

## DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA ATRAVÉS DE CITOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DA CONJUNTIVA OCULAR

Renata Maria Monção da Silva<sup>1</sup>, Inajara Nakamura Hirota<sup>2</sup>, Maria Fernanda Mamona Alves<sup>3</sup>, Helena Rahy Brandão<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Pós-graduanda em Oftalmologia Veterinária Anclivepa SP

<sup>2</sup> Pós-graduada em Oftalmologia Veterinária Anclivepa SP

<sup>3</sup> Graduanda em Medicina Veterinária – Centro Universitário de Excelência – UNEX – Feira de Santana - Bahia

<sup>4</sup> Médica Veterinária especializada em patologia clínica – Feira de Santana - Bahia  
Email: renatatopasio@gmail.com

Recebido em: 15/11/2023 – Aprovado em: 15/12/2023 – Publicado em: 30/12/2023

DOI: 10.18677/EnciBio\_2023D10

### RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LCV) é uma doença que apresenta caráter crônico e acomete mamíferos domésticos e silvestres como marsupiais, canídeos e xenartras. O objetivo deste relato foi descrever o uso de citologia conjuntival utilizando o método de coleta por escova interdental e histopatologia no diagnóstico de leishmaniose em um canino, Pug, seis anos, que apresentava apenas sinais oculares. Ao exame oftálmico o paciente apresentou diminuição da produção lacrimal bilateralmente com valores de TLS de 8 e 9 mm/min nos olhos direito e esquerdo respectivamente, sendo diagnosticado com ceratoconjuntivite seca (CCS). Durante a avaliação da superfície ocular foi possível observar hiperemia conjuntival e presença de diversos nódulos na conjuntiva de aproximadamente 0,3 cm, caracterizando um quadro de conjuntivite que é comum de ocorrer nos quadros de leishmaniose. A citologia revelou amostra de alta celularidade composta predominantemente por neutrófilos íntegros e macrófagos em atividade fagocitária (amastigotas de *Leishmania* sp.). Notaram-se frequentes plasmócitos, ocasionais linfócitos pequenos bem diferenciados, formas amastigotas de *Leishmania* sp. livres e numerosos eritrócitos. Concluindo que os achados eram compatíveis com inflamação crônica ativa associada à infecção por *Leishmania* sp. No exame histopatológico formas amastigotas de *Leishmania* também foram identificadas. Destaca-se aqui a importância do uso de outras técnicas como a citologia e a histopatologia de conjuntiva para diagnóstico da doença. A citologia com escova interdental e a histopatologia da conjuntiva foram eficazes para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no tecido conjuntival.

**PALAVRAS-CHAVE:** Amastigotas; Conjuntivite; *Leishmania* sp.

## DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS USING CYTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY OF THE OCULAR CONJUNCTIVE

### ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (LCV) is a chronic disease that affects domestic and wild mammals such as marsupials, canids and xenarthras. The objective of this report was to describe the use of conjunctival cytology using the interdental brush collection method and histopathology in the diagnosis of leishmaniasis in a canine, Pug, six years old, who presented only ocular signs. Upon ophthalmic examination, the patient showed decreased tear production bilaterally with TLS values of 8 and 9 mm/min in the right and left eyes respectively, being diagnosed with keratoconjunctivitis sicca (CCS). During the evaluation of the ocular surface, it was possible to observe conjunctival hyperemia and the presence of several nodules in the conjunctiva measuring approximately 0.3 cm, characterizing a condition of conjunctivitis that is common to occur in cases of leishmaniasis. Cytology revealed a high cellularity sample composed predominantly of intact neutrophils and macrophages in phagocytic activity (*Leishmania* sp. amastigotes). Frequent plasma cells, occasional small well-differentiated lymphocytes, amastigote forms of *Leishmania* sp. free and numerous erythrocytes. Concluding that the findings were compatible with active chronic inflammation associated with *Leishmania* sp. During histopathological examination, amastigote forms of *Leishmania* were also identified. The importance of using other techniques such as cytology and conjunctival histopathology to diagnose the disease is highlighted here. Interdental brush cytology and conjunctival histopathology were effective in detecting amastigote forms of *Leishmania* sp. in conjunctival tissue.

