

PERFIL HEMATOLÓGICO E ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS SÉRICAS EM CÃES SOROPositIVOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

[Hematological and serum protein electrophoretical profiles of serum-positive dogs to visceral leishmaniasis from Rio Grande do Norte state, Brazil]

Alexandre Disraelly Fernandes da Silva¹, Maíra Conceição Jeronimo de Souza Lima², Benito Soto-Blanco³

¹Médico veterinário autônomo, Natal, RN

²Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN

³Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró, RN

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo determinar as alterações no hemograma e no perfil eletroforético de proteínas séricas de cães sintomáticos e soropositivos (ELISA) para leishmaniose visceral na cidade de Mossoró, RN. Foram coletadas amostras de sangue de 19 cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral, para realização do hemograma e do proteinograma. Os resultados revelaram alterações hematológicas bastante variadas nos cães avaliados, a maioria apresentando anemia arregenerativa; outro achado frequente foi leucopenia. Além disto, o proteinograma de todos os cães estudados apresentou alguma alteração; as mais frequentes foram hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, hipergamaglobulinemia e redução na relação albumina/globulinas. O perfil eletroforético revelou gamapatia policlonal. Assim, pode-se concluir que os perfis hematológico e eletroforético de proteínas séricas são importantes ferramentas para auxílio ao diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Palavras-Chave: *Leishmania*, proteínas séricas, proteinograma, albumina, globulinas, hematologia.

ABSTRACT - The present work aimed to determine the changes in complete blood count and electrophoretic separation of serum proteins assays in dogs seropositives to visceral leishmaniasis at Mossoró city, RN, Brazil. It was collected blood samples from 19 dogs with positive serology of visceral leishmaniasis for hemogram and proteinogram. The results revealed that hematological changes were remarkably inconstant at evaluated dogs, most ones presenting unregenerative anemia; another frequent finding was leucopenia. Furthermore, proteinogram from all studied dogs presented some disturbance; the most frequent were hyperproteinemia, hypoalbuminemia, hyperglobulinemia, hypergammaglobulinemia, and reduction on albumin/globulins ratio. The electrophoretic profile revealed polyclonal gammopathy. Thus, it was concluded that hematologic and serum proteins electrophoretic profiles are valuable tools for help on diagnostic of canine visceral leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania*, serum proteins, proteinogram, albumin, globulins, hematology.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC), também conhecida como calazar, é causada na América Latina pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, um parasita intracelular de células mononucleares (Maurício et al, 1999; Camargo et al., 2007; Dantas-Torres, 2007). É uma zoonose potencialmente fatal, de caráter crônico e debilitante, que já foi diagnosticada em quase todos estados do Brasil (Feitosa et al., 2000; Nunes et al, 2001; França-Silva et al, 2003; Caminha e Soto-Blanco, 2008). A transmissão é feita pelos mosquitos

Lutzomyia longipalpis e *Lutzomyia cruzi* (Santos et al., 1998; Missawa e Lima, 2006), e o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* pode albergar o parasita, mas ainda não se sabe se pode ser um transmissor da doença (Dantas-Torres et al., 2011). O cão é considerado o reservatório da doença (Palatnik-de-Sousa et al., 2001; Dantas-Torres, 2007). Também foram encontradas naturalmente parasitadas no Brasil outras espécies de canídeos silvestres (incluindo espécies *Chrysocyon brachyurus*, *Cercopithecus thous*, *Chrysocyon brachyurus*, *Lycalopex vetulus* e *Speototus venaticus*), algumas espécies de marsupiais (*Didephis albiventris* e

Didelphis marsupialis) e de roedores (*Cercomys cunicularis*, *Dasyprocta agouti* e *Oryzomys eliurus*) (Sherlock, 1996; Curi et al., 2006; Luppi et al., 2008; Souza et al., 2010), além do gato doméstico (Vides et al., 2011).

