

AVALIAÇÃO LIQUÓRICA DE CÃES, COM E SEM SINTOMATOLOGIA NEUROLÓGICA, NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL

Cerebrospinal fluid (CSF) evaluation in dogs naturally infected with visceral leishmaniasis, with and without neurological symptoms

Mary Marcondes Feitosa¹, Fabiana Augusta Ikeda², Fábio Luís Bonello³, Paulo César Ciarlini⁴, Maria Esther Gonçalves², Valéria Marçal Félix de Lima⁵, Sílvia Helena Venturoli Perr⁶

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma enfermidade geralmente crônica caracterizada por hiporexia, linfadenopatia, lesões de pele, lesões oculares, epistaxe, claudicação, anemia, insuficiência renal e diarreia. A origem dos anticorpos no liquor de animais com leishmaniose ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que eles provenham do sangue, devido à lesão da barreira hematoencefálica, ou que sejam produzidos localmente. O presente trabalho teve como objetivos avaliar o liquor de 16 e 18 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com e sem sintomatologia neurológica, respectivamente. Determinou-se a proteína sérica total, a IgG sérica e os exames físico, citológico e a IgG no liquor. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de cães no que diz respeito ao aspecto, cor, densidade e pH do liquor. Nos cães sem e com sintomatologia neurológica observou-se uma contagem média de hemácias de $7,88 \pm 6,51/\text{ml}$ e $359,75 \pm 936,01/\text{ml}$, respectivamente. Os cães sem sintomatologia neurológica apresentaram contagem total de leucócitos dentro dos limites de normalidade ($4,25 \pm 1,73/\text{ml}$), enquanto os animais com sintomas neurológicos apresentaram uma elevação acentuada na média ($98,38 \pm 214,54/\text{ml}$), com predominância de linfócitos no exame citológico. Houve uma

elevação nos valores de proteína total líquórica no grupo com sintomatologia neurológica ($18,07 \pm 14,55\text{mg/dl}$), quando comparada ao grupo controle ($4,77 \pm 2,62 \text{ mg/dl}$). Dos 16 cães com sintomatologia neurológica, 68,8% apresentaram presença de IgG líquórica, enquanto apenas 27,3% dos 11 animais sem sintomatologia neurológica possuíam IgG anti-Leishmania no liquor.

Palavras-chave: líquido cefalorraquidiano, cães, leishmaniose visceral, sistema nervoso central

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a generally chronic disease characterized by hyporexia, enlargement of lymph nodes, skin lesions, ocular lesions, epistaxis, claudication, anemia, renal insufficiency and diarrhea. The origin of antibodies in the CSF of animals with leishmaniasis has not yet been completely clarified, but it is believed that they either come from the blood, due to the lesion of the hematoencephalic barrier, or they are produced locally. The present study aimed to analyze the CSF from 16 and 18 dogs naturally infected with visceral leishmaniasis, with and without neurological symptoms, respectively. Total serum protein, serum IgG, physical and cytological examinations and IgG in the CSF were determined. No statistically

¹ Médica Veterinária. Professora Assistente Doutora. Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal (DCCRA) – UNESP / Araçatuba. Rua Clóvis Pestana, 793. Bairro Jardim Dona Amélia. CEP: 16050-680. Araçatuba - SP

² Médicas Veterinárias. Pós-graduandas FMVZ – UNESP / Botucatu.

³ Médico Veterinário. Residente – UNESP / Araçatuba.

⁴ Médico Veterinário. Professor Assistente Doutor. DCCRA – UNESP / Araçatuba.

⁵ Bióloga. Professora Assistente Doutora. DCCRA – UNESP / Araçatuba.