**KEYWORDS:** Amastigotes; Conjunctivitis; *Leishmania* sp.

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LCV) é uma doença que apresenta caráter crônico e acomete mamíferos domésticos e silvestres como marsupiais, canídeos e xenarthras. Apesar disto o cão doméstico é considerado como o principal reservatório da doença devido a sua grande proximidade com os humanos, o que torna a transmissão zoonótica possível (COURTENAY *et al.*, 2017; ALVES; FONSECA, 2018; ALCOVER *et al.*, 2020). A patologia é provocada por protozoários do gênero *Leishmania* spp., cuja transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo do flebotômíneo *Lutzomyia longipalpis* (GÁLVEZ *et al.*, 2018; BURZA; BOELAERT, 2018).

É uma doença de distribuição mundial, contudo regiões geográficas de clima tropical apresentam maior frequência de casos (BONDAN; CAMARGO, 2015). Apesar da espécie *Leishmania infantum* ser considerada como o principal foco de pesquisas, em função da sua extensiva prevalência em regiões subdesenvolvidas do planeta, existem relatos científicos que comprovam presença de outras espécies etiológicas (READY, 2014). Na literatura encontram-se relatos da presença de *Leishmania donovani* em regiões subtropicais da Índia (SRIVASTAVA *et al.*, 2011), contudo se considerar o continente americano de forma geral, a espécie *L. infantum*, apresenta maior prevalência, sendo que o Brasil possui numerosas regiões endêmicas para a enfermidade (AZEVEDO *et al.*, 2019).

Com relação a apresentação clínica, os animais portadores da LVC podem apresentar-se sintomáticos ou assintomáticos a depender da resposta imunológica que apresentem (GREENE, 2015, RIBEIRO *et al.*, 2019). As principais

sintomatologias da doença estão relacionadas aos sinais inespecíficos tais como: emagrecimento progressivo, apatia, hiporexia ou anorexia, linfadenopatia, atrofia muscular e hepatoesplenomegalia (BARBOSA *et al.*, 2012). Além destes, os animais portadores podem apresentar insuficiência renal, polimiosite, poliartrite, proteinúria, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (NARANJO *et al.*, 2012). Sinais dermatológicos são achados frequentes como dermatite granulomatosa ou ulcerativa, hiperqueratose, descamação, úlceras mucocutâneas, onicogribose. Também podem ocorrer alterações respiratórias (ABIATI *et al.*, 2019; AZEVEDO; MARCILI, 2020).

Durante a avaliação clínica dos animais com LCV não é incomum observar manifestações oculares e muitas vezes pode ser o único sinal que o paciente apresenta (DI PIETRO *et al.*, 2016). Diversos estudos trazem como resultado a ocorrência de 16% a 80,5% (BRITO *et al.*, 2010; EGUCHI *et al.*, 2017), sendo observadas principalmente alterações no segmento anterior, normalmente de forma bilateral e dentre as alterações mais frequentes tem-se blefarite, ceratoconjuntivite seca e uveíte anterior (DI PIETRO *et al.*, 2016). De forma bastante comum a blefarite é encontrada em associação com dermatite facial e ceratoconjuntivite seca (CARDOSO *et al.*, 2021).

O diagnóstico da LVC é dificultado pela quantidade de animais infectados que são assintomáticos e oligossintomáticos, e a semelhança com outras enfermidades infectocontagiosas, que pode dificultar o diagnóstico precoce. Geralmente o animal só é diagnosticado quando há a presença dos sinais clínicos comuns da doença como alopecia, onicogribose, emaciação, úlceras de pele (FREITAS *et al.*, 2022; SILVA, 2023). Entre os exames para triagem utiliza-se o teste rápido baseado em método imunocromatográfico. Para diagnóstico são utilizadas diversas técnicas como o parasitológico, que consiste na demonstração do parasita através da microscopia; sorológico (ELISA E RIFI) baseado na detecção e quantificação de anticorpos presente no soro do animal; imuno-histoquímica, pela identificação do parasito em cortes de fragmentos de tecidos retirados de biópsias; e métodos moleculares como o PCR, que se baseia na detecção do DNA do parasita (ROCHA *et al.*, 2019), porém o diagnóstico definitivo é a detecção por visualização do parasita em qualquer tecido.