Entre as alterações clínicas mais frequentes da doença destacam-se alterações dermatológicas, onicogribose, linfadenopatia, esplenomegalia, hiporexia e apatia. As alterações dermatológicas ocorrem na maioria dos casos e o animal afetado pode apresentar um quadro clínico caracterizado por alopecia focal ou generalizada, lesões crostosas (principalmente no focinho, nas orelhas e nas extremidades) e descamação furfurácea entre outros sinais (Cavalcanti et al., 2005; Caminha e Soto-Blanco, 2008). Os linfonodos que mais comumente apresentam alterações são os poplíteos (Feitosa et al., 2000; Caminha e Soto-Blanco, 2008), apesar de outros poderem se evidenciar, principalmente na forma de linfadenomegalia pré-escapular (Nieto et al., 1992).

Existem basicamente três categorias de provas utilizadas para o diagnóstico: os métodos parasitológicos, os métodos imunológicos e os métodos moleculares (Brasil, 2003). Tem-se como a forma mais segura de diagnóstico a observação direta de formas amastigotas do parasito em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e até esfregaços sanguíneos de leishmaniose visceral canina. As provas sorológicas mais utilizadas são a imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), fixação de complemento e aglutinação direta (Brasil, 2003). Mais recentemente, foram desenvolvidas técnicas para determinação de IgG específicas para diagnóstico de leishmaniose canina utilizando citometria de fluxo (Carvalho et al., 2006; Andrade et al., 2009). A detecção molecular pode ser realizada com a técnica de PCR utilizando amostras de sangue (Gomes et al., 2007; Ikeda-Garcia e Marcondes, 2007) ou de swabs conjuntivais (Leite et al., 2010).

Há poucos trabalhos referentes aos achados de patologia clínica em cães no Brasil. Assim, o presente trabalho teve por objetivo realizar avaliação hematológica e perfil eletroforético de cães portadores de leishmaniose visceral na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 19 cães adultos, sem distinção de sexo ou raça, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-árido

(UFERSA), Mossoró, RN. Estes animais eram domiciliados em casas de alvenaria, todas situadas no perímetro urbano da cidade. Todos os animais estudados apresentavam sintomatologia clínica (alterações dermatológicas, onicogribose e/ou linfadenopatia) e eram sorologicamente positivos para leishmaniose visceral, em teste ELISA realizado em laboratório licenciado para esta análise pelo Ministério da Agricultura do Brasil (laboratório Hermes Pardini, Belo Horizonte, MG).

Foram coletadas amostras de sangue venoso, acondicionados em tubos com ou sem anticoagulante (EDTA). As amostras de sangue foram submetidas aos exames imediatamente após sua coleta. Foram realizados esfregaços sanguíneos e, após secarem, foram corados com Panótico Rápido. O hemograma foi realizado por meio de técnica manual (não automatizada) segundo procedimentos recomendados por Anthony e Sirois (2007). As amostras de soro foram mantidas refrigeradas individualmente; os exames foram realizados no mesmo dia, ou no máximo, no dia seguinte a cada coleta. Os níveis séricos de proteínas totais foram determinados com o auxílio de um refratômetro de uso clínico (Quimis[®], São Paulo, Brasil).

A migração eletroforética para separação das frações protéicas do soro foi realizada segundo a técnica de eletroforese em gel de agarose, por meio de sistema para eletroforese (SE-250, Celm[®], Barueri, SP, Brasil). Foram colocados 80 ml de solução tampão Tris pH 9,5 gelado em cada uma das duas cubas. Foi aplicado 0,5µl de cada soro em cada um dos locais de aplicação de amostra em filme de agarose (Celmigel Agarose Geral, Celm[®], Barueri, SP, Brasil). Em seguida, cada filme de agarose foi colocado em um porta-filme, coincidindo os pólos especificados, colocando assim os porta-filmes nas cubas. As cubas foram conectadas à fonte, e foi aplicada uma voltagem de 90 volts por 20 minutos. Terminado este período, foram retirados os porta-filmes, colocando-os sobre uma folha de papel toalha para eliminar o excesso da solução tampão. O filme foi retirado do porta-filme e mergulhado em um recipiente contendo 200ml de corante Negro de Amido a 0,2% em solução de ácido acético a 5%, deixando por 5 minutos sem agitar. Posteriormente foi retirado o excesso do corante com papel toalha e, então, o filme foi mergulhado em outro recipiente com 200ml de descorante ácido acético a 5% por 5 minutos. O excesso do descorante foi removido com papel toalha e o filme foi seco com o auxílio de um secador de cabelos comum, até que ficasse completamente seco. A identificação e quantificação das diferentes bandas eletroforéticas foram realizadas com o auxílio de um software

(DensitScan®), após a digitalização dos filmes corados.