⁶ Bacharel em estatística. Professora Assistente Doutora. Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP / Araçatuba.

significant differences were found between the two groups of dogs concerning CSF aspect, color, density, and pH. In the dogs without and with neurological symptoms a mean erythrocyte count of $7.88 \pm 6.51/\text{ml}$ and $359.75 \pm 936.01/\text{ml}$, respectively, was observed. Dogs without neurological symptoms presented total leukocyte count in the normal range ($4.25 \pm 1.73/\text{ml}$), while the animals with neurological symptoms presented a marked increase in the mean ($98.38 \pm 214.54/\text{ml}$), with predominance of lymphocytes in the cytological examination. There was an increase in the CSF total protein count in the group with neurological symptoms ($18.07 \pm 14.55 \text{ mg/dl}$), when compared to the control group ($4.77 \pm 2.62 \text{ mg/dl}$). From the 16 dogs with neurological symptoms, 68.8% presented IgG in the CSF, while only 27.3% from the 11 animals without neurological symptoms had anti-*Leishmania* IgG in the CSF.

Keywords: cerebrospinal fluid, dogs, visceral leishmaniasis, central nervous system.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma enfermidade causada pelo protozoário *Leishmania chagasi* (CUNHA e CHAGAS, 1937), transmitido pela picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. No ambiente doméstico o cão é considerado o principal reservatório epidemiológico (RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997). Neste cão a doença é geralmente crônica, caracterizada por um ou mais dos nove principais sintomas, quais sejam, hiporexia com perda de peso, linfadenopatia local ou generalizada, lesões de pele, lesões oculares, epistaxe, claudicação, anemia, insuficiência renal e diarreia (FERRER, 1999).

Existem contradições na literatura quanto à patogênese da leishmaniose visceral no sistema nervoso central. Noli (1999), relatou que se tem encontrado parasitas em todas as partes do corpo exceto, provavelmente, no sistema nervoso central (NOLI, 1999). Por outro lado, existem relatos da ocorrência de intensa deposição de antígenos de *Leishmania* e imunoglobulinas nos espaços intersticial e intravascular do plexo coróide de cães com leishmaniose visceral (GARCIA-ALONSO *et al.*, 1996; NIETO *et al.*, 1996). A origem dos anticorpos no liquor de animais com leishmaniose ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que eles provenham do sangue, devido à lesão da barreira hematoencefálica. No entanto, não se pode

excluir a possibilidade de que os antígenos de *Leishmania* induzam à formação intratecal de anticorpos (GARCIA-ALONSO *et al.*, 1996; NIETO *et al.*, 1996; NOLI, 1999; SLAPPENDEL e FERRER, 1998).

Os objetivos deste trabalho foram analisar o líquido cefalorraquidiano de cães com leishmaniose visceral, com e sem sintomatologia neurológica, a fim de determinar se existem e quais são as alterações líquóricas, além de determinar a presença de imunoglobulina G (IgG) no liquor e no soro destes animais, para verificar se existe uma lesão da barreira hematoencefálica com passagem de anticorpos do soro para o liquor, ou produção intratecal de anticorpos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados dois grupos de animais parasitologicamente e sorologicamente positivos para leishmaniose visceral, provenientes da cidade de Araçatuba – São Paulo, encaminhados ao Hospital Veterinário do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. O primeiro, constituído de 18 cães sem evidências clínicas de envolvimento neurológico e, o segundo, formado por 16 cães com quadro neurológico. O diagnóstico da doença foi realizado através do exame citológico de punção biópsia aspirativa de linfonodo e através de sorologia por ensaio imunoenzimático (ELISA). Foram colhidos 10 mL de sangue total por punção da veia jugular para a determinação da proteína sérica total e IgG e amostras de líquido cefalorraquidiano para exame físico, químico e citológico e pesquisa de IgG. As amostras de liquor foram obtidas por punção da cisterna magna, após anestesia dos animais com Pentobarbital sódico (Hypnol 3%). O volume de liquor colhido foi de aproximadamente 1,0 mL para cada 5 kg de peso corpóreo, de acordo com as recomendações de Chrisman (1985), e o limite máximo colhido variou de 2 a 3 mL por retirada. Por se tratar de área endêmica para leishmaniose visceral e, seguindo as recomendações do Ministério da Saúde, os animais foram eutanasiados com uma ampola de 10 mL de cloreto de potássio a 19,1% logo após a colheita do liquor.

Após a eutanásia, os cães foram necropsiados, o encéfalo e a medula foram colhidos e avaliados quanto à presença de alterações macroscópicas. Após a separação em dois hemisférios cerebrais, um deles foi fixado em formalina a 10% tamponada com fosfatos pH 7,2.