Diante do exposto este relato objetiva descrever o uso de citologia conjuntival utilizando o método de coleta com escova interdental e histopatologia no diagnóstico de leishmaniose em um canino, Pug, seis anos, que apresentava apenas sinais clínicos oculares.

## **RELATO DE CASO**

Foi atendido em uma clínica veterinária particular da cidade de Feira de Santana, um canino, macho, não castrado, seis anos, da raça Pug, apresentando queixa de estar com os olhos hiperêmicos e com nódulos na conjuntiva, que surgiram há cerca de quatro meses.

Durante a anamnese o tutor relatou que o paciente apresentava quadro persistente de secreção amarelada, prurido e que o processo tem evoluído para piora, pois o paciente apresentava dificuldade para enxergar. Quando questionado como era essa dificuldade, relatou que o paciente estava se batendo em objetos e nas paredes e que não localizava os brinquedos. Descreveu que o paciente foi atendido anteriormente, e após a consulta foi prescrito colírio a base de tobramicina, mas segundo o tutor, o colírio só reduziu a secreção.

O tutor relatou ainda que o animal estava se alimentando bem com ração super premium, sem vômito, diarreia e perda de peso, não havendo alterações na

coloração, quantidade e frequência da micção e ingestão hídrica normal. Diante destas informações, após a anamnese foi realizado exame físico, inspeção geral, avaliação das mucosas e linfonodos, auscultação cardíaca e pulmonar, palpação abdominal e aferição de temperatura retal.

Após o exame físico foi realizada a avaliação oftálmica da produção lacrimal através do teste lacrimal de *Schirmer* (TLS) (Ophthalmos Fórmulas®, São Paulo, SP, Brasil), testes neuro-oftálmicos, inspeção das estruturas oculares e perioculares pela biomicroscopia com lâmpada em fenda (Kowa® SL-17), avaliação da pressão intraocular (PIO) com tonômetro de rebote (Icare®, Tonovet Plus) na calibragem para a espécie canina e teste de fluoresceína (em strips) (Ophthalmos Fórmulas®, São Paulo, SP, Brasil). Não foi possível avaliar a câmara anterior, íris, cristalino, vítreo, retina e nervo óptico devido a intensa pigmentação e edema de córnea.

Após a avaliação física e oftálmica, tendo como suspeita conjuntivite nodular e episclerite nodular piogranulomatosa foram solicitados os seguintes exames: hemograma, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), ureia, creatinina, proteínas totais e frações, citologia e histopatológico de conjuntiva, e punção de medula óssea para realização de PCR para leishmaniose.

Mediante a autorização do tutor foram coletados 5 mL de sangue por venopunção da jugular para a avaliação hematológica, em seguida o paciente foi sedado com propofol dose-efeito para realização da punção de medula e coleta da citologia e biópsia da conjuntiva. A punção de medula foi realizada com agulha 40X12 acoplada a uma seringa de 20 mL na região do esterno. Instilou-se colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5%, (Anestalcon®; Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo - SP, Brasil) em ambos os olhos, previamente à coleta das amostras para citologia e biópsia. Usou-se escova interdental cônica estéril para a coleta das amostras citológicas que foram depositadas em lâminas de vidro em movimentos circulares. A biópsia foi realizada com auxílio de pinça de conjuntiva e lâmina de bisturi número 15. Após a coleta de três fragmentos dos nódulos, a amostra foi colocada em solução de formol 10%.

