

LÍVIA MARIA ROSA ACHA

**GRANULOMA LEPRÓIDE CANINO: ASPECTOS CLÍNICOS,
EPIDEMIOLOGIA, HISTOPATOLOGIA E BIOLOGIA
MOLECULAR - ESTUDO RETROSPECTIVO DE 38 CASOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2009

LÍVIA MARIA ROSA ACHA

**GRANULOMA LEPRÓIDE CANINO: ASPECTOS CLÍNICOS,
EPIDEMIOLOGIA, HISTOPATOLOGIA E BIOLOGIA
MOLECULAR_ESTUDO RETROSPECTIVO
DE 38 CASOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária,
para obtenção do título de magister
Scientiae.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2008.

Prof. Paulo Renato dos Santos Costas
(Co-Orientador)

Prof. Vidal Haddad Júnior

Prof. Renato de Lima Santos

Prof^a. Adriane P. da C. Val Bicalho

Prof. Lissandro Gonçalves Conceição
(Orientador)

À minha família, fonte de amor
e incentivo incondicional, dedico.

Aos cães, que fazem a luta da
busca pelo conhecimento valerem a
pena, ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me fortalece, protege e me ilumina todos os dias.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária, pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor Lissandro Gonçalves Conceição, exemplo de competência, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e compreensão. Por ser mestre e amigo e, desta forma, ter me motivado a seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao professor Alexandre Secorum Borges, da UNESP/ Botucatu, e à Fernanda Gamba, pelos ensinamentos e engrandecimento do estudo com a realização da PCR e sequenciamento genético.

Ao Gilberto, pelo amor, companheirismo e apoio na realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãs, pela força, carinho e compreensão, por acreditarem em mim.

Aos médicos veterinários e ao Provet de São Paulo, que colaboraram na partilha dos casos clínicos apresentados neste estudo.

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro.

À Rose, pela solicitude em ajudar e eficiência. À Bel, pelo acolhimento e companhia durante as ligações.

Ao Prevent e ao Dr. José do Carmo, pela colaboração.

Aos demais professores, funcionários e amigos, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

BIOGRAFIA

LÍVIA MARIA ROSA ACHA, filha de Elias Acha Neto e Jerusa Tardin Rosa Acha, natural de Bom Jesus do Itabapoana, Rio de Janeiro, nasceu em 7 de dezembro de 1982.

Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Veterinária (2001-2006).

Especializou-se em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais pela Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Veterinária (2006-2007).

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado em Medicina Veterinária, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2009.

CONTEÚDO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	2
2.1. Estudo Clínico-Epidemiológico	2
2.2. Estudo Histopatológico	2
2.3. PCR e Sequenciamento genético	3
2.4. Análise Estatística	6
3. RESULTADOS	8
3.1. Estudo Clínico-Epidemiológico	8
3.2. Estudo Histopatológico	16
3.3. PCR e Sequenciamento genético	24
4. DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS	37
7. ANEXO	43

RESUMO

ACHA, Livia Maria Rosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009.
Granuloma lepróide canino: epidemiologia, histopatologia e biologia molecular - estudo retrospectivo de 38 casos. Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição. Co-orientadores: Alexandre Secorun Borges e Paulo Renato dos Santos Costa.

Foram analisados 38 casos de granuloma lepróide canino (GLC) diagnosticados no período entre 2000 e 2008. O diagnóstico baseou-se nos achados clínicos e histopatológicos, com a detecção de bacilos álcool ácido resistentes nos fragmentos cutâneos. As lesões incluíram pápulas, placas, nódulos, tumores dérmicos e subcutâneos, ulcerados ou não, localizados principalmente na superfície convexa dos pavilhões auriculares. Os cães da raça Boxer, aqueles de pelagem curta e de grande porte foram mais acometidos. Os animais eram sistemicamente saudáveis e o prognóstico foi favorável, sem recidiva das lesões. A histopatologia demonstrou padrão nodular a difuso, com infiltrado inflamatório predominantemente granulomatoso ou piogranulomatoso e linfoplasmocitário, na derme e tecido subcutâneo, com ou sem necrose, e bacilos em quantidade e morfologia variáveis. Não foi verificada associação estatística significativa entre a quantidade de bacilos com o padrão histopatológico, com o infiltrado inflamatório predominante, com a necrose ou com a quantidade de células gigantes. Também não foi observada associação entre a quantidade de células gigantes e o padrão histopatológico. A reação em cadeia de polimerase e o sequenciamento genético parcial do gene 16srRNA identificou *Mycobacterium murphy* na maioria dos casos. Outras micobactérias, ainda não descritas na literatura, também foram encontradas nas lesões, sugerindo maior diversidade de espécies envolvidas no GLC.

ABSTRACT

ACHA, Livia Maria Rosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009.
Canine leproid granuloma: epidemiology, histopathology e molecular biology – retrospective study of 38 cases. Adviser: Lissandro Gonçalves Conceição. Co-advisers: Alexandre Secorun Borges and Paulo Renato dos Santos Costa.

Thirty eight cases of canine leproid granuloma (CLG) were diagnosed between 2000 and 2008. Diagnosis was based on clinical and histopathological findings along with acid fast bacilli in skin sections. The lesions included papules, plaques and nodules, with or without ulceration, localized mainly on the pinna. Boxers, short haired and large breeds dogs were the most affected. The dogs were otherwise healthy, with no recurrence, and the prognosis was good. Histopathological findings included a nodular to diffuse granulomatous or pyogranulomatous and lymphoplasmocytic inflammatory infiltrate, with or without necrosis, localized in the dermis or subcutaneous tissue. The bacillar loading and morphology were variable among lesions. There were not significant correlations between bacterial load and histopathological pattern, main inflammatory infiltration, necrosis or the numbers of giant cells. Correlation between giant cells and histopathological pattern was not observed as well. In the majority of cases, PCR assay identified *Mycobacterium murphy* as the main etiologic agent for the CLG. However, others *Mycobacterium* species were also involved as causative agent.

1. INTRODUÇÃO

O granuloma lepróide canino (GLC), também conhecido como lepra canina (FOLEY *et al.*, 2002; LEMARIE, 1999; MALIK *et al.*, 1998), se caracteriza por lesões nodulares e/ou tumores na pele e tecido subcutâneo de cães. O agente etiológico é uma micobactéria, não cultivável e até pouco tempo não conhecida, mas que foi parcialmente seqüenciada geneticamente em 2000 (HUGHES *et al.*, 2000; FOLEY *et al.*, 2002; MALIK *et al.*, 2006). No Brasil, nunca foi realizado o sequenciamento da micobactéria causadora do GLC.

As enfermidades cutâneas causadas por micobactérias são pouco frequentes em pequenos animais e abrangem, de forma geral, quatro grupos de doenças: a micobacteriose cutânea atípica, o GLC, a lepra felina e a tuberculose cutânea (LEMARIE, 1999; MUNDELL, 1995; TWOMEY *et al.*, 2005).

O GLC, descrito originalmente em 1973, no Zimbábue, África, apresenta vasta distribuição geográfica. Trata-se de dermatose comum e bem documentada na Austrália e Nova Zelândia (FOLEY *et al.*, 2002; LEMARIE, 1999; MALIK *et al.*, 1998). No Brasil, a primeira descrição do GLC ocorreu em 1990 (LARSSON *et al.*, 1994), mas acredita-se que, por apresentar alguma semelhança climática à Austrália, o GLC também seja relativamente comum no Brasil. Entretanto, existem poucos trabalhos publicados em nosso país.

O presente trabalho tem por objetivo descrever a epidemiologia, os achados clínicos e histopatológicos de GLC e o sequenciamento e identificação da micobactéria causadora desta doença.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e oito fichas patológicas de casos com diagnóstico de GLC foram obtidas junto a dois serviços de diagnóstico patológico: Instituto Brasileiro de Diagnóstico e Especialidades Veterinárias (Provet-SP) e Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) no período de julho de 2000 a dezembro de 2008. Todos os casos foram provenientes da região Sudeste do Brasil, mais especificamente, dos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Os espécimes cutâneos enviados para diagnóstico foram obtidos por biópsia incisional ou excisional e fixados em formalina a 10%. Após o processamento habitual com inclusão em parafina, foram feitos cortes histológicos com espessura entre quatro e seis micrômetros e corados em hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Shiff (PAS) e Ziehl Neelsen. Foram incluídos no estudo os casos com descrição clínica compatível com GLC (MALIK *et al.*, 2006), pesquisa positiva de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) e coloração especial de PAS negativa para estruturas fúngicas.

2.1. Estudo Clínico-Epidemiológico

O estudo clínico-epidemiológico foi feito em 38 casos de GLC. Os médicos veterinários solicitantes dos exames histopatológicos responderam por telefone ou via correio eletrônico, questionário abordando os seguintes itens: raça, sexo, idade, porte e pelagem do animal; mês de aparecimento e tempo de evolução das lesões (do surgimento ao diagnóstico); descrição macroscópica e localização anatômica das lesões; condição corporal dos cães e alterações sistêmicas ou laboratoriais; evolução clínica; enfermidades concomitantes e características do ambiente do animal.

2.2. Estudo Histopatológico

Foram reexaminadas sob microscopia óptica de luz, quarenta lâminas histológicas referentes a 35 casos de GLC. Foram avaliados: o padrão

histopatológico segundo Ackerman *et al.* (1997), a natureza do infiltrado inflamatório, a presença de necrose tecidual, o envolvimento ou não dos plexos vaso-nervosos e a quantidade e a morfologia dos BAAR presentes.

A necrose tecidual foi classificada em: ausente (0); discreta (+), quando aproximadamente 20% do fragmento estavam acometidos; moderado (++), quando ocorreu necrose em 20 a 50% do fragmento; e intenso (+++), quando mais de 50% do fragmento exibia necrose.

As células gigantes foram quantificadas em ausente (0), discreta (+) quando raras células foram visualizadas em toda a lâmina, e moderada (++) quando observadas a cada dois ou três campos microscópicos de grande aumento (CGA) (X40).

A quantidade de BAAR foi classificada em discreta (+), quando raros bacilos foram identificados em toda a lâmina, moderada (++) quando presentes aproximadamente a cada três CGA, e intensa (+++) quando as estruturas foram visualizadas em aproximadamente todos os CGA.

Além do estudo das características histopatológicas do GLC, foram feitas análises de correlações entre: a quantidade de células gigantes e o padrão histopatológico; a quantidade de bacilos e o padrão histopatológico; a quantidade de bacilos e o infiltrado inflamatório predominante; a quantidade de bacilos e a quantidade de células gigantes; e, a quantidade de bacilos dentro e fora da necrose em uma mesma lesão.

2.3. PCR e Sequenciamento genético

Foi realizada a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando DNA extraído de 25 fragmentos de pele incluídos em parafina provenientes de cães acometidos com GLC. Vinte e duas amostras eram provenientes de diferentes cães e as outras três, de lesões distintas de um mesmo animal. Uma amostra de pele, com diagnóstico histológico distinto de GLC, foi processada servindo como controle negativo de todo o procedimento.

A PCR do material foi executada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista, campus Botucatu-SP. O sequenciamento genético foi realizado no Departamento de Genética da Universidade Estadual Paulista campus Botucatu-SP e no laboratório da Universidade Estadual Paulista, campus Araçatuba-SP.

Extração de DNA: Os blocos de parafina contendo diferentes tamanhos de tecidos cutâneos, previamente fixados em formol, foram submetidos à extração de DNA. O DNA foi extraído utilizando o “kit” para purificação de DNA genômico de tecidos fixados em formalina e preparados em parafina (QIAGEN - QIAamp®, *DNA FFPE tissue*). Todos os procedimentos de manipulação, extração e amplificação foram realizados com ponteiros descartáveis com barreira de proteção. O protocolo recomendado pelo fabricante foi seguido, sendo o princípio da técnica baseado na captação de DNA na membrana da coluna. Em resumo, fatias de cinco a 10 micrômetros de espessura, dependendo da avaliação visual da quantidade de tecido presente em cada bloco, foram cortadas dos blocos de parafina utilizando-se micrótomo e lâminas diferentes para cada um dos blocos e colocadas imediatamente em microtubos plásticos de 1,5mL contendo xilol PA (Merck) para remoção da parafina. O processamento das amostras de diferentes animais foi realizado em dias distintos. O resíduo de xilol foi retirado após adição de etanol 100%. Para a digestão da amostra foi usado banho-maria (56°C e 90°C) por 2 horas após adição de proteinase K e tampão específico do Kit. O DNA foi recuperado após passagem do material tratado na coluna e posterior obtenção com tampão específico. A eluição foi feita em 80 microlitros (µL) de tampão ATE, e a concentração e pureza foram verificados em espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000) e posteriormente, o material foi congelado a -20°C em microtubo estéril de 1,5mL (Axygen) livre de DNase e RNase.