Com os dados obtidos, foram calculadas as concentrações absolutas de cada banda eletroforética e da relação entre albumina e globulinas (relação A/G). A seguir, foram calculados as médias e desvios-padrões, com auxílio do software GraphPad Instant® versão 3.10.

RESULTADOS

Os valores médios dos hemogramas dos cães com leishmaniose estão apresentados na Tabela 1. Assim, 17 (89,5%) cães apresentaram anemia. Destes animais, 12 (63,2%) apresentaram anemia normocítica, quatro (21,1%) tinham anemia macrocítica, e um (8,3%), anemia microcítica. O CHCM estava reduzido (hipocromia) em três (15,8%) e aumentado em 12 (63,2%) dos cães avaliados. Com relação ao leucograma, sete (36,8%) cães apresentaram leucopenia e cinco (26,3%), leucocitose. A avaliação diferencial dos leucócitos destes animais revelou neutrofilia em cinco (26,3%) e neutropenia em um (5,3%), desvio à esquerda em cinco (26,3%), monocitose em seis (31,6%), eosinopenia e linfopenia em quatro (21,1%). A contagem do número de plaquetas revelou trombocitopenia em 6 (31,6%) cães e trombocitose em outros três (15,8%).

Os valores obtidos no proteinograma estão apresentados na Tabela 2. Os níveis plasmáticos de

proteínas totais estavam aumentados em 18 dos 19 (94,7%) cães, enquanto os de albumina estavam aumentados em um (5,3%) e reduzidos em 12 (63,2%) e de globulinas aumentados em todos (100%), sendo alfa-1-globulinas aumentados em sete (36,8%) e reduzidos em dois (10,5%), beta-globulinas aumentados em sete (36,8%) e reduzidos em cinco (26,3%), gama-1 aumentados em 14 (73,7%) e gama-2-globulinas aumentados em 16 (84,2%), mas todos os animais apresentaram níveis normais de alfa-2-globulinas. A relação média entre albumina e globulinas foi de $0,30 \pm 0,17$ (referência 0,50 – 1,11), sendo que 18 dos 19 (94,7%) cães apresentaram redução nesta relação em decorrência do aumento dos níveis plasmáticos das globulinas.

DISCUSSÃO

A maioria dos casos aqui observados apresentou anemia normocítica normocromica. Este tipo de anemia é caracterizada por redução na eritropoiese, e suas causas incluem baixos níveis séricos de eritropoetina, presença de doença inflamatória (primariamente crônica), hipoplasia ou aplasia da medula óssea, deficiências nutricionais e insuficiências endócrinas (Figuera, 2001; Stockham e Scott, 2002). A anemia normocítica ocorre frequentemente na leishmaniose (Pocai et al, 1998; Figuera et al, 2001; Caminha e Soto-Blanco, 2004), em decorrência do processo inflamatório. A anemia induzida pela inflamação possui três mecanismos fisiopatológicos: (1) redução no tempo de vida dos eritrócitos, em decorrência de aumento nos níveis de

Tabela 1. Valores médios do hemograma de 19 cães com leishmaniose visceral no município de Mossoró, RN. São apresentadas as médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão.