Após o período de fixação de aproximadamente 24 horas, colheu-se um fragmento do córtex frontal, ventrículo lateral, lobo piriforme, mesencéfalo, pedúnculo cerebelar, cerebelo, medula cervical, medula torácica e medula lombar. Os fragmentos foram incluídos em parafina e submetidos ao procedimento de rotina histopatológica. Cortes de 5 a 6 micrômetros de espessura foram corados pelo método da hematoxilina e eosina.

A proteína sérica total foi determinada através do método de biureto preconizado por Gornal *et al.* (1949) utilizando-se, para tanto, um espectrofotômetro digital SB-190, marca CELM.

As determinações do aspecto e da cor do liquor foram realizadas comparando-se um tubo de água destilada frente ao tubo contendo liquor, ambos contra uma superfície branca e uma folha com letras impressas. A densidade foi determinada por refratômetro de ABBE (ATAGO CO LTDA.), e os valores de pH, através de tira reagente MERCK. A contagem do número total de células foi realizada em câmara de Fuchs-Rosenthal, com liquor não diluído. Para realizar a contagem diferencial de células, as amostras foram centrifugadas em citocentrífuga modelo 2000D (REVAN). Após a retirada das lâminas, as mesmas foram secas e o esfregaço corado pelo corante de Rosenfeld, contando-se 100 células em cada esfregaço. A proteína total líquórica foi avaliada pelo método Kit Microprote da DOLES (DOLES - Reagentes e equipamentos para Laboratórios LTDA), e as globulinas através do teste de Pandy segundo Coles (1980).

A presença de IgG no soro e no liquor foi determinada através da técnica de ELISA (LIMA *et al.*, 2003). As microplacas foram cobertas com antígeno total de lisados de promastigotas de *Leishmania chagasi* isolados a partir de animal portador de leishmaniose visceral da cidade de Araçatuba, numa concentração de 20 mg/ml (RIERA *et al.*, 1999) em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6, e incubadas "overnight" a 4°C. Após a lavagem com PBS-tween por três vezes, as placas foram bloqueadas com 200 ml de PBS-BSA 1% e incubadas à temperatura ambiente durante duas horas. Após nova lavagem com PBS-tween por três vezes, 100 ml do soro controle positivo, do soro controle negativo (animal de área não endêmica saudável) e das amostras dos soros dos animais portadores de leishmaniose visceral com e sem quadro neurológico, diluídas 1:400 em PBS contendo 0,05% de tween 20 e 1% de BSA, foram adicionadas a cada poço e incubadas por três horas à

temperatura ambiente. Após quatro lavagens com PBS-tween 20, foi adicionado à placa 100 ml de anticorpo anti-IgG de cão, marcado com peroxidase previamente titulado. Após a incubação por uma hora em temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada quatro vezes com PBS-tween 20 e foram adicionados 100 ml de uma solução contendo substrato ortofenilenodiamino (OPD) (0,4 mg/ml) em diluente apropriado. A reação foi parada adicionando-se a cada poço 50 ml de H₂SO₄ 1M e a densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 492nm, utilizando o leitor de ELISA (Labsystems Multiskan EX). Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em triplicata.

RESULTADOS

A proteína sérica total média dos cães sem e com sintomatologia neurológica foi respectivamente, 8,42 e 6,60 g/dl.

Todas as amostras de liquor dos cães sem sintomatologia neurológica eram incolores e apresentaram um aspecto límpido e transparente. Já nos animais com sintomatologia neurológica, observou-se um aspecto turvo ou discretamente turvo em 20% das amostras. Dos animais com sintomatologia neurológica, 25% possuíam um liquor discretamente xantocrômico. Estatisticamente, não foram constatadas diferenças entre os dois grupos de cães no que diz respeito ao aspecto e à cor do liquor. A densidade média do liquor de todos os cães permaneceu dentro da faixa de normalidade, variando de 1008 a 1010. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos experimentais no que diz respeito aos valores médios de pH, cujos valores individuais variaram entre 7,0 e 9,0.