Reação de PCR: A PCR foi realizada com pequenas modificações do anteriormente preconizado por Hughes *et al.* (2000), sendo que a mesma está baseada em uma metodologia de Nested PCR. Foram inicialmente utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: “forward” 246 (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') e “reserve” 247(5'TTT CAC GAA CAA CGC GAC AA - 3') para amplificação da

sequência de 590 pares de base (pb) do gene 16S rRNA, que inclui as regiões V2 e V3. Dois μL do DNA extraído foram adicionados a 23 μL do mix da PCR, com um volume final de 25 μL . A enzima utilizada foi a GoTaq® green Master Mix (Promega®) em concentração final 1x, que contém DNA Polimerase, 400 micromol (μM) dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP e 3 μM MgCl_2 . Cada oligonucleotídeo iniciador foi usado em concentração final de 0,6 μM . Toda a reação foi realizada utilizando-se tubos plásticos para PCR de 200 μL (Axygen Thinwall). A amplificação foi feita em termociclador da marca Eppendorf (Mastercycler ® ep) com a programação 95°C por 2 minutos para denaturação inicial, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos para denaturação, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. Uma amostra controle branco foi feita em cada reação. Para obter DNA suficiente para visualização das bandas e análise do seqüenciamento, os produtos da PCR foram reamplificados com oligonucleotídeos iniciadores Nested. Os oligonucleotídeos iniciadores internos foram “forward” M1(5´ AGT GGC GAA CGG GTG AGT AAC – 3´) e “reverse” R7 (5´- TTA CGC CCA GTA ATT CCG GAC AA – 3´), produzindo fragmento de 455 pb. Dez microlitros da diluição 1:100 da primeira reação de amplificação foram adicionadas a 40 μL do mix GoTaq. A mistura final de PCR com volume de 50 μL continha GoTaq® green Master Mix (DNA Polimerase, 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP e 3 mM MgCl_2) na concentração final 1x e oligonucleotídeos iniciadores em concentração final de 0,6 μM . A programação do termociclador foi de 95°C por 2 minutos para denaturação inicial, 25 ciclos a 95°C por 30 segundos para denaturação, anelamento a 68°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos com extensão final por 5 minutos a 72°C. As amostras foram conservadas congeladas a -20°C. Nesta segunda etapa foi também preparado um controle negativo para segurança da reação utilizando o controle negativo da primeira reação. Tanto o produto da primeira amplificação como o Nested foram corridos em gel de agarose para verificar a presença e o tamanho dos fragmentos amplificados para cada amostra.

Análise de PCR: Eletroforese em gel de agarose: O produto da PCR (8 μL) foi aplicado em gel de agarose a 1% imerso em tampão TBE (Tris, Ácido Bórico e EDTA) 1x, corado com 1 μL brometo de etídeo (Invitrogen 10mg\ml) a corrente de

120 V, amperagem de 240mA, por 70 minutos. Os pesos moleculares foram estimados através de comparação com marcador de peso molecular conhecido (Ladder Norgen, 100pb). Os géis foram documentados em Eagle Eye II da marca Stratagene. Esperava-se um produto de 590 pb de peso para primeira reação e 455 pb para a segunda.

Purificação da PCR: As amostras contendo produtos únicos com o correto tamanho do fragmento foram submetidas à purificação para posterior seqüenciamento. Purificação dos produtos PCR foi feita com o “kit” (Invitex – *Invisorb fragment clean up* ou GE Healthcare – *illustra™ – GFX™ PCR DNA and GEL band*), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram eluídas em 40 µL de água ou tampão específico. Após a purificação, a concentração e pureza foram novamente determinadas e novo gel foi preparado para confirmar a presença da amostra com o correto peso molecular.

Seqüenciamento: As amostras com produtos do correto peso molecular foram seqüenciadas em equipamento MegaBACE™ 1000, Amersham Biosciences, Dyanamic ET Dye Terminator kit usando “software” Sequence Analyzer - 3.0 sendo que as seqüências obtidas juntamente com os eletroferogramas foram analisados em “software” Sequencher® 4.7 e alinhadas (Clustalw multiple analysis software) para verificar homologia com as seqüências anteriormente disponibilizadas no genbank. Para isso, as seqüências foram limpas no site www.justbio.com e o “Blast” foi feito no site www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Foram também utilizadas ferramentas de comparação presentes nos seguintes endereços eletrônicos: www.rdna2.ridom.de, www.nvbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_tree.cgi, EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) e Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.4. Análise Estatística

Os procedimentos estatísticos foram devidamente especificados de acordo com as características das variáveis analisadas, possibilitando que as pressuposições impostas pelos testes utilizados fossem totalmente atendidas.

O teste de qui-quadrado foi empregado para avaliar a relação entre o padrão histopatológico (difuso ou multinodular) e a quantidade de células gigantes e entre a quantidade de bacilos encontrados e as seguintes variáveis: padrão histopatológico; natureza do infiltrado inflamatório; e, quantidade de células gigantes. Observou-se também, por meio deste teste, a relação entre a quantidade de bacilos presente na área de necrose e fora da necrose em uma mesma lesão de GLC. Porém, para determinadas variáveis, nas quais o número de amostras não foi suficiente, este teste foi substituído pelo teste exato de Fisher com correção de Monte Carlo. Estes testes foram realizados no PROC FREQ do software estatístico SAS[®] (SAS INSTITUTE, 2006) considerando o nível de significância de 5%.

Para avaliar a ocorrência de predisposição racial foi calculado o Risco Relativo, conhecendo-se para isso, o número total de animais acometidos com GLC, o número total de animais que deram entrada nos serviços no período de estudo e o número total de animais de cada raça acometida (THRUSFIELD, 2007).

Para avaliar a ocorrência de predisposição de pelame, porte dos cães acometidos, predisposição anatômica para o GLC e quantidade de lesões, foram calculados intervalos de confiança de 95% para a proporção de ocorrência de cada uma destas variáveis. Dessa forma, as proporções consideradas estatisticamente iguais foram identificadas pela sobreposição destes intervalos. Tal procedimento também foi usado para avaliar a distribuição sazonal da doença de acordo com as épocas consideradas. Os intervalos relatados foram obtidos no pacote prop.test do software estatístico R (R Development Core Team, 2008).

3. RESULTADOS

3.1. Estudo Clínico Epidemiológico

Dos 38 casos de GLC estudados, foram obtidos dados epidemiológicos de 32 cães, sendo resgatada apenas a identificação dos outros seis animais acometidos. Algumas informações foram incompletas, uma vez que os veterinários responsáveis não souberam respondê-las e o contato com o proprietário não foi possível. A descrição das alterações observadas em relação ao total de casos em que se obtiveram as informações está descrita no texto como numerador e denominador, respectivamente.

No período compreendido entre o ano de 2000 e 2008, o GLC representou 0,51% (38 casos em 7403 exames) de todos os casos dermatológicos.

Os cães da raça Boxer foram os mais acometidos (19), seguidos pelo Rotweiller (4), Sem raça definida (4), Labrador (3), Teckel (2), Dogue de Bordeaux (1), Fila brasileiro (1), Pitbull (1), Terrier Brasileiro (1), Weimaraner (1) e Griffon de Bruxe pêlo longo (1). A raça Boxer compreendeu, portanto, 50% dos casos de GLC estudados (Figura 1). Apenas os cães da raça Boxer, Dogue de Bordeaux e Rotweiller apresentaram risco relativo elevado para o desenvolvimento da doença ($p < 0,05$). A doença acometeu principalmente cães com pelagem curta (28/36 - 77,8%), seguido pela pelagem média (Rotweiller e Labrador, 7/36 - 19,4%) e longa, que ocorreu em apenas um animal (1/36 - 2,8%) (Figura 2). Trinta cães (30/36 - 83,3%) representavam raças de grande porte.

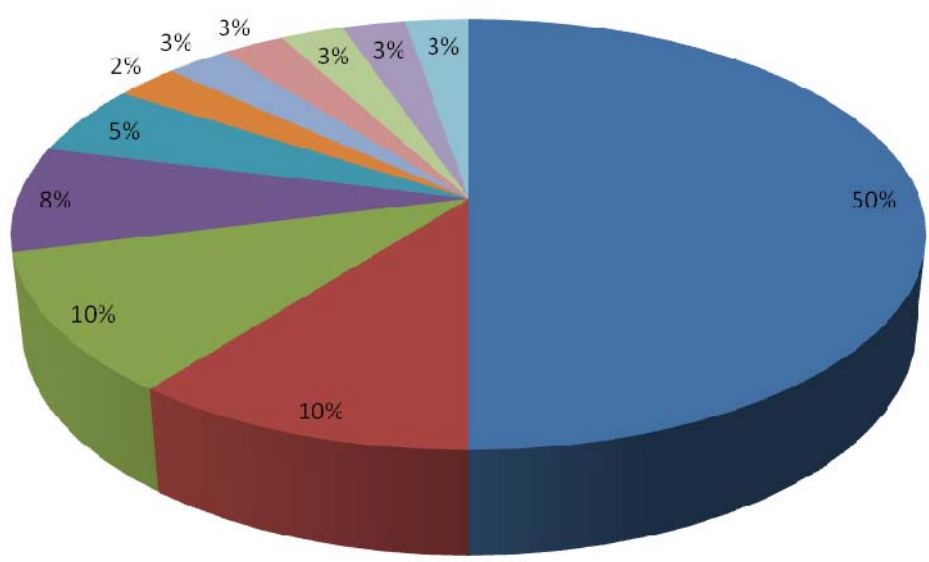


Figura 1: Frequência de raças dos cães acometidos com GLC (n= 38).

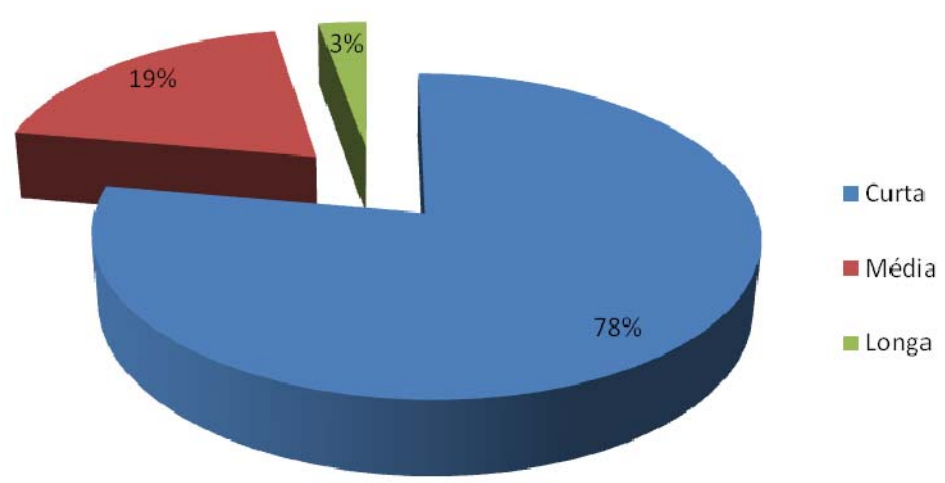


Figura 2: Frequência da pelagem dos cães acometidos com GLC (n=36).

A idade de ocorrência da doença foi bastante variável, acometendo cães com um a 11 anos de idade, com média de 5,8 e moda de sete anos (Figura 3). Machos e fêmeas ocorreram exatamente com a mesma frequência (19/38- 50%).