Parâmetro	Valores obtidos	Referência
Hemácias	$4,05 \pm 0,33 \times 10^6 / \text{mm}^3$	$5,5 - 8,5 \times 10^6 / \text{mm}^3$
Hematócrito	$28,1 \pm 2,26 \%$	37 – 55 %
Hemoglobina	$10,6 \pm 0,89 \text{ g\%}$	12 – 18 g%
Volume corpuscular médio (VCM)	$69,7 \pm 1,78 \text{ fl}$	60 – 77 fl
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	$44,0 \pm 3,32 \%$	32 – 36 %
Leucócitos	$13.547 \pm 2.973 / \text{mm}^3$	6.000 – 17.000 /mm ³
Neutrófilos segmentados	$10.738 \pm 2.552 / \text{mm}^3$	3.000 – 11.500 /mm ³
Neutrófilos bastonetes	$305 \pm 219 / \text{mm}^3$	0 – 300 /mm ³
Eosinófilos	$457 \pm 102 / \text{mm}^3$	100 – 1.250 /mm ³
Linfócitos	$1.388 \pm 223 / \text{mm}^3$	1.000 – 4.800 /mm ³
Monócitos	$1.226 \pm 249 / \text{mm}^3$	150 – 1.350 /mm ³
Plaquetas	$277 \pm 45,1 \times 10^3 / \text{mm}^3$	200 – 500 /mm ³

Valores de referência segundo Meinkoth e Clinkenbeard (2006)

Tabela 2. Níveis médios de proteínas séricas em 19 cães com leishmaniose visceral no município de Mossoró, RN.

Parâmetro	%	g/dl	Referência
Proteínas totais	-	9,64±1,27	5,4 – 7,1
Albumina	22,0±9,22	2,07±0,79	2,6 – 3,3
Globulinas (total)	78,0±9,22	7,57±1,69	2,7 – 4,4
Alfa-1 globulinas	4,86±2,07	0,45±0,16	0,2 – 0,5
Alfa-2 globulinas	6,60±3,00	0,63±0,29	0,3 – 1,1
Beta globulinas	23,4±13,3	2,20±1,19	1,3 – 2,7
Gama-1 globulinas	23,5±10,0	2,34±1,24	0,5 – 1,3
Gama-2 globulinas	19,6±8,75	1,94±1,04	0,4 – 0,9

Valores de referência segundo Kaneko et al. (2008)

intelectina-1 (IL-1); (2) distúrbios no metabolismo do ferro por interferência na produção de ferritina e alterações nos receptores de transferrina, reduzindo os estoques de ferro no organismo, mediado por citocinas da inflamação, incluindo IL-1, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon (INF); e (3) inibição da eritropoiese por ação de citocinas (IL-1, INF e TNF) sobre precursores da eritropoietina (Stockham e Scott, 2002). Os demais achados do hemograma são bastante variáveis, como observado no presente trabalho, e podem incluir leucopenia e trombocitopenia (Pocai et al, 1998; Figuera, 2001; Caminha e Soto-Blanco, 2004).

O perfil eletroforético das proteínas séricas obtido no presente trabalho também apresentou alteração, caracterizado por aumento amplo na faixa das gama-globulinas. Este tipo de aumento é caracterizado como gamapatia policlonal, sendo diferenciado da gamapatia monoclonal, que apresenta aumento das gama-globulinas de base estreita (Eckersall, 2008).

Os valores obtidos para o proteinograma foram bastante próximos aos descritos por Almeida e colaboradores (2005a), que utilizaram um sistema semelhante para a realização da separação eletroforética das proteínas séricas em cães com leishmaniose, procedentes dos estados da Bahia e de Pernambuco. Estes autores encontraram hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e redução da relação albumina e globulinas, semelhante ao aqui apresentado. No entanto, os dados sobre globulinas totais não foram calculados, mas a soma das médias apresentadas para as diferentes globulinas revelou um valor próximo ao do presente trabalho. O aumento das gama-globulinas observado nos cães com leishmaniose se deve principalmente à produção policlonal de anticorpos IgE, IgG, IgG1 e IgG2, resultando em uma resposta imune

caracterizada como Th2 (Almeida et al, 2005b). Também já foi evidenciada altas titulações séricas de IgM (Margarito et al., 1998; Martinez-Subiela et al., 2011) e IgA em cães com leishmaniose (Margarito et al., 1998). Assim, o aumento na produção de anticorpos anti-*Leishmania* sp deve ter sido o responsável pela hipergamaglobulinemia e contribuído para a redução na relação entre albumina e globulinas.