Nos cães sem e com sintomatologia neurológica observou-se uma contagem média de hemácias de $7,88 \pm 6,51/\text{ml}$ e $359,75 \pm 936,01/\text{ml}$, respectivamente. Os cães sem sintomatologia neurológica apresentaram contagem total de leucócitos dentro dos limites de normalidade; $4,25 \pm 1,73/\text{ml}$. Por outro lado, os animais com sintomas neurológicos apresentaram uma elevação acentuada na média; $98,38 \pm 214,54/\text{ml}$ ($p < 0,0001$). O exame citológico do liquor dos animais sem sintomatologia neurológica evidenciou uma predominância de linfócitos (60 a 70%), seguido de monócitos (20 a 30%) e raros neutrófilos segmentados. A citologia diferencial dos cães com quadro neurológico encontra-se apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Exame citológico do líquor de cães portadores de leishmaniose visceral com sintomatologia neurológica. Média, desvio padrão e mediana. (Distribuição em porcentagem: 100 células diferenciadas). (Araçatuba – SP, 2004)

Animal	Linfócitos	Monócitos	Neutrófilos Segmentados	Macrófagos	Eosinófilos
1	77%	10%	11%	2%	Ausentes
2	75%	21%	4%	Ausentes	Ausentes
3	74%	6%	19%	Ausentes	Ausentes
4	90%	2%	8%	Ausentes	Ausentes
5	84%	10%	6%	Ausentes	Ausentes
6	18%	8%	74%	Ausentes	Ausentes
7	90%	8%	2%	Ausentes	Ausentes
8	92%	8%	Ausentes	Ausentes	Ausentes
9	72%	16%	12%	Ausentes	Ausentes
10	40%	2%	58%	Ausentes	Ausentes
11	72%	28%	Ausentes	Ausentes	Ausentes
12	70%	24%	6%	Ausentes	Ausentes
13	82%	18%	Ausentes	Ausentes	Ausentes
14	67%	31%	2%	Ausentes	Ausentes
15	69%	31%	Ausentes	Ausentes	Ausentes
16	65%	35%	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Média	71,06	16,13	12,63	-	-
Mediana	73	13	5	-	-
Desvio Padrão	18,87	10,97	21,72	-	-

No animal N6 verificou-se a presença de *Cryptococcus sp.* quando da avaliação citológica do líquor (Figura 1).

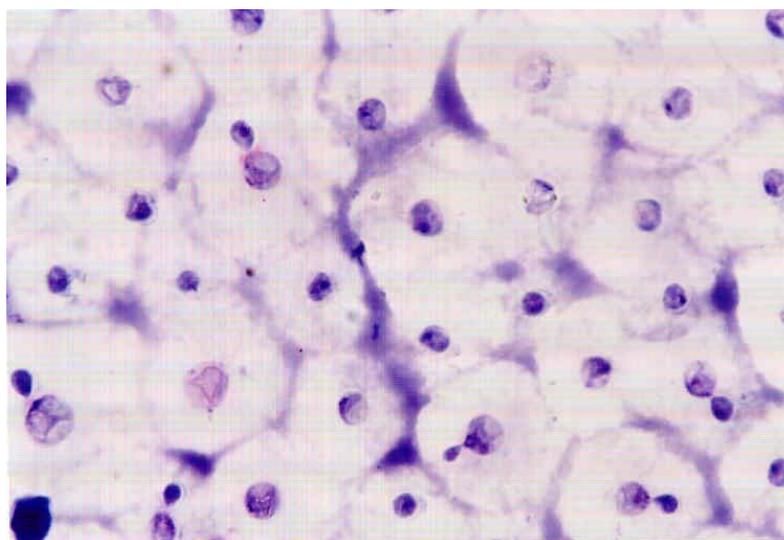


Figura 1. Fotomicrografia do líquido cefalorraquidiano de animal portador de leishmaniose visceral. Observar a presença de *Cryptococcus sp.* HE, 1000X.

Houve uma elevação nos valores de proteína total líquórica no grupo com sintomatologia neurológica $18,07 \pm 14,55$ mg/dl, quando comparada ao grupo controle $4,77 \pm 2,62$ mg/dl ($p < 0,0001$).