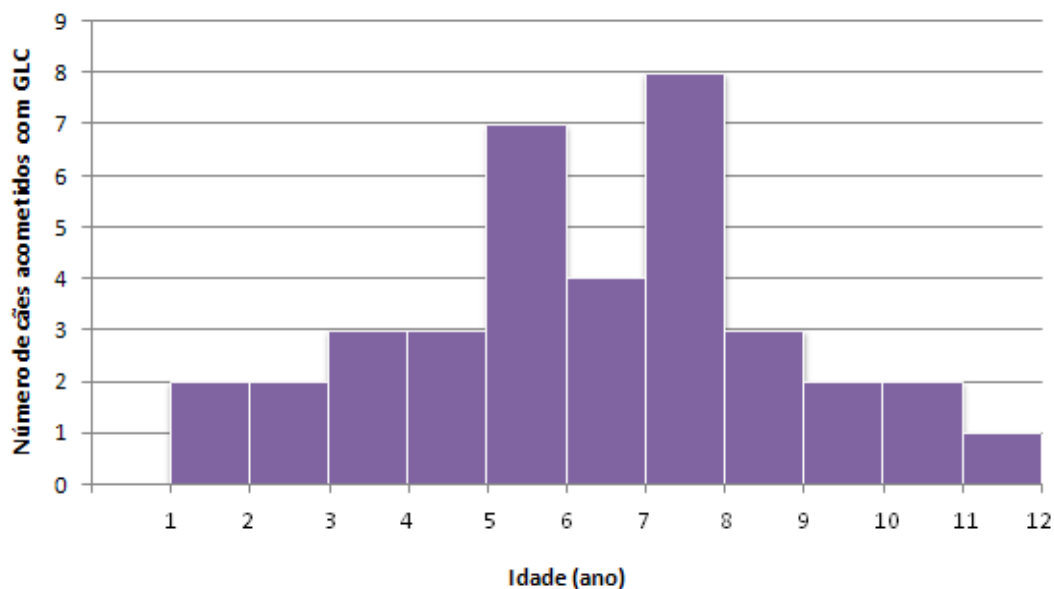


Figura 3: Distribuição etária dos cães acometidos com GLC (n= 37).

A maioria dos cães (31/32 - 96,9%) apresentava-se em boa condição corporal. Apenas um animal (3,1%), recém resgatado da rua, estava emaciado. Cinco cães (5/33 - 15,2%) apresentavam enfermidades concomitantes (erliquiose, erliquiose e carcinoma espinocelular e os outros três, mastocitoma). Aumento de linfonodos submandibulares foi descrito no cão emaciado e em outro com tumor ulcerado (2/30 - 6,7%).

O tempo de evolução das lesões, determinado em 26 casos, variou de sete dias a dois anos (Figura 4). Entretanto, na maior parte dos casos, o diagnóstico foi firmado até dois meses após o aparecimento das lesões.

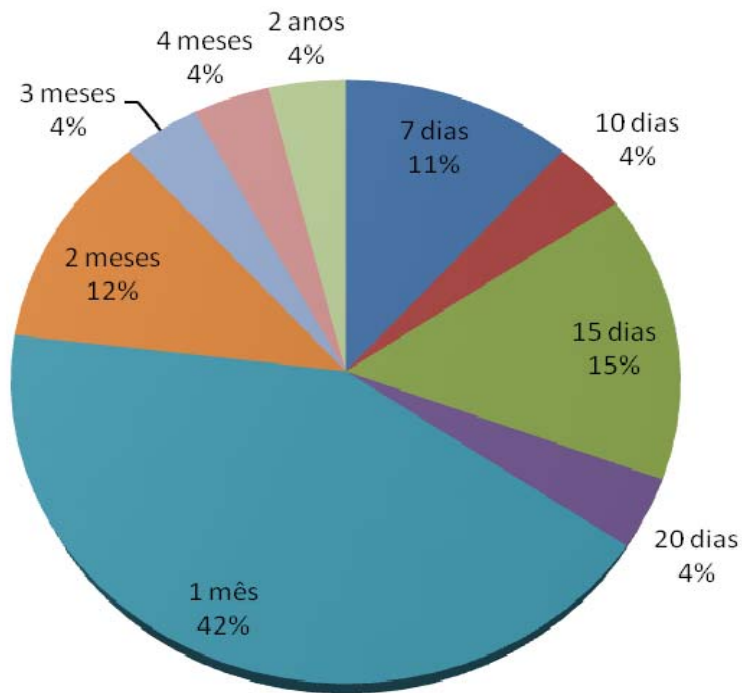


Figura 4: Frequência de ocorrência do GLC de acordo com o tempo de evolução da doença (n= 26).

Foi observada maior ocorrência do GLC nos meses mais quentes do ano, de setembro a março (17/26 - 65,4%) (Figuras 5 e 6). Apesar das estações serem pouco definidas em nosso país, verificou-se maior ocorrência do GLC no verão e primavera (16/26 - 61,5%, sendo 9 no verão e 7 na primavera) que no inverno e outono (10/26 - 38,5%, 7 no inverno e 3 no outono).

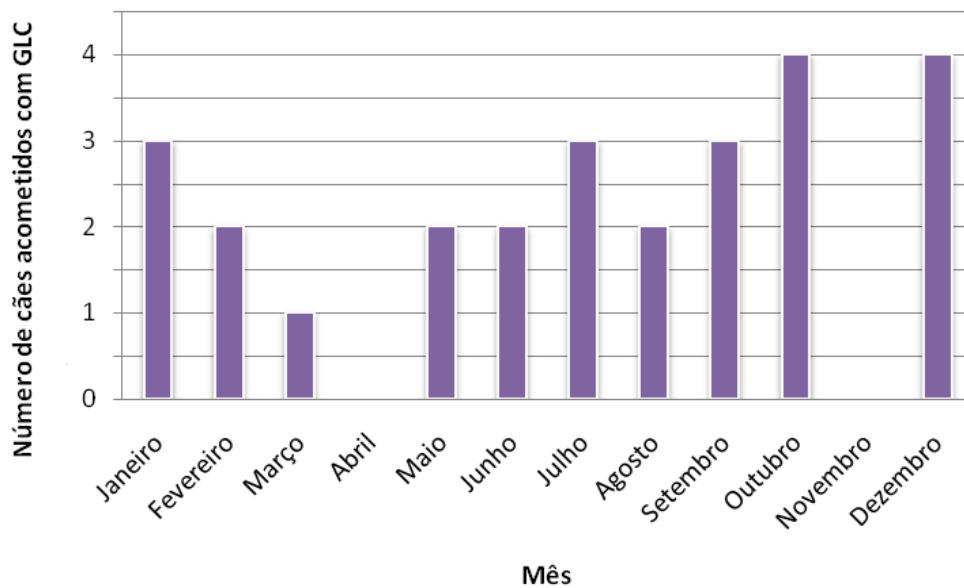


Figura 5: Distribuição da ocorrência mensal dos cães acometidos com GLC (n=26).

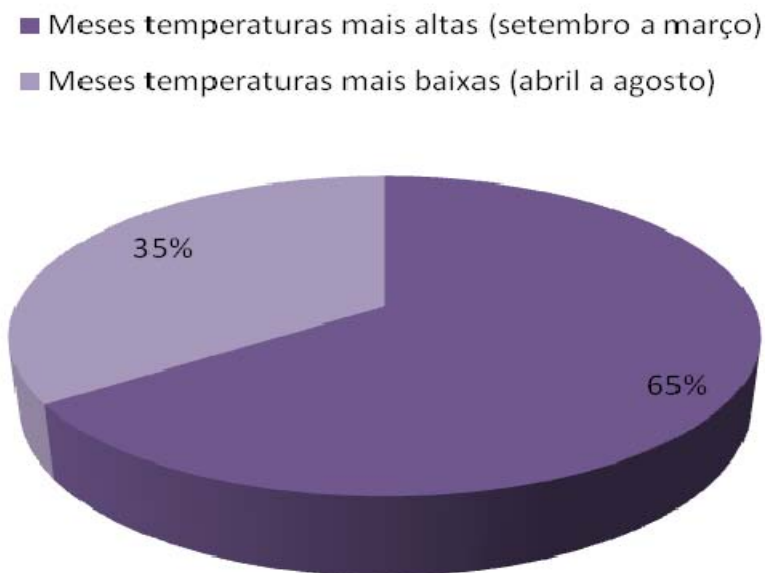


Figura 6 - Frequência de ocorrência de cães acometidos com GLC de acordo com a temperatura anual (n=26).

As lesões incluíram pápulas, placas, nódulos e tumores que variavam de dois milímetros a sete centímetros de diâmetro. Quanto à localização, ocorreram principalmente em pavilhões auriculares (28/36 - 77,8%). Outros locais também foram acometidos, associados ou não às lesões nos pavilhões auriculares: pavilhões e membro torácico (1/36 - 2,8%); pavilhões, membros pélvicos e segmento cefálico (1/36 - 2,8%); pavilhão auricular estendendo-se para região cefálica (2/36 - 5,6%); pavilhão e região nasal, estendendo-se para face (1/36 - 2,8%); pavilhão e focinho (1/36 - 2,8%); membro pélvico (1/36 - 2,8%) e plano nasal (1/36 - 2,8%) (Figura 7). Em 94,4% dos casos (34/36) ocorreram lesões em pavilhões auriculares (Figura 8, 9, 10, 11), sendo que, em apenas um cão (1/34 - 2,9%) foi descrita a lesão na face côncava do pavilhão. Em todos os outros (33/34 - 97,1%), a face convexa foi a acometida.

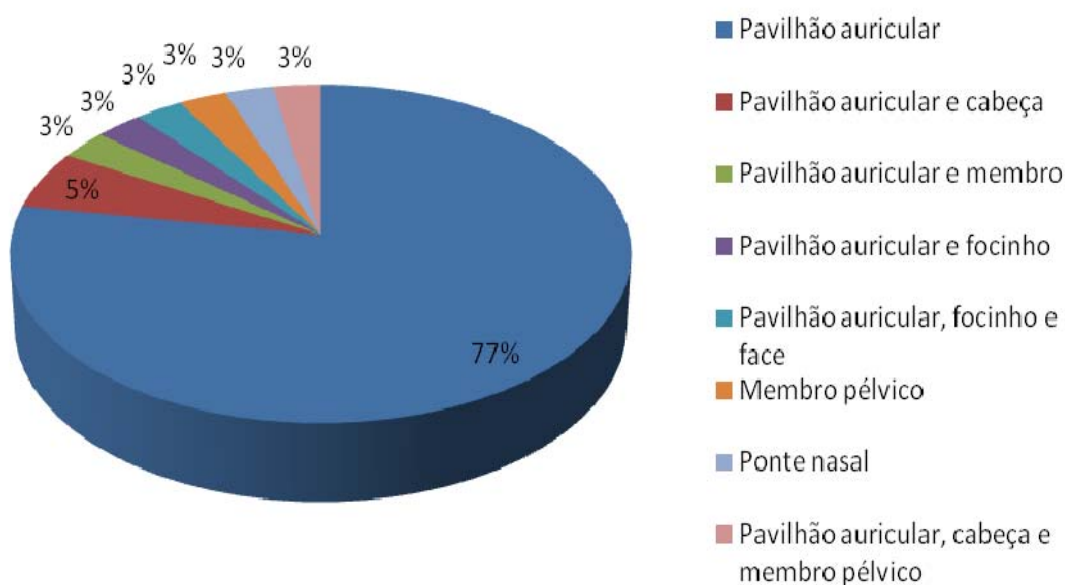


Figura 7 - Frequência da distribuição anatômica das lesões de cães acometidos por GLC (n= 36).