Após as coletas foi prescrito como tratamento prednisolona 1 mg/Kg por via oral durante 15 dias, sendo 7 dias BID e 7 dias SID, colírios a base de hialuronato de sódio 0,2% (Lunah®) uma gota em ambos os olhos QID, prednisolona 1% (Ster®) uma gota em ambos os olhos TID por 15 dias e tacrolimus 0,03% uma gota em ambos os olhos BID.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma doença que pode se apresentar clinicamente com lesões dermatológicas em ponta de orelha e plano nasal, descamação com coloração esbranquiçada, linfadenomegalia, onicogribose e emagrecimento, ou de forma assintomática (BARBOSA *et al.*, 2012). O paciente do presente relato não apresentava nenhuma alteração ao exame clínico geral que indicasse a presença da doença (figura 1), apresentava apenas alteração ocular, caracterizada pela presença de nódulos na região conjuntival, que de acordo com Peña *et al.* (2000), pode ser o único sinal clínico observado. Eguchi *et al.* (2017) descreveram um caso em uma paciente da raça Labrador, que foi atendida apresentando como queixa principal presença de crescimento nodular na conjuntiva de ambos os olhos, como única queixa semelhante ao caso em questão.

**FIGURA 1.** Canino da raça Pug, seis anos com leishmaniose (paciente do relato)



**Fonte:** Autores (2023)

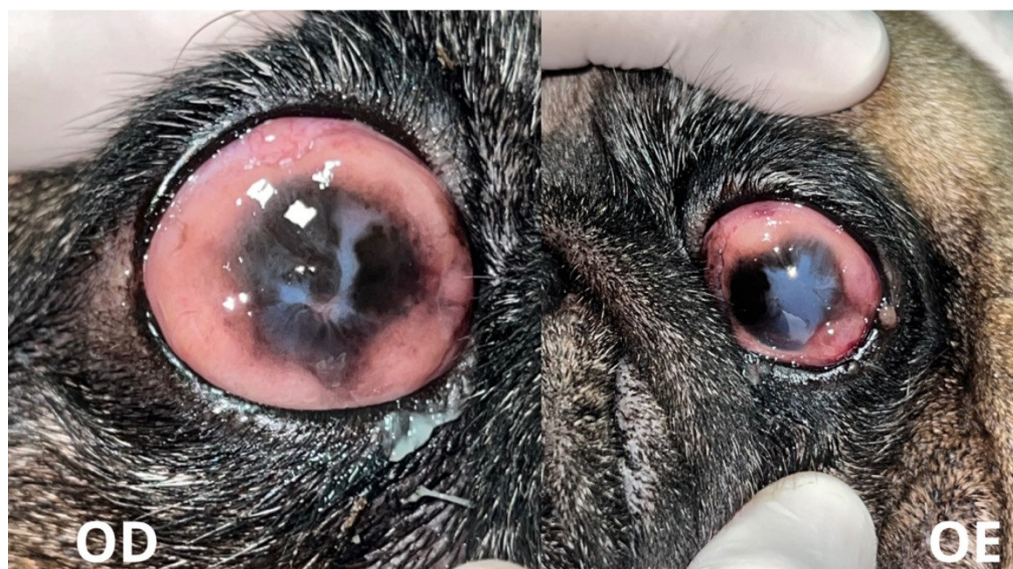
Ao exame oftálmico o paciente apresentou diminuição da produção lacrimal bilateralmente com valores de TLS de 8 e 9 mm/min nos olhos direito e esquerdo respectivamente, sendo diagnosticado com ceratoconjuntivite seca (CCS). Segundo Naranjo *et al.* (2005), um dos mecanismos da CCS em cães com leishmaniose pode ser o infiltrado inflamatório localizado ao redor dos dutos das glândulas lacrimais (adenite), produzindo acúmulo retrógrado e retenção de secreção, além da diminuição da produção da parte aquosa da lágrima. De acordo com esses mesmos autores as glândulas de meibômio também são afetadas nesta patologia, caracterizando o quadro de blefarite, levando à perda da qualidade do filme lacrimal nos animais infectados.