A avaliação da presença de imunoglobulina G sérica nos animais portadores de leishmaniose visceral sem sintomatologia neurológica, evidenciou um resultado positivo em 89% dos cães. Os outros 11%, apesar de apresentarem resultado negativo na

avaliação sorológica através de ELISA, foram positivos quando realizada a punção biópsia aspirativa de linfonodo, apresentando, ambos, grande quantidade de formas amastigotas no esfregaço. Por outro lado, a avaliação da presença de imunoglobulina G sérica nos animais portadores de leishmaniose visceral com sintomatologia neurológica, evidenciou um resultado positivo em apenas quatro dos quatorze animais avaliados. No entanto, todos os cães apresentavam punção

Tabela 2. Determinação de imunoglobulina G no liquor de cães portadores de leishmaniose visceral com e sem sintomatologia neurológica. Número, percentagem de animais e estatística calculada. (Araçatuba – SP, 2004)

Variável	Categoria	Com Sintomas Neurológicos		Sem Sintomas Neurológicos		Total		P ⁽¹⁾
		N	%	N	%	N	%	
		IgG no LCR	Negativo	5	31,2	8	72,7	
	Positivo	11	68,8	3	27,3	14	51,9	
	Total	16	100,0	11	100,0	27	100,0	

⁽¹⁾ nível descritivo do teste Qui-quadrado.

Tabela 3. Correlação entre a presença de imunoglobulina G no liquor e no soro de cães portadores de leishmaniose visceral com e sem sintomatologia neurológica. Número, percentagem de animais e estatística calculada. (Araçatuba – SP, 2004)

Grupo	IgG no LCR	IgG no Soro				Total		P ⁽¹⁾	Kappa
		Positivo		Negativo		N	%		
		N	%	N	%				
Controle	Positivo	11	68,8	0	0,0	11	68,8	0,083	0,478
	Negativo	3	18,7	2	12,5	5	31,2		
	Total	14	87,5	2	12,5	16	100,0		
Neurológico	Positivo	1	10,0	2	20,0	3	30,0	1,000	0,048
	Negativo	2	20,0	5	50,0	7	70,0		
	Total	3	30,0	7	70,0	10	100,0		

⁽¹⁾ nível descritivo do teste de McNemar.

biópsia aspirativa de linfonodos e/ou de medula óssea positiva, com presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.*

As alterações histopatológicas mais freqüentemente observadas nos animais do grupo controle foram: leptomeningite, satelitose, neuronofagia e neurônios escuros. Nos animais do

grupo neurológico as alterações histopatológicas mais freqüentemente observadas foram leptomeningite, satelitose, neuronofagia, microgliose focal, gliose difusa e neurônios escuros. No exame histopatológico do cerebelo do animal N2 foi possível a visualização de corpúsculos de Lentz; no cerebelo do animal N5 observou-se a presença de um cisto próximo ao pedúnculo cerebelar, que após a realização de sorologia, identificou-se como *Toxoplasma gondii* e, no cão N6, evidenciou-se a presença de *Cryptococcus sp.* na região do cerebelo.

DISCUSSÃO

Não existe na literatura veterinária descrição de sintomatologia neurológica associada à leishmaniose visceral canina, e a literatura médica também é escassa na descrição de quadros neurológicos associados à doença. Chungue *et al.* (1985) relataram a ocorrência de tremores generalizados em um paciente portador de leishmaniose visceral. Já Karak *et al.* (1998), descreveram um caso de um paciente portador de leishmaniose visceral com sintomatologia característica de distúrbio cerebelar unilateral e paralisia unilateral de nervo facial, associada a uma infecção por herpes zoster. Neste caso, os sinais clínicos se justificavam pela presença de uma cerebelite e neuropatia periférica de causa viral. Nos cães com meningoencefalite associada ao quadro de leishmaniose visceral, verificou-se a presença de convulsões generalizadas em vários animais; alterações visuais tais como cegueira, anisocoria e midríase bilateral; sinais de paralisia de nervos cranianos (estrabismo, ptose facial, disfagia); sinais de envolvimento vestibular e cerebelar (inclinação da cabeça, nistagmo, incoordenação motora, quedas, tremor de intenção); tetraparesia e tetraplegia; mioclonias; vocalização; andar em círculos e episódios de perseguição à cauda. Os sinais observados denotam um envolvimento central generalizado, atingindo córtex cerebral, tronco encefálico, cerebelo, e medula.