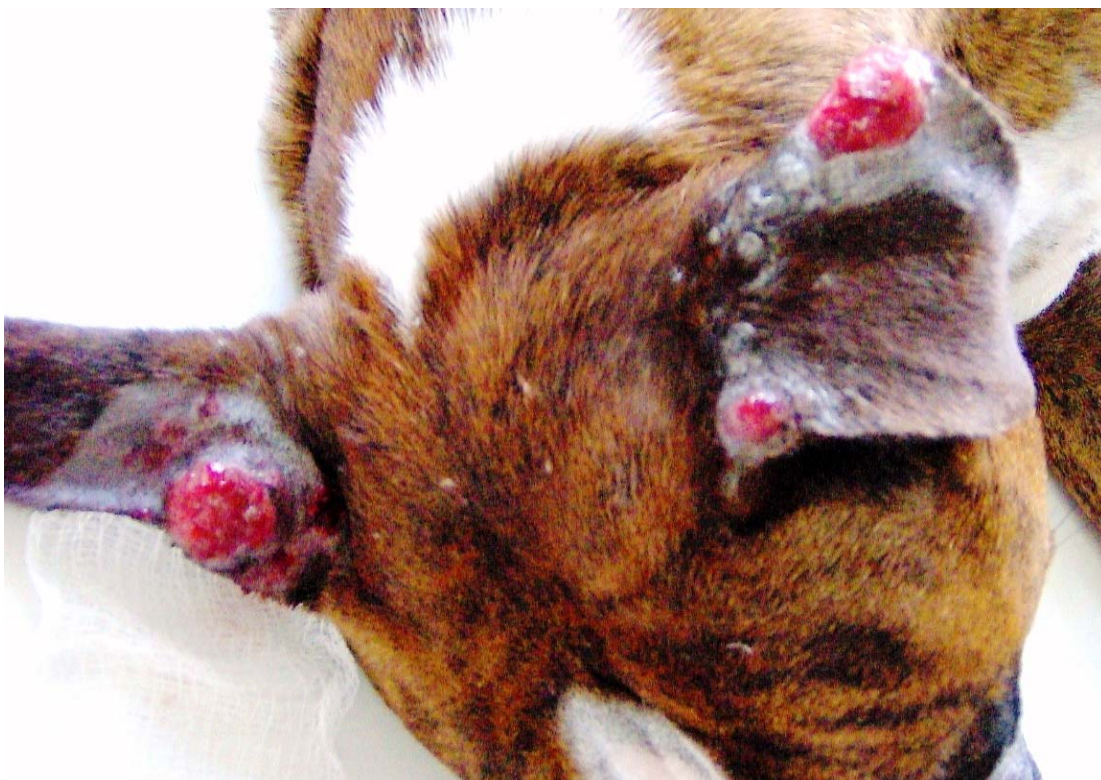


Figura 8 – GLC em cão da raça Boxer. Nódulos múltiplos ulcerados com distribuição bilateral na face convexa dos pavilhões auriculares.

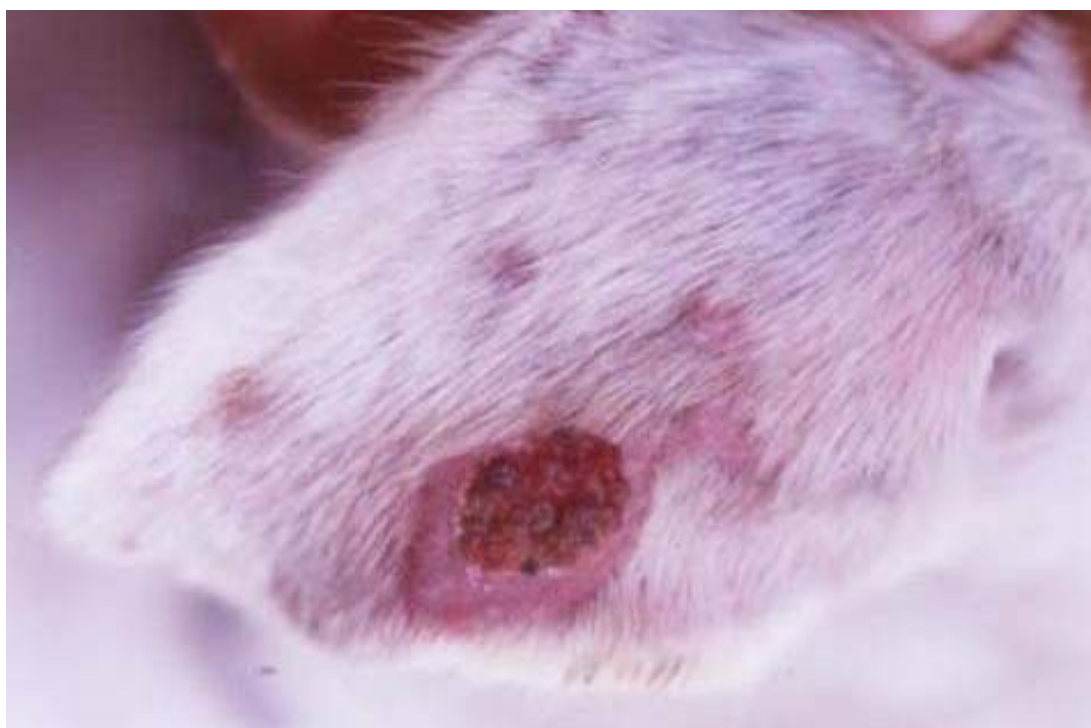


Figura 9: GLC em cão Boxer. Placa ulcerada e crostosa e pápulas satélites localizadas na face convexa de pavilhão auricular.

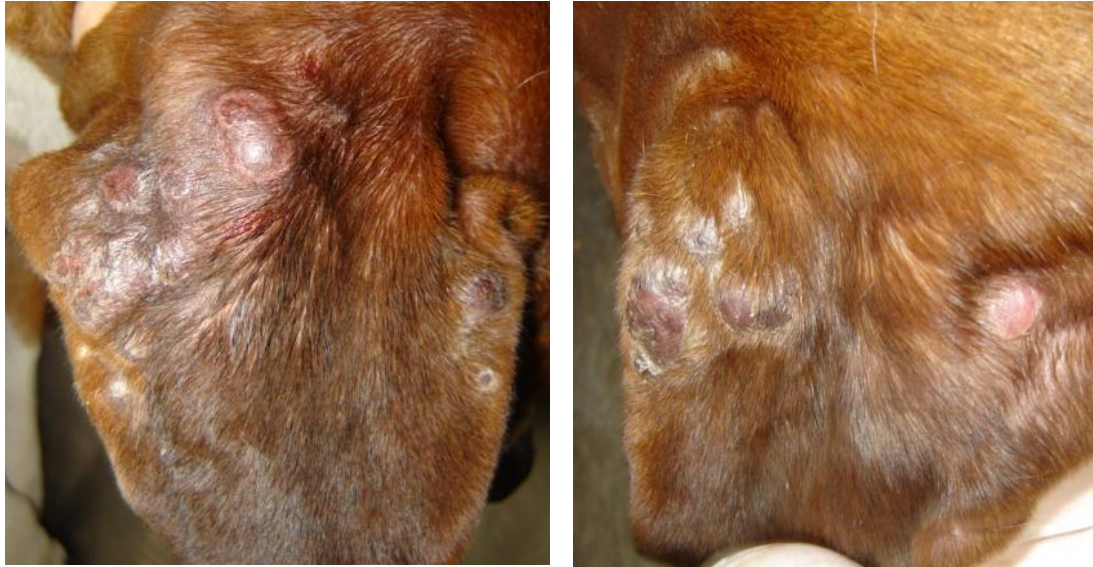


Figura 10 – GLC em cão Boxer. Nódulos múltiplos alopécicos, eritematosos a hiperpigmentados localizados na superfície convexa do pavilhão auricular. Alguns nódulos se coalescem e apresentam discreta exulceração e descamação.



Figura 11 – GLC em cão Boxer. Nódulo ulcerado, com margens bem definidas, com aproximadamente quatro centímetros de diâmetro na superfície convexa do pavilhão auricular direito.

Algum grau de desconforto, manifestado por dor ou prurido, foi relatado em sete animais (7/27 – 25,9%). Quanto à consistência, as lesões foram classificadas como firmes (26/30 – 86,7%), fibroelásticas (3/30 – 10%) e flutuantes (1/30 – 3,3%).

As lesões foram múltiplas em 29 animais (29/32 – 90,6%) e apenas três cães (9,4%) apresentaram nódulo único. Na maioria dos cães, as lesões apresentavam distribuição bilateral (19/31 – 61,3%) e, em 12 (38,7%), unilateral. Todas as lesões descritas eram circunscritas e bem delimitadas. Em 18 animais (18/30 – 60%) observaram-se ulcerações, principalmente nas lesões de maior tamanho.

Moscas e outros insetos alados estavam presentes no ambiente da maioria dos cães acometidos (20/23 – 87%). Em geral, as residências avizinhavam-se a parques ou terrenos baldios e os cães viviam principalmente fora de casa. Alguns animais habitavam áreas rurais ou as visitavam frequentemente. Em três cães (3/13 – 23%) foram relatadas feridas prévias ao desenvolvimento das lesões, provocadas por picadas de moscas e, em um caso, devido à bicagem de pássaros. Dois animais acometidos viviam no mesmo ambiente. Não foi verificada recorrência das lesões em nenhum dos casos estudados.

3.2. Estudo Histopatológico

A avaliação histopatológica foi realizada em 40 lesões de GLC, referentes a 35 cães. Em poucos casos não foi possível a análise de todas as variáveis. Cultura microbiológica foi realizada em apenas um caso e o resultado foi negativo para *Mycobacterium* sp.

As lesões do GLC caracterizaram-se por padrão histopatológico difuso (22/39- 56,4%) ou multinodular (17/39- 43,6%), com pequenos granulomas/piogranulomas compactos e coalescentes (Figura 12 e 13). Os infiltrados inflamatórios granulomatoso e piogranulomatoso, com maior quantidade de neutrófilos, ocorreram na mesma proporção (20/40- 50%) (Figura 14).

A celularidade foi semelhante em todos os casos, sendo os granulomas/piogranulomas compostos, predominantemente, por macrófagos epitelióides, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos, em proporções distintas (Figura15).

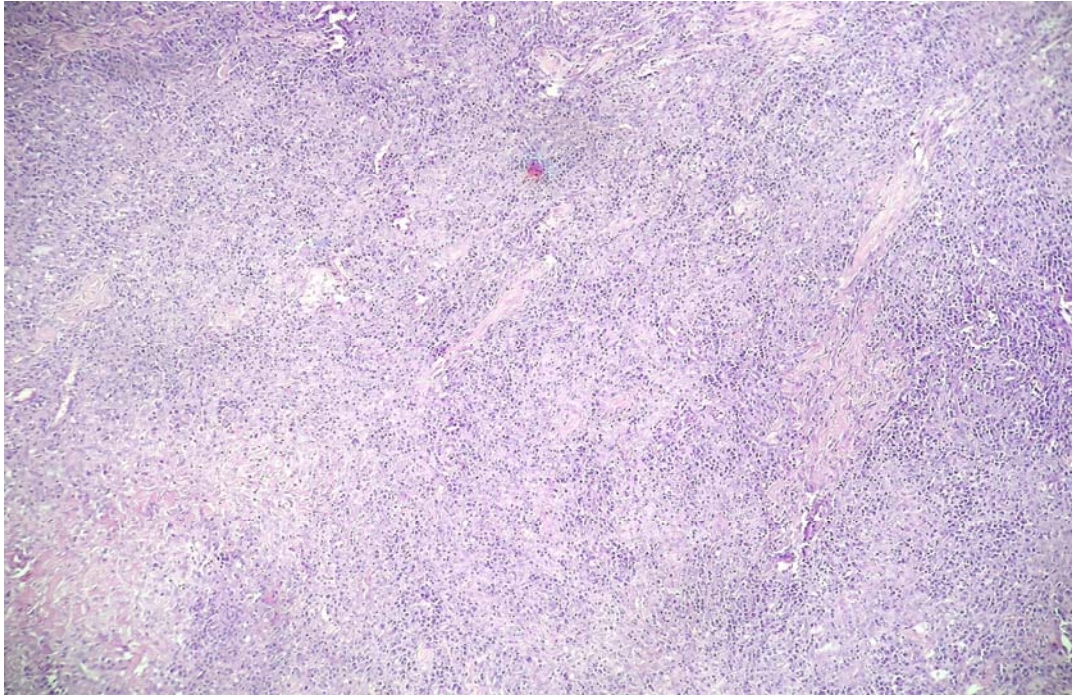


Figura 12: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. Dermatite difusa granulomatosa com infiltrado linfoplasmocitário (HE - aumento original 100X).