A hipoalbuminemia foi um achado frequente (63,2% dos casos) na avaliação do perfil eletroforético das proteínas séricas dos cães com leishmaniose. A redução dos níveis séricos de albumina pode ser atribuído a perda desta proteína do organismo, a redução na produção ou a uma combinação destes fatores (Eckersall, 2008). A perda seletiva da albumina pode ocorrer pela urina em decorrência à lesão renal (Grauer, 2005). A redução na produção pode ser decorrente de lesão hepática crônica, pois o fígado é o sítio de síntese da albumina (Sevelius e Andersson, 1995). Além disso, a hipoalbuminemia pode ser causada pelo processo inflamatório crônico, pois a albumina é uma proteína de fase aguda negativa (Eckersall, 2008). Todos estes fatores devem ter contribuído para a hipoalbuminemia, pois a leishmaniose é responsável por lesões renais e hepáticas, além de promover processo inflamatório crônico.

Também foi frequente (36,8% dos casos) a ocorrência de aumento nos níveis séricos de alfa-1- e beta-globulinas. Os aumentos das frações alfa- e beta-globulinas podem ser atribuídos à inflamação (Thomas, 2006). De fato, foi determinado que cães com leishmaniose apresentam na aumento da concentração sérica das proteínas de fase aguda haptoglobulina, amilóide sérico A e proteína C reativa (Martinez-Subiela et al., 2011). Na separação

eletroforética, as duas primeiras proteínas aparecem na fração alfa-globulinas, enquanto a proteína C reativa é uma beta-globulina (Thomas, 2006).

CONCLUSÃO

As alterações hematológicas foram bastante variáveis nos cães avaliados, sendo que a maioria destes apresentou anemia arregenerativa; outro achado frequente foi leucopenia. O proteinograma de todos os cães estudados apresentou alguma alteração; as mais frequentes foram hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, hipergamaglobulinemia e redução na relação albumina e globulinas. O perfil eletroforético revelou gamapatia policlonal.