Os animais com sintomatologia neurológica, que apresentavam um aspecto turvo ou discretamente turvo e uma coloração xantocrômica no liquor, possuíam também as mais altas contagens celulares e protéicas, o que poderia justificar tal alteração, corroborando os relatos de Mayhew e Beal (1980) e Cook e Denicola (1988), os quais afirmaram que a turbidez do liquor indica um aumento da celularidade ou da concentração de proteínas da amostra, e de Feldman (1989), que relatou que uma coloração xantocrômica ocorre

geralmente como resultado da desintegração de hemácias dentro do espaço subaracnóide ou por aumento de proteínas no liquor.

Segundo Cook e Denicola (1988) e Bailey e Vernau (1997), um liquor normal não possui hemácias, contudo, nas amostras estudadas observou-se a presença de alguns eritrócitos, confirmando as observações de REIS *et al.* (1980), os quais afirmaram que o estudo cuidadoso do liquor revela a presença de raros eritrócitos em muitas amostras. Cinco animais com sintomatologia neurológica apresentavam uma elevação na contagem de hemácias, provavelmente devido à contaminação da amostra com sangue no momento da colheita.

Apesar de existirem discordâncias na literatura com relação ao número total de leucócitos de um liquor normal, a maioria dos autores concorda que este número deve ser menor que oito leucócitos/ml (BAILEY e VERNAU, 1997; BENJAMIN, 1978; CHRISMAN, 1985; KAY *et al.*, 1974; SPANO e HOERLEIN, 1978). Os cães portadores de leishmaniose visceral sem sintomatologia neurológica apresentaram contagem total de células dentro dos limites de normalidade. Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a contagem global de leucócitos do liquor de cães sem e com sintomatologia neurológica, observando-se uma elevação acentuada na média do último grupo. Dos cães avaliados, dois apresentavam contagens dentro da faixa da normalidade, apesar da sintomatologia neurológica. Não foi possível correlacionar a elevação do número de leucócitos com a severidade do quadro clínico. Nos animais sem sintomatologia neurológica a contagem diferencial das células revelou uma predominância de células mononucleares, principalmente linfócitos e alguns monócitos, como observado em amostras de liquor de cães sadios (BAILEY e VERNAU, 1997; CHRISMAN, 1985; COLES, 1980). Nos cães com sintomatologia neurológica verificou-se uma predominância de linfócitos em quase todas as amostras. A reação por células linfocitárias é a mais freqüente em enfermidades neurológicas. São estas as células da fase inflamatória subaguda e aparecem também como elementos dominantes no quadro citológico de processos crônicos. A reação celular linfocitária é observada nas meningites virais, nas meningoencefalites, em algumas parasitoses do sistema nervoso central e na criptococose em sua fase de evolução (REIS *et al.*, 1980). Desta forma os achados no exame citológico diferencial do liquor dos cães com sintomatologia neurológica foram compatíveis com uma meningoencefalite causada pela *Leishmania sp.* e pela presença de outros agentes infecciosos tais como o *Toxoplasma gondii*,

o *Cryptococcus sp.* e o vírus da cinomose. No presente experimento, não se observou a presença de formas amastigotas de *Leishmania* em nenhuma amostra de liquor.

Os valores obtidos na determinação de proteína total líquórica dos animais do grupo controle, foram inferiores aos descritos por vários autores (BENJAMIN, 1978; COLES, 1980; COOK e DENICOLA, 1988; FERNANDES, 1990; MARCONDES, 1992). Os baixos níveis de proteína líquórica refletem, provavelmente, uma hipoproteinemia observada em todos os animais do grupo controle. A proteína líquórica consiste basicamente de albumina, já que em cães sem lesões neurológicas somente esta fração consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BENJAMIN, 1978; COLES, 1980). Por outro lado, nos cães portadores de leishmaniose visceral, com sintomatologia neurológica, houve uma elevação dos valores médios de proteína total líquórica, que passou de 4,77 mg/dl em cães sem sintomatologia neurológica para 18,07 mg/dl, a despeito da hipoproteinemia observada em vários animais. Apesar desses valores ainda permanecerem dentro da faixa de normalidade sugerida pela maioria dos autores, a elevação nos níveis de proteína líquórica foi significativa, sugerindo uma resposta a um processo inflamatório ou infeccioso a nível de sistema nervoso central.