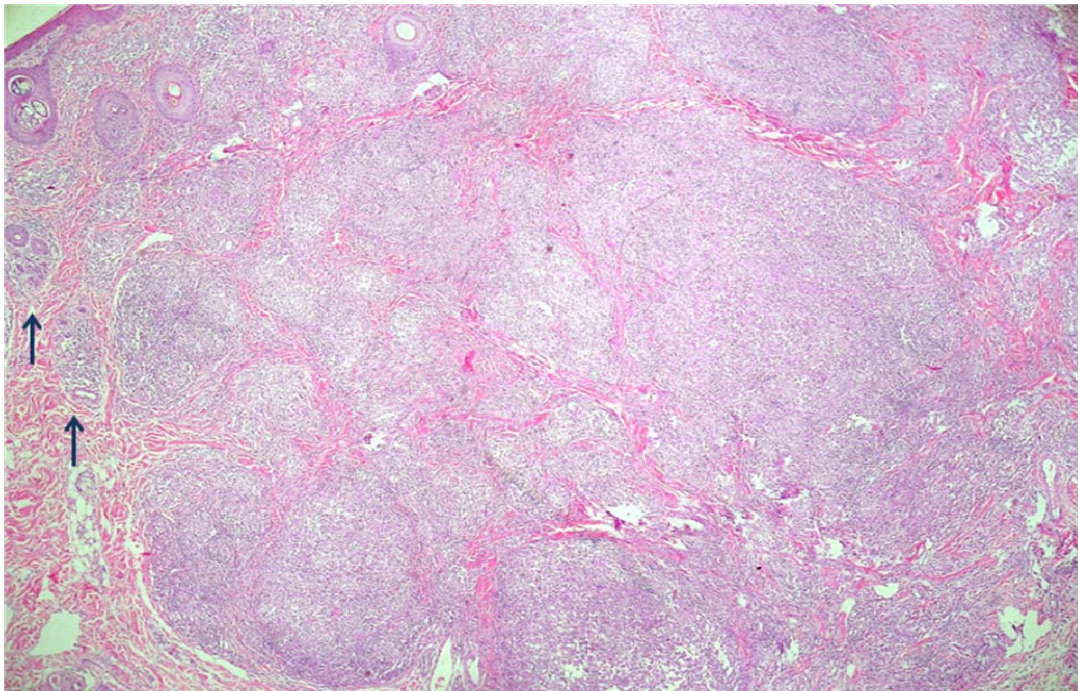


Figura 13: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. Dermatite nodular com formação de granulomas múltiplos, compactos e coalescentes em toda a derme. Notar a distribuição perianexial do infiltrado inflamatório na periferia da lesão (setas) (HE - aumento original 40X).

Vinte e três lesões apresentaram células gigantes (23/40- 57,5%) em quantidade discreta (15/23- 65,2%) a moderada (8/23- 34,8%) (Figura 16).

Na periferia de algumas das lesões verificou-se a orientação do infiltrado inflamatório contornando os folículos pilosos verticalmente, comprimindo os anexos, mas sem invadi-los, semelhante ao descrito como “formato de salsicha” (PANICH *et al.*, 1991) (14/40- 35%) (Figura 17).

Quanto à localização, a inflamação envolveu toda a derme em 25 exames (25/39- 64,1%), associada também ao subcutâneo (2/39- 5,1%) ou à interface com a epiderme (5/39- 12,8%). A localização do infiltrado apenas na derme profunda ocorreu em sete lesões (7/39- 17,9%). A epiderme apresentava ulceração em 17 lesões (17/40- 42,5%) e, quando íntegra, estava acantótica (16/40- 40%) ou sem alterações (7/40- 17,5%).

Necrose tecidual ocorreu em aproximadamente metade das lesões (21/40- 52,5%), com a seguinte distribuição: discreta (3/21- 14,3%), moderada (12/21- 57,1%) e intensa (6/21- 28,6%) (Figura 18). Focos de edema e proliferação vascular ocorreram em vários casos (7/40- 17,5% e 31/40- 77,5%, respectivamente). A proliferação vascular estava presente na maioria das lesões com distribuição geralmente uniforme no infiltrado inflamatório.

No interior de alguns granulomas/piogranulomas foram verificados anexos epidérmicos comprimidos pelo infiltrado (15/40- 37,5%), assim como melanofagia (12/40- 30%). Quando visíveis, os filetes nervosos, mesmo cerceados pelo processo inflamatório, não exibiam alterações histopatológicas importantes (17/40) (Figura 19). Nas demais lesões (23/40), os plexos nervosos não foram visualizados.

Não foi observada uniformidade em relação à quantidade de BAAR visualizados na coloração especial de Ziehl Neelsen. A quantidade de bacilos variou consideravelmente entre os animais, entre diferentes lesões de um mesmo animal e também no interior de uma mesma lesão. Onze lesões (11/36- 30,5%) apresentaram quantidade discreta de bacilos, quinze (15/36- 41,7%) moderada e dez (10/36- 27,8%) intensa. Embora estatisticamente não significativo ($p > 0.05$) pelo teste de qui-quadrado, observou-se uma maior concentração de BAAR no tecido necrótico (9/16-

56,3%) (Figura 20). Nesta análise, apenas foram incluídas apenas as lesões com necrose em quantidade moderada a intensa.

Não houve diferença estatística significativa entre as seguintes variáveis: 1) quantidade de bacilos e padrão histopatológico (multinodular e difuso); 2) quantidade de bacilos e aspecto do infiltrado inflamatório (granulomatoso e piogranulomatoso); 3) quantidade de bacilos e quantidade de células gigantes; e, 4) quantidade de células gigantes e padrão histopatológico (multinodular e difuso), todos avaliados na mesma lesão ($P>0.05$).

A morfologia dos bacilos não foi uniforme. Em vários casos, na mesma lesão, notaram-se tanto a morfologia bacilar íntegra como a fragmentada (Figura 21 e 22). Em 26 lesões (26/36- 72,2%) ocorreu o predomínio da forma bacilar íntegra.

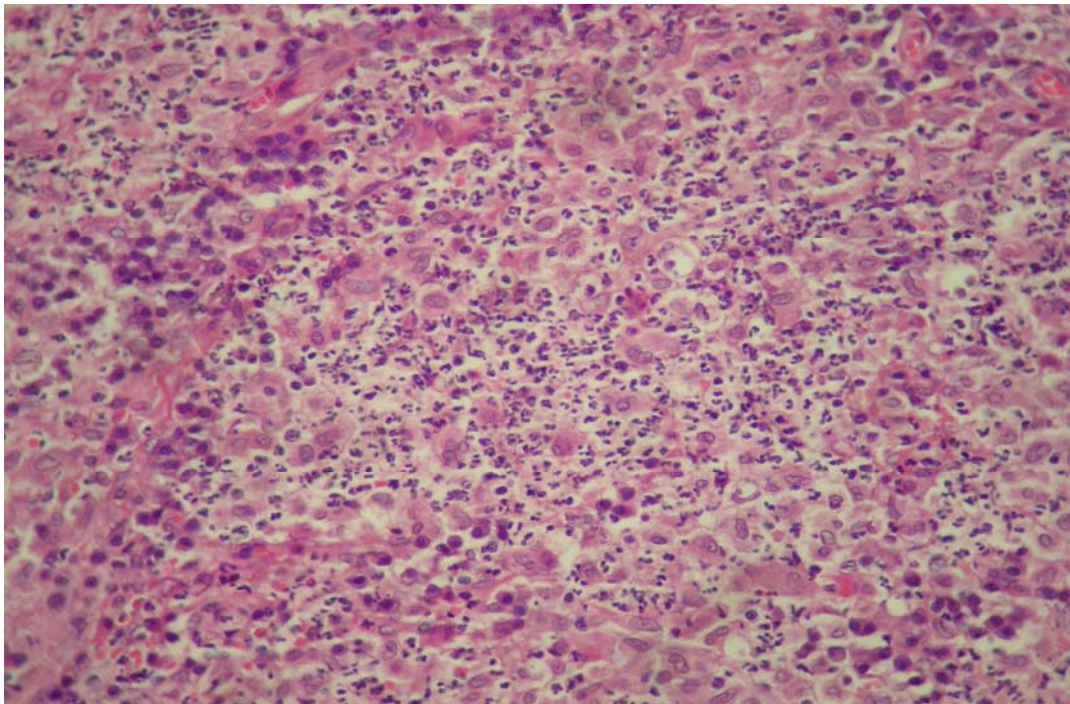


Figura 14: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. Dermatite piogranulomatosa difusa com grande quantidade de neutrófilos junto ao infiltrado inflamatório macrofágico e linfoplasmocitário (HE - aumento original 400 X).

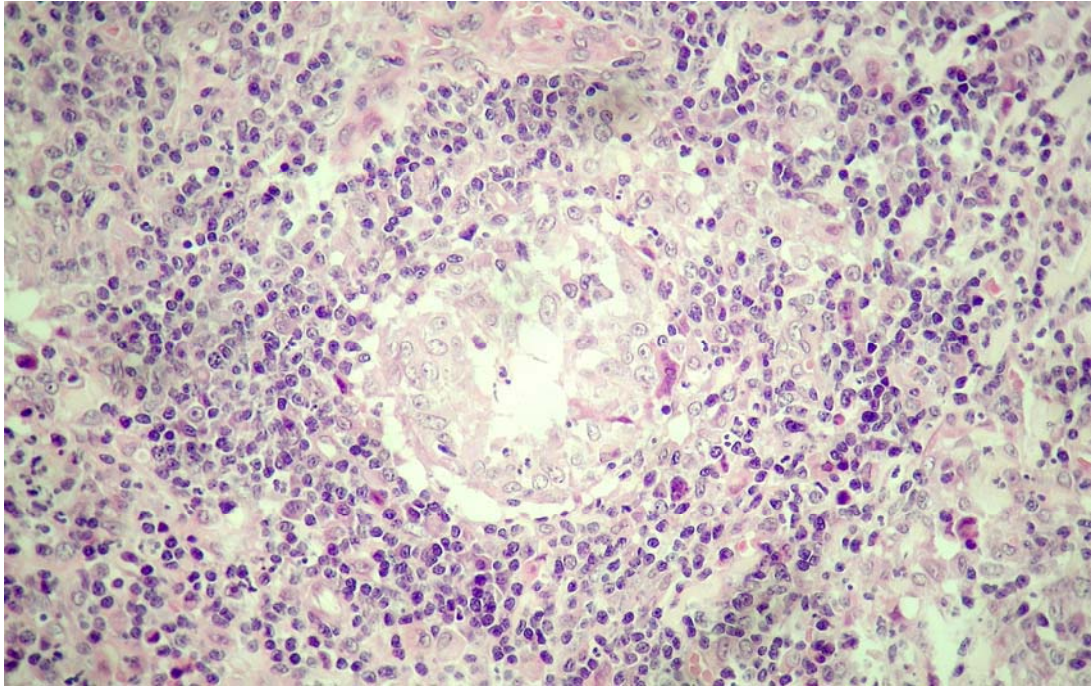


Figura 15: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. Granuloma bem definido formado por macrófagos epitelióides, circundado por infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (HE – aumento original 400X).