Na avaliação neuro-oftálmica o teste de ameaça apresentou-se ausente e isto pode ser justificado pela presença de pigmento e edema na córnea. Em casos de CCS é comum que ocorra deposição de pigmento sobre a córnea o que faz com que os animais acometidos por essa patologia parem de enxergar (LEANDRO *et al.*, 2017), mas em se tratando da raça Pug essa deposição de pigmento pode estar associada à outras causas como macroblefaro e entrópio de canto medial e por apresentar resposta exacerbada à essas alterações (COSTA *et al.*, 2021). Segundo Labelle *et al.* (2013) a presença de melanina na ceratite pigmentar nesses animais pode ocorrer por anormalidade funcional ou reduzido número de células-tronco ou melanócitos limbaís. Devido as alterações corneanas não foi possível avaliar o reflexo pupilar a luz.

Durante a avaliação da superfície ocular foi possível observar a presença de episclerite difusa/nodular e hiperemia conjuntival como pode ser observado na figura 2, caracterizando um quadro de conjuntivite que é comum ocorrer em casos de

leishmaniose. Para Andrade *et al.* (2009) e Barbosa *et al.* (2012), lesões oculares são frequentes nas manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina, sendo a ceratite, a conjuntivite e a uveíte as alterações comumente observadas.

**FIGURA 2.** Olhos direito e esquerdo de Pug, seis anos, com hiperemia de conjuntiva(conjuntivite) associada a episclerite difusa/nodular e pigmentação de córnea.

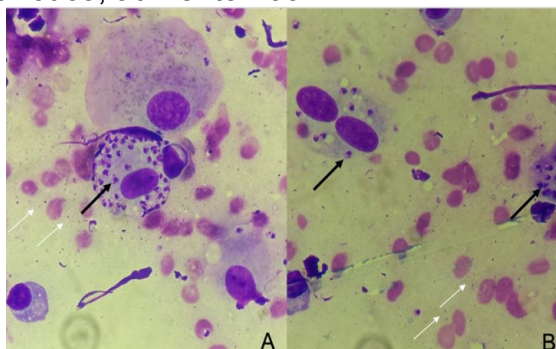


Fonte: Autores (2023)

Nos exames hematológicos, as alterações encontradas foram: anemia normocítica, normocrômica, trombocitopenia e hiperproteinemia secundária a hiperglobulinemia. Segundo Braz *et al.*, (2015) o paciente portador de leishmaniose pode apresentar diversas alterações hematológicas, sendo a anemia um achado frequente na doença canina, reportada em cerca de 50 a 70% dos pacientes, tendo como características marcantes ser normocítica, normocrômica e não regenerativa. Na leishmaniose visceral canina a anemia pode ocorrer por diversos fatores, tais como: invasão do parasito na medula óssea, que causa hipoplasia ou aplasia da série vermelha, falha na produção de eritrócitos pelo caráter crônico da doença, produção de anticorpos que promovem sequestro esplênico, resposta inflamatória a infecção, redução da eritropoetina, causada pela deposição de imunocomplexos nos rins ou pelo processo inflamatório, entre outros (SOUZA *et al.*, 2020; SILVEIRA *et al.*, 2021)

A citologia revelou amostra de alta celularidade composta predominantemente por neutrófilos íntegros e macrófagos em atividade fagocitária (amastigotas de *Leishmania* sp.). Notaram-se frequentes plasmócitos, ocasionais linfócitos pequenos bem diferenciados, formas amastigotas de *Leishmania* sp. livres e numerosos eritrócitos. Concluindo que os achados eram compatíveis com inflamação crônica ativa associada à infecção por *Leishmania* sp (figura 3).

**FIGURA 3.** Formas amastigotas de *Leishmania* sp. livres (seta branca) e no citoplasma de macrófago (seta preta) na citologia esfoliativa de conjuntiva bulbar de um cão Pug, seis de idade. Coloração Panótico, aumento 100x.