Em nenhum cão do grupo controle observou-se turbidez do liquor com a adição do reativo de Pandy, sugerindo ausência de globulinas líquóricas. No grupo de animais com sintomatologia neurológica verificou-se a presença de globulinas em 10 dos 16 cães (62,5%), evidenciando uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Apesar do teste de Pandy não ser específico para um tipo particular de globulina, ele é relativamente sensível e apresenta uma boa correlação com métodos mais sofisticados de quantificação de IgG em cães. (COOK e DENICOLA, 1988). Em alguns cães foi possível correlacionar a presença de turbidez no liquor quando da adição do reativo de Pandy, com a elevação dos níveis protéicos. Entretanto, dois animais com níveis protéicos próximos à média do grupo controle, apresentavam uma discreta turbidez ao reativo de Pandy. A presença de globulinas no liquor pode ocorrer devido a uma lesão da barreira hematoencefálica com passagem de globulinas do sangue, ou devido a uma produção local de anticorpos. Ao verificarmos os resultados da determinação de IgG no liquor de cães do presente experimento constatamos que a maioria dos cães do grupo controle apresentou presença do anticorpo no liquor, a despeito do teste de Pandy

negativo. A explicação para o ocorrido se baseia no fato do teste de ELISA ser um dos métodos mais sensíveis para a detecção de anticorpos. Em contrapartida, cinco animais do grupo com sintomatologia neurológica apresentavam em teste de ELISA negativo, com positividade ao reativo de Pandy. Uma possível explicação seria a presença, no liquor, de anticorpos contra agentes oportunistas, e não contra a própria leishmania, pois em três deles verificou-se a presença, histologicamente, de outro agente infeccioso, no caso, o vírus da cinomose, evidenciado pela presença de corpúsculos de Lentz, *Toxoplasma gondii* e *Cryptococcus sp.*

A observação de que alguns animais apresentavam resultados negativos na avaliação sorológica se deve, provavelmente, ao fato destes encontrarem-se ainda na fase inicial da doença e não terem realizado soroconversão ou, porque, segundo a literatura, muitos cães permanecem soronegativos durante toda a evolução da doença (FERRER *et al.*, 1995).

Apesar de não ter sido observada uma correlação estatisticamente significativa entre a presença de IgG no liquor e no soro dos cães do grupo controle, 69% dos cães avaliados apresentavam IgG líquórica e sérica. Pelo fato dos mesmos não apresentarem sintomatologia neurológica, sugere-se que a IgG líquórica seja decorrente de uma quebra da barreira hematoencefálica, com passagem de anticorpos séricos para o liquor. O exame histopatológico do sistema nervoso central destes cães, evidenciou alterações inflamatórias e degenerativas, apesar da ausência de sinais neurológicos. Talvez, com a evolução da doença, se os cães não tivessem sido eutanasiados, poderiam aparecer sintomas neurológicos.

Garcia-Alonso *et al.* (1996), avaliando a presença de IgG sérica e líquórica em 27 cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, com ausência de sinais neurológicos, constataram a presença de IgG sérica em todos os cães e a presença de IgG líquórica em apenas 48% dos mesmos. De acordo com os autores, a origem das imunoglobulinas presentes no liquor não está clara, entretanto, os mesmos sugerem que elas sejam provenientes de uma lesão da barreira hematoencefálica, uma vez que foram encontrados extensos depósitos de antígenos de leishmania e de imunoglobulinas nos espaços intersticiais e intravasculares do plexo coróide desses cães. Entretanto, não é possível descartar a possibilidade de que a transferência de antígenos de *Leishmania* para o sistema nervoso central tenha levado a uma produção intratecal de anticorpos, como ocorre em

casos de malária (GARCIA-ALONSO *et al.*, 1996).