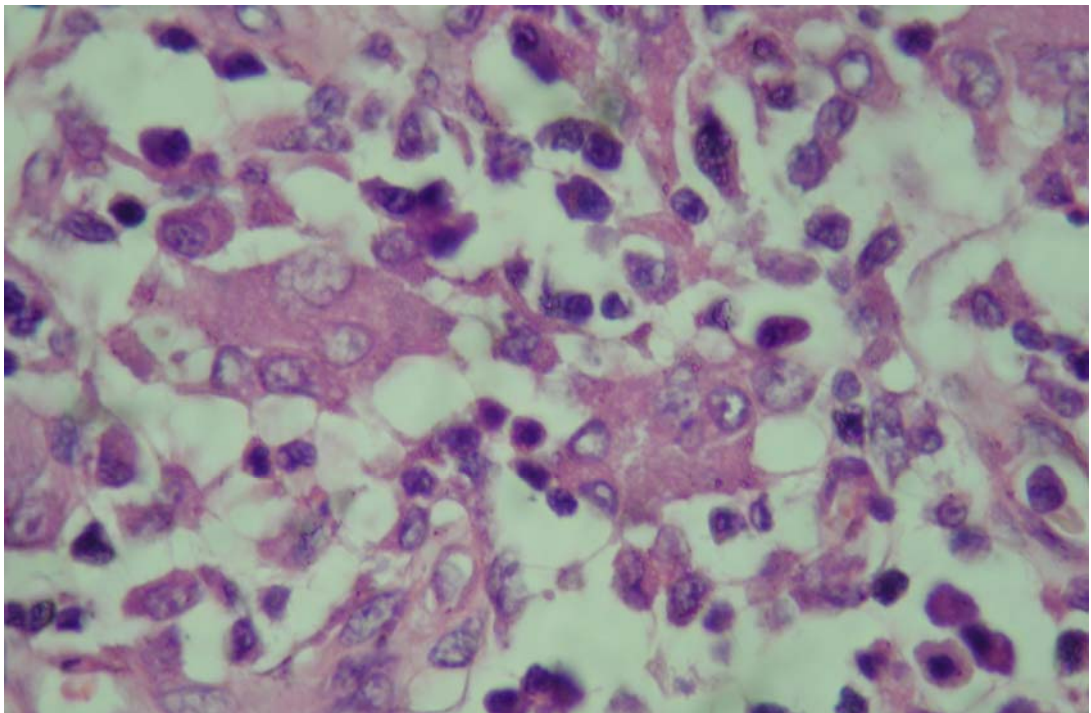


Figura 16: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. Infiltrado histioplasmocitário com células gigantes do tipo Langerhans (HE – aumento original 1000X).

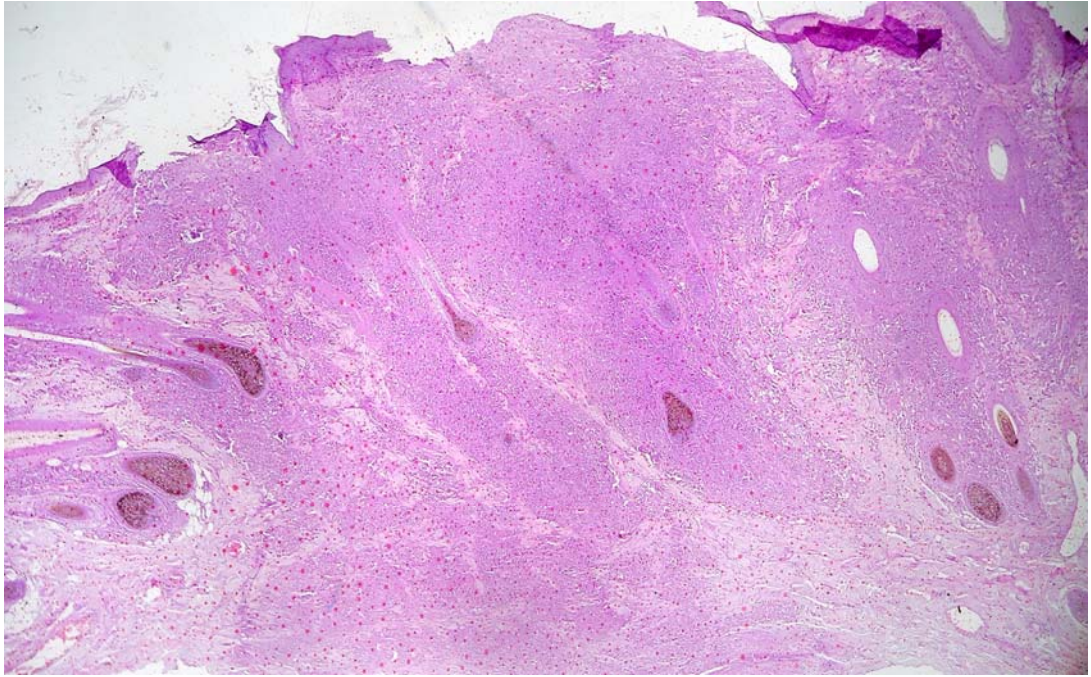


Figura 17: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. Orientação perianexial do infiltrado inflamatório, contornando os folículos pilosos (HE– aumento original 40X).

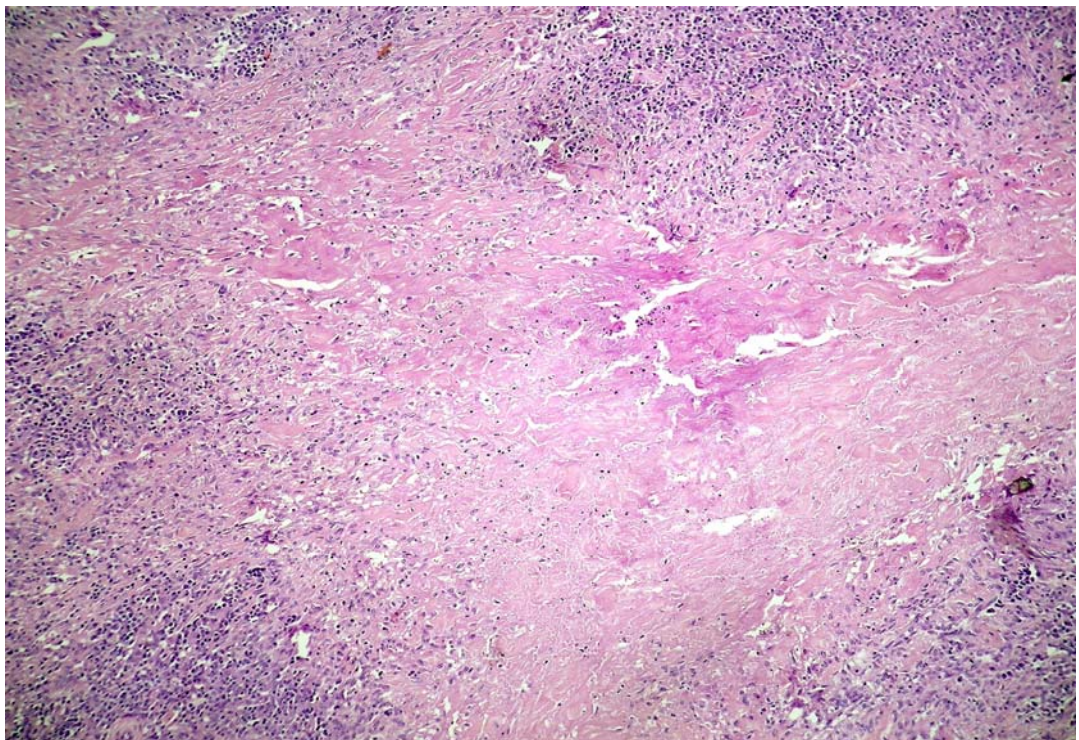


Figura 18: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. Extensa área de necrose de liquefação margeada por infiltrado inflamatório macrofágico e linfoplasmocitário (HE – aumento original 100X).

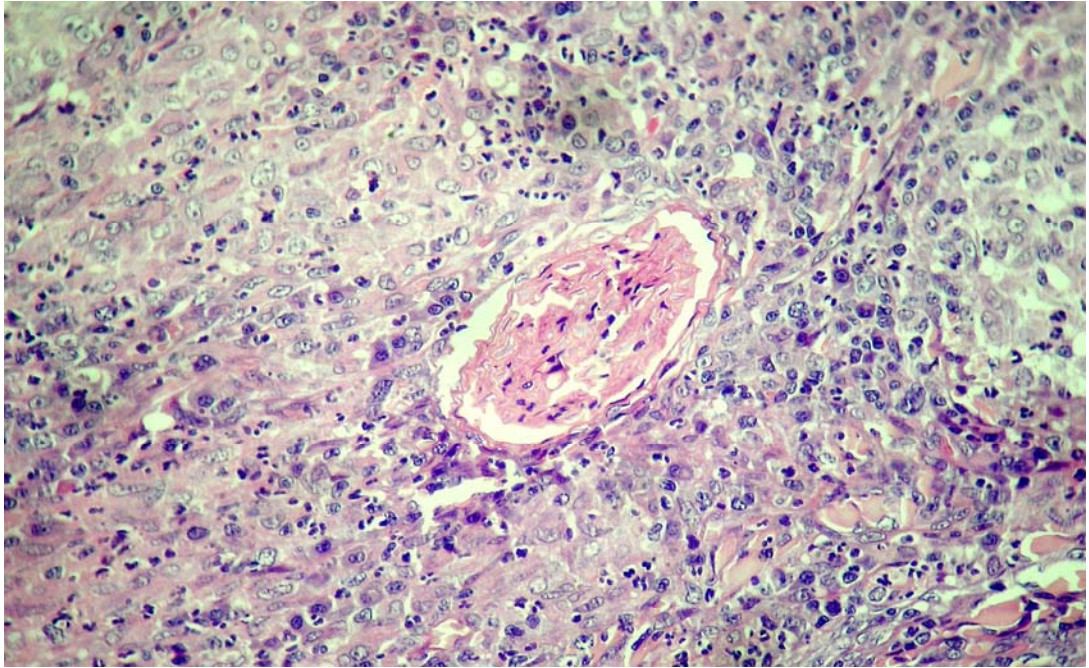


Figura 19: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. Filete nervoso íntegro no interior de granuloma, sem evidência de invasão inflamatória. Notar os focos de piogranulomas (HE – aumento original 400X).

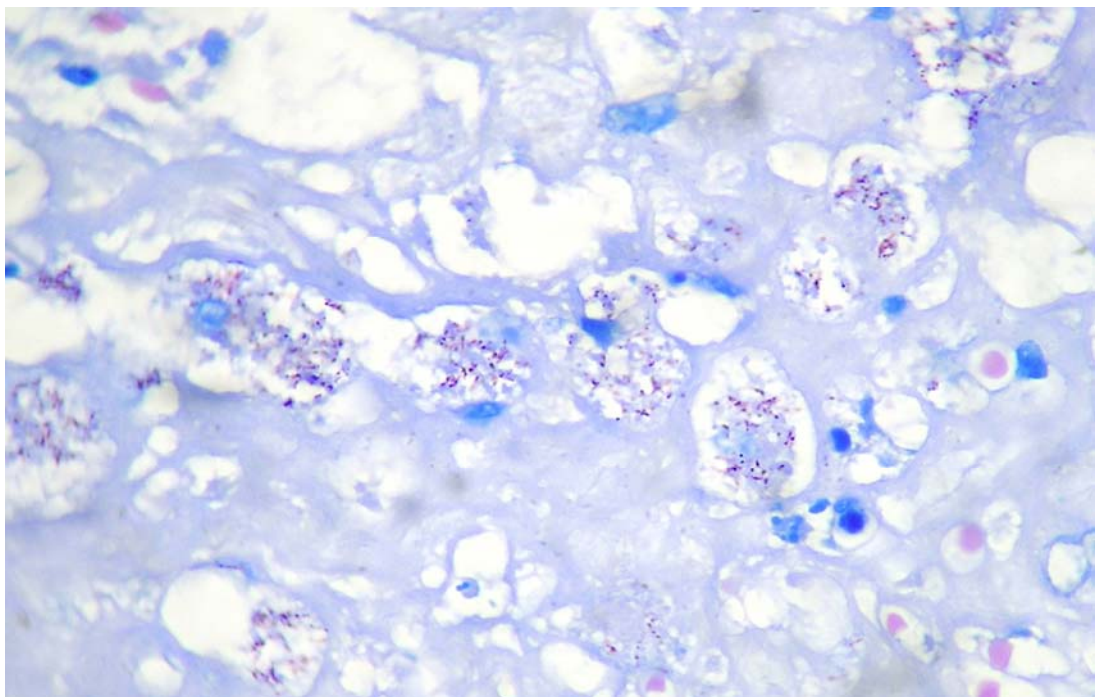


Figura 20: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. BAAR granulares em grande quantidade em área de necrose (Ziehl Neelsen – aumento original 1000X).

