Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou Programa , p. 111, 2017

TEIXEIRA, A. I. P. Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do controle da leishmaniose visceral canina. 2019.

VADEN, S. L. et al. Exames Laboratoriais e Procedimentos Diagnósticos em cães e gatos. 1. ed. São Paulo: ROCA, 2013.

WARREN, S. Claw disease in dogs: part 1–anatomy and diagnostic approach, part 2–diagnosis and management of specific claw diseases. *Companion Animal*, v. 18, n. 4 e 5, p. 165-170 e p.226-231, 2013.

WINCK, C. A.; SILVA, C. M. H. S. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, SC, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Formulário de Verificação de Sinais Clínicos

Identificação animal - Leish PIC

*Obrigatório

1. Sexo *

Marcar apenas uma oval.

- Macho
 Fêmea

2. Idade *

Marcar apenas uma oval.

- mais de 8 meses a menos de 12 meses
 1 ano a menos de 7 anos
 mais de 7 anos

3. Sintomatologia (Lima-Júnior, 2012) - MUCOSAS *

Marcar apenas uma oval.

- normocoradas
 hipocoradas
 hiperêmicas/ictéricas

4. Sintomatologia (Lima-Júnior, 2012) - ALOPECIA *

Marcar apenas uma oval.

- ausência
 localizada
 generalizada

5. Sintomatologia (Lima-Júnior, 2012) - LINFADENOMEGALIA *

Marcar apenas uma oval.

- ausência
 regional
 generalizada

6. Sintomatologia (Lima-Júnior, 2012), verificação de presença: *

Marque todas que se aplicam.

- desidratação
- lesões cutâneas
- emagrecimento/caquexia
- apatia
- descamação furfurácea
- pelo opaco
- úlceras crostosas
- onicogribose
- alterações oftálmicas
- esplenomegalia

7. Sintomatologia (Gouvêa, 2011), verificação de presença: *

Marque todas que se aplicam.

- epistaxe
- alopecia
- linfadenomegalia
- onicogribose
- alopecia periocular
- perda de peso/caquexia

8. Sintomatologia (Gouvêa, 2011), verificação de presença de alterações ou lesões: *

Marque todas que se aplicam.

- pele
- cabeça
- lábio/queixo
- focinho
- orelha
- olhos
- corpo
- membros

APÊNDICE B - Pontos de observação de alguns sintomas clínicos em LVC

Diagnóstico Clínico