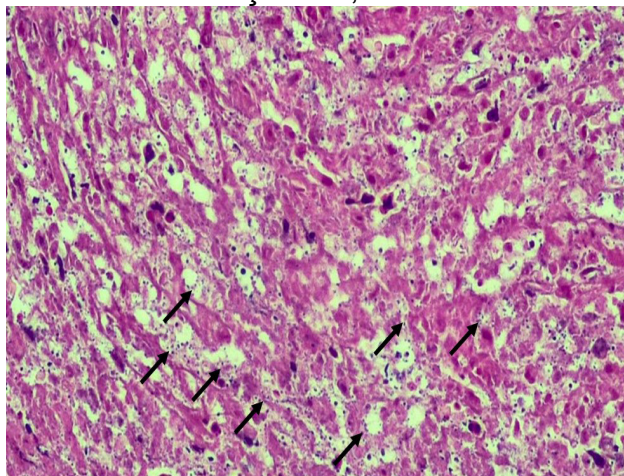


**Fonte:** Autores (2023)

O exame citológico é considerado um método minimamente invasivo, rápido e de fácil execução para neofomações em geral, tendo potencial valor diagnóstico em alguns casos. Por meio de escarificação suave com *swabs*, a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em conjuntiva de terceira pálpebra já foi identificada em animais com diagnóstico de leishmaniose canina (BARBOSA *et al.*, 2012). Peña *et al.* (2000) e Pilatti *et al.* (2009) já haviam citado a identificação do organismo em espécimes citológicos de raspado conjuntival como uma forma de diagnóstico parasitológico da leishmaniose canina. Eguchi *et al.* (2017) também identificaram formas amastigotas em conjuntiva de cão através de citologia aspirativa. A única diferença da metodologia aplicada no relato do presente caso clínico, com relação aos autores supracitados, foi a forma de coleta das células conjuntivais, utilizando-se a esfoliação através de escova interdental cônica que se mostrou eficaz para coleta de material conjuntival.

A histopatologia revelou proliferação de células epiteliais de revestimento displásicas, discretamente celular, associado ao intenso processo inflamatório piogranulomatoso. Notou-se também, no meio extracelular e nos citoplasmas dos macrófagos, moderada quantidade de estruturas semelhantes a forma amastigota de *Leishmania* sp (Figura 4). A coloração de giemsa (GIE) foi positiva para *Leishmania* sp. Nos estudos de Peña *et al.* (2008) com cortes histológicos de olhos de pacientes positivos para leishmaniose, a conjuntiva foi a estrutura ocular mais comumente envolvida. Razeghinejad *et al.*, (2016) observaram formas amastigotas no exame histopatológico da conjuntiva de um paciente humano que apresentava duas lesões conjuntivais límbicas gelatinosas e amareladas no olho esquerdo.

**FIGURA 4.** Formas amastigotas de *Leishmania* sp (setas) em amostra histopatológica de conjuntiva bulbar de um cão Pug, seis anos de idade. Coloração HE, aumento de 400x.



Fonte: Autores (2023)

De acordo com Brito *et al.* (2010) o infiltrado inflamatório normalmente é linfoplasmocítico na maioria dos casos e que a conjuntiva é a estrutura ocular onde se observa o maior parasitismo, que segundo eles pode ser explicado pela atividade linfóide que esse tecido possui. No presente relato o achado foi predominantemente piogranulomatoso. Peña *et al.* (2008) descreveram que os sinais clínicos oftálmicos e o infiltrado inflamatório granulomatoso estão relacionados com o protozoário nas estruturas oculares avaliadas, o que reforça a suspeita de que sua presença pode ser responsável pelas alterações oftálmicas encontradas nesses animais.

No retorno, após 30 dias da consulta, o tutor relatou que assim que o uso da prednisolona oral e ocular foi suspenso o quadro voltou, segundo ele com menos intensidade e sem presença de secreção. Foi então prescrito as medicações novamente e o paciente foi encaminhado para tratamento da leishmaniose. Foi explicado ao tutor todas as questões sobre a doença e o prognóstico para o paciente.