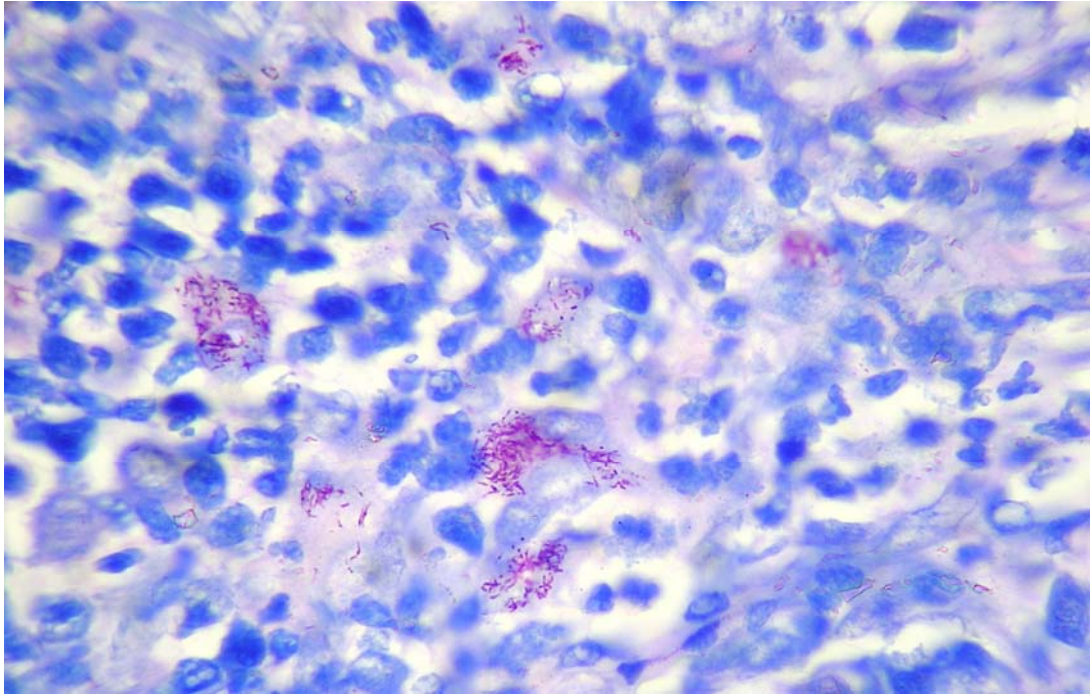


Figura 21: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. BAAR com morfologia predominantemente bacilar íntegra, intra e extracelulares (Ziehl Neelsen - aumento original 1000X).

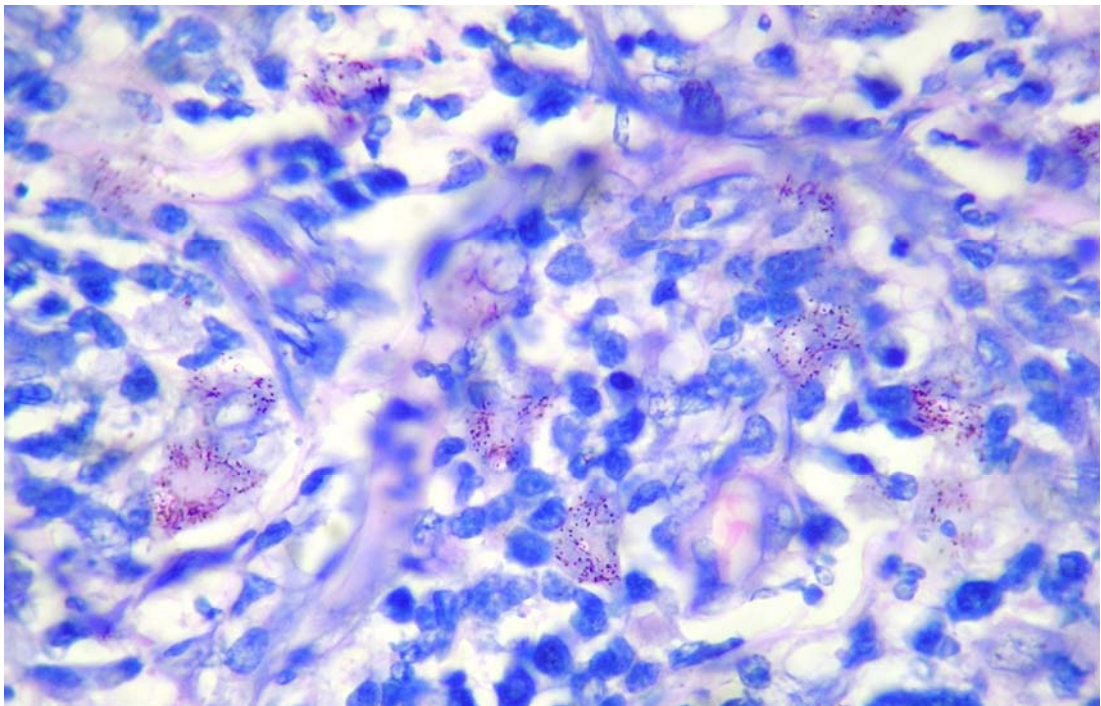


Figura 22: Corte histopatológico de pele de cão com GLC. BAAR com morfologia granular fragmentada, intra e extracelulares (Ziehl Neelsen – aumento original 1000X).

3.3. PCR e Sequenciamento genético

Na análise da PCR por eletroforese em gel de agarose, o produto da primeira amplificação, que seria de 590 pb, não foi visualizado em nenhuma das amostras avaliadas. Na segunda reação de amplificação (Nested), utilizando-se o par de primers M1 e R7, resultados positivos foram alcançados, com fragmento de aproximadamente 450 pb (Figura 23).

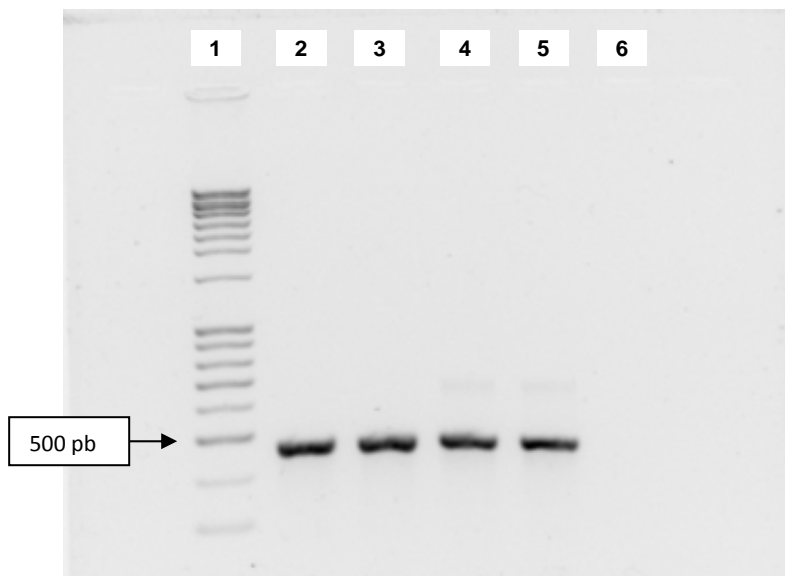


Figura 23: Nested PCR de cinco amostras de GLC para detecção de *Mycobacterium* sp. Raia 1, marcador molecular 100 pb (marca Norgen); Raia 2 a 5, lesões de GLC PCR positivas para *Mycobacterium* sp com banda de 455 pb; Raia 6, controle de reação branco negativo.

A reação de amplificação, realizada nos 25 fragmentos, foi positiva para a presença de *Mycobacterium* sp em 21 amostras, referentes a 18 animais (18/22 animais- 81,8 %). Apenas quatro (4/22 – 18,2%) fragmentos foram negativos, não ocorrendo amplificação do DNA da micobactéria. Três amostras representavam diferentes lesões em um mesmo animal e foram todas positivas. As amostras utilizadas para o controle negativo em todas as reações apresentaram resultados

negativos, garantindo a ausência de contaminação. A amostra controle cego, oriunda de outra lesão cutânea, também foi negativa.

Os dezoito animais positivos foram submetidos à análise por comparação com seqüências de *Mycobacterium* sp já descritos na literatura. A primeira análise foi feita com o *Mycobacterium murphy*, acesso AF144747, descrito por Hughes et al. (2000). O produto da amplificação foi 100% igual ao *Mycobacterium murphy* em 13 animais (13/18 – 72,2%) e o sequenciamento parcial do gene 16s rRNA está descrito na Figura 24.

```
ACGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCT
AATACCGGATATGACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAAGCTTTTGC
GGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGTATGGCCT
ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTG
GGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGGGGGATGACG
GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGT
ACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGGTGCGAGCG
```

Figura 24: Sequenciamento genético parcial do gene 16s rRNA do *Mycobacterium Murphy*.

As micobactérias sequenciadas de diferentes lesões de um mesmo animal foram idênticas entre si. O produto da amplificação das amostras dos outros cinco cães (5/18– 27,8%) não apresentaram 100% de identificação à seqüência do *Mycobacterium murphy* e também foram diferentes quando comparados entre si (Quadro 1). Estas amostras foram analisadas com outras espécies de micobactérias utilizando-se os bancos de dados nos sites www.rdna2.ridom.de, www.nvbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_tree.cgi, EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) e Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e suas seqüências estão descritas na Tabela 1.

Amostra 1

ACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATACACCTC
GCTGGCCGCATGGTCTGGTGGGGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGGGCCCCGGGCCTATCAGCTT
GTTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACA
CTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGCG
CAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCCCTTTTCAGCACA
GACGAAGCGCGAGTGACGGTATGTGCAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATAC

Amostra 2

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATACACCCT
GCTGGTTCGCATGGCCTGGTGGGGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGGGCCCCGGGCCTATCAGCTT
GTTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACAC
TGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGCGC
AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAACGCCG
ACGAAGCCTGAGTGACGGTAGGCGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGGTGC GA

Amostra 3

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCG
CATGCTGCATGGTGTGTGGTGCAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGAGCCCGGGCCTATCAGCTTGT
GGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTG
GGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAC
GAAGCGAAAAGTGACGGTACCTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGGTGC GA

Amostra 4

TGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCACG
GACCTTCATGGCGTTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGGGCCCCGGGCCTATCAGCTTGT
GGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTG
GGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCACCAGGGGA
CGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGGTGC GA

Amostra 5

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACTA
CGCGATGCATGTCGTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGGGCCCCGGGCCTATCAGCTTGT
GGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTG
GGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCATAGGGACG
AAGCGCAAGTGACGGTACCTAGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGGTGC GA

Tabela 1: Sequência genética parcial do gene 16s rRNA das cinco espécies de micobactérias identificadas nas lesões de GLC que não corresponderam ao *M. murphy*. (Os primers não foram incluídos na sequência).

Uma dentre as cinco micobactérias identificadas apresentou homologia de 100% com a sequência do *Mycobacterium* XN10-17, acesso FJ358417, descrita por Luo, X. (2008). As outras quatro espécies identificadas não apresentaram homologia de 100% com nenhuma das micobactérias que tem suas sequências genéticas depositadas nos bancos de dados pesquisados. Os melhores valores de homologia foram encontrados com os seguintes microrganismos: *Uncultured bacterium* ARFS-3, acesso AJ277836 (98% homologia); *Mycobacterium* sp. L47, acesso DQ249999 (98%); *Mycobacterium immunogenum* strain CIP 106684T, acesso AY457080 (98%); *Mycobacterium genavense*, acesso EU742187 (97%); *Mycobacterium tilburgii*, acesso Z50172, descrito por Vos, M.C. et al (1995) (97%); *Mycobacterium murphy*, acesso AF144747, descrito por Hughes et al. (2000) (97%); *Uncultured bacterium*, acesso EU132651 (98%).