Por outro lado, nos animais com sintomatologia neurológica verificou-se uma positividade no liquor em apenas 27,3% dos cães. Destes, apenas um cão (N6) apresentava presença de IgG sérica, que poderia justificar a IgG líquórica devido a uma lesão da barreira hematoencefálica com passagem da imunoglobulina do sangue para o liquor. É possível também, que possa ter havido uma produção intratecal de anticorpos contra a leishmania, particularmente nos outros dois animais que não apresentavam IgG sérica (N14 e N15). Não temos subsídios suficientes para determinar se houve realmente uma produção de anticorpos no sistema nervoso central, sem que houvesse um estímulo sistêmico associado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte técnico e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, C.S.; VERNAU, W. Cerebrospinal fluid. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, p.785-827, 1997.
- BENJAMIN, M. Cerebrospinal fluid examination. In: _____. **Outline of Veterinary Clinical Pathology**. Ames: Iowa State University Press, p.276-285, 1978.
- CHRISMAN, C.L. Investigações Auxiliares Especiais. In: _____. **Neurologia dos pequenos animais**. São Paulo: Livraria Roca, p.63-69, 1985.
- CHUNGE, C.N.; GACHIHI, G.; MUIGAI, R. Is neurological involvement possible in visceral leishmaniasis in Kenya? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.79, n.6, p.872, 1985.
- COLES, E.H. **Cerebrospinal fluid**. In: Veterinary clinical pathology. Philadelphia: W.B.Saunders, p.362-376, 1980.
- COOK, J.R.; DENICOLA, D.B. Cerebrospinal fluid. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.18, n.3, p.475-499, 1988.
- FELDMAN, B.F. Cerebrospinal fluid. In: KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, p.835-865, 1989.
- FERNANDES, W.R. Determinação dos valores líquóricos normais de glicose, proteína, globulina, uréia, creatinina fosfoquinase (CK), aspartato amonitransferase (AST), leucócitos e da coloração, turbidez e coagulabilidade em cães sadios. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v.27, n.2, p.209-216, 1990.
- FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain, p.6-10, 1999.
- FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v.136, p.514-516, 1995.
- GARCÍA-ALONSO, M.; NIETO, A.G.; BLANCO, A.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunol.**, v.18, p.539-546, 1996.
- GORNAL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum protein by means of biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v.177, p.751-766, 1949.
- KARAK, B.; GARG, R.K.; MISRA, S.; SHARMA, A.M. Neurological manifestations in a patient with visceral leishmaniasis. **Postgrad. Med. J.**, v.74, n.873, p.423-425, 1998.
- KAY, W.J.; ISRAEL, E.; PRATA, R. Cerebrospinal fluid. **Vet. Clin. North Am.**, v.4, n.2, p.419-435, 1974.
- LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, n.4, p.485-489, 2003.
- MARCONDES, M.. **Avaliação física, citológica e bioquímica do líquido cefalorraquidiano de cães normais e de cães jovens portadores de cinomose**. Botucatu, 1992. 84p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MAYHEW, I.G.; BEAL, C.R. Techniques of analysis of cerebrospinal fluid. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.10, p.155-176, 1980.

NIETO, C.G.; VIÑUELAS, J.; BLANCO, A.; GARCÍA-ALONSO, M.; VERDUGO, S.G.; NAVARRETE, I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Vet. Rec.**, v.139, p.346-347, 1996.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, v.9, n.2, p.16-24, 1999.

REIS, J.B.; BEI, A.; REIS FILHO, J.B. **Líquido cefalorraquidiano**. São Paulo: Sarvier, 1980. 250p.

RIBEIRO, V.M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. ano3, n.11, p.13-14, 1997.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clinica Veterinária**, ano II, n.11, p. 24-28, 1997.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: W.B.Saunders Co., p.450-458, 1998.

SPANO, J.S.; HOERLEIN, B.F. Laboratory examinations. In: _____ HOERLEIN, B.F. **Canine Neurology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1978. p.136-149.