### CONCLUSÃO

Devido a apresentação clínica da leishmaniose ser variável torna-se importante incluir a avaliação oftálmica nestes animais que podem se apresentar apenas com alterações oculares como o paciente do presente relato. Destaca-se a importância do uso de outras técnicas como a citologia e a histopatologia de conjuntiva para diagnóstico da doença. A citologia com escova interdental e a histopatologia da conjuntiva foram eficazes para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no tecido conjuntival.

### REFERÊNCIAS

ABBIATI, T. C., FREITAS, D. M., ALVES, L. C., FREITAS, B. G., REZENDE, R. S., *et al.*; Leishmaniose visceral canina: Relato de caso. **PUBVET**, 13(4), 1–8, 2019. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a307.1-8>.

ALCOVER, M.M., RIBAS, A., GUILLÉN, M.C., BERENQUER, D., TOMÁS-PÉREZ, M., *et al.*; Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania infantum* in a



Mediterranean area. **Preventive Veterinary Medicine**. 2020; 175:104874. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104874.

ALVES, W.A.; FONSECA, D.S.; Leishmaniose visceral humana: estudo do perfil clínico-epidemiológico na região leste de Minas Gerais, entre 2008-2015. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 2, pp. 133-139. 2018. <http://dx.doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v6i2.1764.p133-139.2018>

ANDRADE, A.L.; SANTO, E.F.E.; SAKAMOTO, S.S.; LIMA, L. K. F.; LUVIZOTO, M. C. R. Citologia de impressão da superfície ocular de cães infectados naturalmente por *Leishmania* (L.) *chagasi*. **Archives of Veterinary Science**., v.14, p.9-16, 2009.

AZEVEDO, R. C.F.; MARCILI, A.; Alterações cutâneas secundárias à infecção por *Leishmania* sp.: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19328–19346, 2020.

AZEVEDO, T. S., LORENZ, C., CHIARAVALLLOTI-NETO, F.; Risk mapping of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 52, 1-5. 2019. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0240-2019>.

BARBOSA, V.T.; SILVA, M.A.G.; SOUSA, M.G.; GERING, A.P.; SANTOS, H.D.; *et al*; Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 64(6): 1465-1470, 2012.

BONDAN, E., CAMARGO, T.; Conhecimento sobre leishmaniose visceral canina na população do Município de Cotia (SP), Brasil, e participação dos clínicos veterinários locais na propagação de medidas preventivas. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 22(1), 28–33, 2015.

BRAZ PH, SARTORETTO MC, SOUZAAS, MELO FMG. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. **Acta Veterinária Brasília**, v. 9, n. 1, p. 87-90, 2015.

BRITO F.L.C.; LAUS J.L.; TAFURI W.L.; FIGUEIREDO M.M.; SILVA JÚNIOR V.A.; *et al*.; Histopathological findings and detection of parasites in the eyes of dogs infected naturally with *Leishmania chagasi*. **Ciência Rural**. 40(5): 1141–1147, 2010.

BURZA, S., CROFT, S.L., BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**. 2018; 392:951–970, 2018.

CARDOSO, L., SCHALLIG, H., PERSICHETTI, M. F., & PENNISI, M. G.; New epidemiological aspects of animal leishmaniosis in Europe: The role of vertebrate hosts other than dogs. **Pathogens**, 10(3), 307, 2021.

COSTA, J., STEINMETZ, A., DELGADO, E.; Clinical signs of brachycephalic ocular syndrome in 93 dogs. **Irish Veterinary Journal**, v. 74, n. 1, p. 1-8, 2021.

COURTENAY, O.; PETERS, N.C., ROGERS, M.E., BERN, C.; Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and hosts to inform leishmaniasis transmission dynamics and control. **PLoS Pathogens**, 13:2017.