REFERÊNCIAS

- Almeida M.A.O., Jesus E.E.V., Sousa-Atta M.L.B., Alves L.C., Berne M.E.A. & Atta A.M. 2005a. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet. Parasitol. 127:227-232.
- Almeida M.A.O., Jesus E.E.V., Sousa-Atta M.L.B., Alves L.C., Berne M.E.A. & Atta A.M. 2005b. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet. Immunol. Immunop. 106:151-158.
- Andrade R.A., Araújo M.S.S., Reis A.B., Gontijo C.M.F., Vianna L.R., Mayrink W. & Martins-Filho O.A. 2009. Advances in flow cytometric serology for canine leishmaniasis: diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. Vet. Immunol. Immunop. 128:79-86.
- Anthony E. & Sirois M. 2007. Hematology and hemostasis, p.27-73. In: Hendrix C.M. & Sirois M. (Ed.) Laboratory Procedures for Veterinary Technicians, 5.ed. St. Louis: Mosby Elsevier.
- Camargo J.B., Troncarelli M.Z., Ribeiro M.G. & Langoni H. 2007. Canine visceral leishmaniasis: aspects of public health and control. Clín. Vet. 12:86-92
- Caminha A.E.Q. & Soto-Blanco B. 2008. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina na cidade de Fortaleza, CE. Arch. Vet. Sci. 13:218-222.
- Cavalcanti M.P., Faustino M.A.G., Silva L.B.G. & Alves L.C. 2005. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. Clín. Vet. 58:36-42
- Curi N.H.A., Miranda I. & Talamoni S.A. 2006. Serologic evidence of leishmania infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian national park. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101:99-101.
- Dantas-Torres F. 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Vianna) braziliensis*. Vet. Parasitol. 149:139-146.
- Dantas-Torres F., Latrofa S.M. & Otranto D. 2011. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. Parasit. Vectors 4:56.
- Eckersall P.D. 2008. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias, p 117-155. In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Ed.) Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 6th ed. Burlington: Academic Press.
- Feitosa M.M., Ikeda F.A., Luvizotto M.C.R. & Perri, S.H.V. 2000. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). Clín. Vet. 28:36-44.
- Figuera R.A. 2001. Anemia em Medicina Veterinária. Santa Maria: O autor, 214p.
- Figueiredo F.B., Gremião I.D., Pereira S.A., Fedulo L.P., Menezes R.C., Balthazar T.M., Schubach T.M. & Madeira M.F. 2008. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 102:200-201.
- França-Silva J.C., Costa R.T., Siqueira A.M., Machado-Coelho G.L.L., Costa C.A., Mayrink W., Vieira E.P., Costa J.S., Genaro O. & Nascimento E. 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. Vet. Parasitol. 111:161-173.
- Gomes A.H., Ferreira I.M., Lima M.L., Cunha E.A., Garcia A.S., Araújo M.F. & Pereira-Chioccola V.L. 2007. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. Vet. Parasitol. 144:234-241.
- Grauer G.F. 2005. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. J. Small Anim. Pract. 46:469-478.
- Ikeda-Garcia F.A. & Marcondes M. 2007. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Clín. Vet. 71:34-42.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Ed.) 2008. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 6th ed. Burlington: Academic Press, p 889-895.
- Leite R.S., Ferreira S.A., Ituassu L.T., Melo M.N. & Andrade A.S.R. 2010. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swabs samples. Vet. Parasitol. 170:201-206.
- Luppi M.M., Malta M.C.C., Silva T.M.A., Silva F.L., Motta R.O.C., Miranda I., Ecco R. & Santos R.L. 2008. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. Vet. Parasitol. 155:146-151.
- Martinez-Subiela S., Strauss-Ayali D., Cerón J.J. & Baneth G. 2011. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis. Vet. Parasitol. in press.
- Maurício I.L., Howard M.K., Stothard J.R. & Miles M.A. 1999. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology 119:(Pt3):237-246.
- Meinkoth J.H. & Clinkenbeard K.D. 2006. Normal hematology of the dog, p.1057-1063. In: Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain N.C. (Eds.) Schalm's Veterinary Hematology, 5th ed. Ames: Blackwell.
- Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2003. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Série: Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 120p.
- Missawa N.A. & Lima G.B.M. 2006. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34:337-340.
- Nieto C.G., Navarrete I., Habela M.A., Serrano F. & Redondo E. 1992. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. Vet. Parasitol. 45:33-47.

Nunes V.L.B., Galati E.A.B., Nunes D.B., Zinezzi R.O., Savani E.S.M.M., Ishikawa E., Camargo M.C.G.O., D'Áuria S.R.N., Cristaldo G. & Rocha H.C. 2001. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34:301-302.

Palatnik-de-Sousa C.B., Santos W.R., França-Silva J.C., Costa R.T., Reis A.B., Palatnik M., Myrlink W. & Genaro O. 2001. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:510-517.

Pocai E.A., Frozza L., Headley S.A. & Graça D.L. 1998. Leishmaniose visceral (calazar): cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural 28:501-505.

Santos S.O., Arias J., Ribeiro A.A., Paiva H.M., Freitas R.A. & Malaco M.A. 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Med. Vet. Entomol. 12:315-317.

Sevelius E. & Andersson M. 1995. Serum protein electrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. Vet. Rec. 137:663-667.

Sherlock I.A. 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91:671-683.

Souza N.P., Almeida A.B.P.F., Freitas T.P.T., Paz R.C.R., Dutra V., Nakazato L. & Sousa V.R.F. 2010. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 43:333-335.

Stockham S.L. & Scott M.A. 2002. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Ames: Blackwell Publishing, p.85-154.

Thomas J.S. 2006. Protein electrophoresis, p.899-903. In: Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain N.C. (Eds.) Schalm's Veterinary Hematology, 5th ed. Ames: Blackwell.

Vides J.P., Schwardt T.F., Sobrinho L.S.V., Marinho M., Laurenti M.D., Biondo A.W., Leutenegger C. & Marcondes M. 2011. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. Vet. Parasitol. 178:22-28.