DI PIETRO, S. D.; BOSCO, V. R. F.; CRINÒ, C.; FRANCAVIGLIA, F.; GIUDICE, E.; Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned-client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary World**, v. 9, n. 6, p. 633–637, 2016.

EGUCHI, G.U., OLIVEIRA, G.G., BABO-TERRA, V.J., SOUZA, A.I., BARROS R. et al.; Ceratoconjuntivite nodular em um caso de leishmaniose visceral canina: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 69(6): 1480-1484, 2017.

FREITAS, A. L., KINOSHITA, A. S., PIMENTEL, B. Z., MALHEIROS, D. A., OLIVEIRA, E. R., et al.; Leishmaniose visceral canina: Revisão. **PUBVET**, 16(10), 1–20, 2022. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n10a1245.1-20>.

GÁLVEZ, R.; MONTOYA, A.; FONTAL, F.; MARTINEZ, L.M.; MIRÓ, G.; Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: A case of knowing your enemy. **Research in Veterinary Science**, 121, 94–103.2018. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.008>

GREENE, C.E.; **Doenças Infecciosas em cães e gatos**. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2015. 1354p.

LABELLE A.L.; DRESSER, C.B.; HAMOR, R.E.; ALLENDER, M.C.; DISNEY, J.L.; Characteristics of prevalence of, and risk factors for corneal pigmentation (pigmentary keratopathy) in pugs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 243(5):667–74, 2012.

LEANDRO, G. A.; SOUZA, L. A. J.; VIEIRA, R. B.; ATAÍDE, W. F.; AMARAL, A. V. C. Ceratoconjuntivite seca em cães. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 28, p. 1-15, 2018.

NARANJO, C., FONDEVILA, D., ALTET, L., FRANCINO, O., RIOS, J., et al.; Evaluation of the presence of *Leishmania* spp. by real-time PCR in the lacrimal glands of dogs with leishmaniasis. **Veterinary Journal**, 193, 168-173, 2012.

NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; PEÑA T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.133, p.37-47,2005.

PEÑA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G.; Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, v.3, p.35-41, 2000.

PEÑA M.T., NARANJO C., KLAUSS G., FONDEVILA D., LEIVA M., et al. Histopathological Features of Ocular Leishmaniosis in the Dog. **Journal of Comparative Pathology**. 138(1): 32-39, 2008.

PILATTI, M. M.; FERREIRA, S. A.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S.R. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in Veterinary Science**, [S.L], v. 87, p.255-257, 2009.

RAZEGHINEJAD, M.R.; MONABATI, A.; KADIVAR, M.R.; ALBORZI, A.; Conjunctival leishmaniasis in a case of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Trop Doct.** Jan;47(1):53-55, 2017. doi: 10.1177/0049475516631881.

READY P. D.; Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical epidemiology**, 6, 147–154, 2014. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>.

RIBEIRO, C.R.; GONÇALVES, C.A.; CRUZ, L.M.; GALERA, P.D.; Prevalência da leishmaniose visceral canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal – Brasil. **Ciência Animal Brasileira**. 20:1-8, 2019.

ROCHA, A. V. V. O.; MORENO, B. F. S.; CABRAL A. D.; LOUZEIRO, N. M., MIRANDA, L. M.; Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 273, 80-85, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.007>.

SILVA, M. A.; Diagnóstico de Leishmaniose canina por exame direto: Relato de caso. **PUBVET**, 17(2), 1–6, 2023. <https://doi.org/https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n02a1339>.

SILVEIRA, N. S. D.; MENDES, E. M.; PEREIRA, M. L.; TAVELA, A. O.; VEIGA, A. P. M. *et al.* Leishmaniose visceral em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, n. 1, 2021.

SOUZA, A. T. P.; RORIZ, Y. S.; CASTRO, S. V.; Miltefosina no tratamento de leishmaniose visceral canina. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 5, n. 1, 2020.

SRIVASTAVA, P., MEHROTRA, S., TIWARY, P., CHAKRAVARTY, J., SUNDAR, S.; Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PloS one*, 6(4), 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019304>.