MICOBACTERIUM	ACESSO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>Mycobacterium sp. Murphy</i> 16S ribossomal RNA.	AF144747	100%	100%	100%	93%	100%	A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	93%	100%	A	100%	A	95%	97%	A	96%
<i>Mycobacterium tilburgii</i> 16S ribossomal RNA.	Z50172	99%	99%	99%	94%	99%	M	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	93%	99%	M	99%	M	95%	97%	M	96%
<i>Mycobacterium genavense</i> 16S ribossomal RNA.	EF107701	99%	99%	99%	93%	99%	O	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	93%	99%	O	99%	O	95%	97%	O	96%
<i>Mycobacterium triplex</i> 16S ribossomal RNA.	AJ535505	97%	97%	97%	90%	97%	S	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	92%	97%	S	97%	S	92%	94%	S	95%
<i>Mycobacterium interjectum strain</i> 16S ribossomal RNA	AF 547937	98%	98%	98%	94%	98%	T	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	94%	98%	T	98%	T	95%	96%	T	96%
<i>Mycobacterium simiae</i> 16S ribossomal RNA	EU022520	98%	98%	98%	94%	98%	R	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	94%	98%	R	98%	R	95%	96%	R	96%
<i>Mycobacterium heidelbergense</i> 16S ribossomal RNA.	X70960	98%	98%	98%	94%	98%	A	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	94%	98%	A	98%	A	95%	95%	A	96%
<i>Mycobacterium lentiflavum</i> 16S ribossomal RNA.	AB362381	98%	98%	98%	93%	98%		98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	94%	98%		98%		95%	96%		96%
<i>Mycobacterium kubicae</i> 16S ribossomal RNA	AF 547941	97%	97%	97%	93%	97%	N	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	92%	97%	N	97%	N	95%	95%	N	96%
<i>Mycobacterium goodii</i> 16S ribossomal RNA	DQ 447773	94%	94%	94%	97%	94%	E	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	93%	94%	E	94%	E	94%	93%	E	93%
<i>Mycobacterium smegmatis</i> 16S ribossomal RNA	AJ 536041	93%	93%	93%	97%	93%	G	93%	93%	93%	93%	93%	93%	93%	96%	93%	G	93%	G	92%	92%	G	92%
<i>Mycobacterium madagascariense</i> 16S ribossomal RNA	AF547943	94%	94%	94%	97%	94%	A	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	97%	94%	A	94%	A	93%	93%	A	93%
<i>Mycobacterium moriokaense</i> 16S ribossomal RNA	AY859686	94%	94%	94%	96%	94%	T	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	97%	94%	T	94%	T	94%	93%	T	94%
<i>Mycobacterium mageritense</i> 16S ribossomal RNA	AJ699399	94%	94%	94%	97%	94%	I	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	I	94%	I	94%	94%	I	94%
<i>Mycobacterium duvalii</i> 16S ribossomal RNA	AF 547918	93%	93%	93%	96%	93%	V	93%	93%	93%	93%	93%	93%	93%	95%	93%	V	93%	V	92%	92%	V	92%
<i>Mycobacterium sp.</i> 16S ribossomal RNA	AF 325531	100%	100%	100%	94%	100%	A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	93%	100%	A	100%	A	95%	97%	A	96%

Quadro 1: Homologia das sequências obtidas de lesões de cães com GLC com algumas espécies descritas na literatura. Amostra 6, 16, 18 e 21 negativas para *Mycobacterium sp.*

4. DISCUSSÃO

No presente estudo o GLC ocorreu principalmente em raças de pêlo curto e grande porte, apresentando os cães da raça Boxer, Dogue de Bordeaux e Rotweiller maior risco para desenvolver a doença. A razão da predileção da raça Boxer não é conhecida, mas tem sido citada em diversas partes do mundo (LEMARIE, 1999; MALIK *et al.*, 1998; MALIK *et al.*, 2006). Apenas o pelame curto, o porte e a conformação das orelhas não são suficientes para justificar tal predileção, uma vez que raças bem difundidas e fenotipicamente semelhantes não são acometidas com tanta frequência. Talvez exista alguma predisposição genética para a raça Boxer ou uma deficiência na resposta imunológica à micobactéria, com mínima disfunção linfocitária ou fagocítica, que permita a infecção, mas que seja suficiente para prevenir a disseminação do microrganismo.

O acometimento dos pavilhões auriculares é tradicionalmente descrito para a doença (MALIK *et al.*, 1998; LEMARIE, 1999; FOLEY *et al.*, 2002; MALIK *et al.*, 2006). Essa preferência anatômica é ainda de teoria especulativa, remetendo à provável forma de transmissão da doença.

Embora a etiopatogenia do GLC não seja bem compreendida, acredita-se que a micobactéria seja inoculada via percutânea, através de picadas de insetos em animais susceptíveis (LEMARIE, 1999; SCOTT *et al.*, 2001; MALIK, 2004; TWOMEY *et al.*, 2005). Algumas observações do presente estudo, além do encontrado na literatura, dão suporte a esta hipótese. As lesões ocorreram preferencialmente nas regiões anatômicas mais susceptíveis a picadas de insetos, como orelhas e segmento cefálico. Particularmente, a pele dos pavilhões auriculares aparenta possuir menor densidade pilosa e vascularização mais superficial que, eventualmente, facilitaria o repasto sanguíneo. Ainda, os animais de grande porte passam normalmente mais tempo fora de casa (SCOTT *et al.*, 2001; MALIK *et al.*, 2006). Acredita-se que a infecção também possa ocorrer através de feridas cutâneas e arranhaduras por gato (FOLEY *et al.*, 2002). No presente estudo, em dois cães foram relatadas feridas nos pavilhões auriculares prévias ao desenvolvimento das lesões granulomatosas. Além disso, a presença de

moscas e outros insetos no ambiente dos cães acometidos foi citada na maioria dos casos e reforça esta hipótese de transmissão da micobactéria.

As ulcerações foram observadas com maior frequência nas lesões maiores. Maior probabilidade de traumatismo, comprometimento vascular e reação inflamatória severa com dano tecidual podem ser responsáveis por essa alteração. Apesar do aspecto macroscópico preocupante, a enfermidade pareceu pouco incomodar, com apenas alguns animais demonstrando dor ou prurido.

O tempo de evolução relatado na maioria dos casos sugeriu rápido desenvolvimento, embora esta informação não tenha sido completamente confiável em todos os casos. Em alguns casos houve demora dos proprietários na procura por atendimento médico e diagnóstico da doença. Entretanto, a descrição de um cão com lesão há dois anos enfatiza o baixo potencial patogênico do agente infeccioso, sem a progressão das lesões e ausência de acometimento de órgãos internos.

Todos os cães, à exceção de um, estavam sistemicamente saudáveis, sem envolvimento aparente de órgãos internos, concordando com as descrições prévias (MALIK *et al.*, 1998; LEMARIE, 1999; SCOTT *et al.*, 2001; FOLEY *et al.*, 2002; MALIK *et al.*, 2006). O aumento de linfonodos submandibulares foi descrito em dois cães. Em um dos casos, esse achado provavelmente ocorreu devido à extensa ulceração e avantajada dimensão das lesões. Outro cão havia sido resgatado da rua em estado de emaciação. Essas observações reforçam o fato de que a micobactéria causadora do GLC seja saprófita, com baixa patogenicidade e incapaz de invadir tecidos profundos, restringindo-se à pele e ao tecido subcutâneo de cães (CHARLES *et al.*, 1999; FOLEY *et al.*, 2002; MALIK *et al.*, 2006).

Aproximadamente dois terços dos casos (65,4%) de GLC ocorreram nos meses mais quentes do ano no Brasil (setembro a março). Outro estudo refere o oposto em relação à sazonalidade: maior ocorrência nos meses mais frios do ano, como no outono e inverno (MALIK *et al.*, 1998). Foi proposto que o período de incubação do agente pudesse ser longo, com a inoculação do microrganismo podendo ocorrer nos meses mais quentes, quando o número de possíveis vetores é maior, e com a manifestação da doença apenas meses mais tarde. Outra hipótese referiu maior predileção do microrganismo para se desenvolver em regiões anatômicas mais frias do corpo, como

nos pavilhões auriculares (MALIK *et al.*, 1998; FOLEY *et al.*, 2002). Entretanto, essa diferença de comportamento não pode ser facilmente explicada. O confinamento das lesões na pele e subcutâneo dos cães também pode estar relacionado à resposta imune do hospedeiro e à baixa patogenicidade do microrganismo. Em nossa região, nos meses mais quentes do ano, é maior o número de moscas, mosquitos ou outros vetores que sabidamente molesta os cães em nossas regiões e que poderiam transmitir o agente infeccioso. Ainda, curiosamente, as cidades brasileiras (São Paulo, Belo Horizonte, Viçosa e Juiz de Fora) possuem latitudes e alguma variação climática semelhantes a certas regiões da Austrália (p.ex. Sidney) (ALLMETSAT, 2009), onde foi feita a primeira descrição de sazonalidade. Estudos adicionais são necessários para explicar essa diferença sazonal da doença.

Os sinais clínico-dermatológicos do GLC foram fortemente sugestivos da doença, no entanto, deve ser feito o diagnóstico diferencial com outras enfermidades granulomatosas, sejam infecciosas, parasitárias ou estéreis, e com as neoplasias (SCOTT *et al.*, 2001; FOLEY *et al.*, 2002; GROSS *et al.*, 2005). O diagnóstico definitivo baseou-se nos achados clínicos e, sobretudo, histopatológicos. As micobactérias são bacilos álcool ácido resistentes. A grande camada de lipídeos de sua parede celular retém o corante de carbofuchsina, mesmo após a descoloração com ácido e álcool, conferindo aos microrganismos a cor rósea nas colorações especiais de Faraco modificado e Ziehl Neelsen (MUNDELL, 1995; CHARLES *et al.*, 1999). Não é possível cultivar e isolar a micobactéria causadora do GLC utilizando-se dos protocolos para as outras espécies de micobactérias (MALIK *et al.*, 1998; LEMARIE, 1999; MALIK *et al.*, 2006). De fato, em função da forte suspeita baseada nos sinais clínicos e achados histopatológicos, apenas um caso foi submetido à cultura microbiana com resultado negativo. Entretanto, o resultado negativo é importante, pois permite excluir outras micobacterioses de importância zoonótica (MALIK *et al.*, 2006).

Não foram observados casos recorrentes, concordando com o prognóstico favorável da doença. Mas, alguns cães podem desenvolver lesões crônicas, severas e refratárias ao tratamento (MALIK *et al.*, 2001; MALIK *et al.*, 2006).

No presente estudo, os achados histopatológicos do GLC foram semelhantes aos descritos previamente (CHARLES *et al.*, 1999; MALIK *et al.*, 2006). O infiltrado

granulomatoso acometeu a derme e variavelmente a interface dermo epidérmica e o tecido subcutâneo. O subcutâneo foi acometido em menor número de casos, dado a ocorrência da maioria das lesões nos pavilhões auriculares, que não apresentam este tipo de tecido (SCOTT *et al.*, 2001).

A maior vascularização da derme perianexial pode explicar a freqüente disposição perianexial dos granulomas nos casos de GLC. Em muitos casos, esse padrão foi identificado na periferia das lesões mais difusas, mas em outros, contornava caprichosamente apenas os anexos. Esse padrão inflamatório foi identificado como muito sugestivo para os quadros de granulomas/piogranulomas estéreis em cães (PANICH *et al.*, 1991; SANTORO *et al.*, 2008). Estudo molecular (PCR) e imunoistoquímica de casos diagnosticados como síndrome do granuloma estéril canino demonstrou positividade para *Leishmania* sp (CORNEGLIANI *et al.*, 2005). O GLC, conforme verificado na presente pesquisa, deve também ser incluído na lista dos diagnósticos diferenciais. Em nosso estudo, além da baciloscopia positiva, todos esses casos em que foi feita a PCR, obtiveram resultados positivos para *Mycobacterium* sp.

Tuberculose cutânea e granuloma micobacteriano da pele canina foram os termos utilizados para descrever inicialmente a enfermidade no Zimbabwe em 1973 (SMITH, 1973). A denominação granuloma lepróide canino foi empregada em 1998 (Malik *et al.* 1998). Lepróide diz respeito a algo que se assemelha a lepra. Embora em alguns aspectos tal fato possa ser entendido, pois trata-se de enfermidade cutânea causada por micobactéria não cultivável, existem diferenças que não podem deixar de ser citadas. Inicialmente, lepra, termo usado para descrever a milenar doença cutânea em seres humanos, significa em latim, descamativo, em alusão ao aspecto lesional muito freqüente da enfermidade. O GLC não se manifesta por placas eritemato descamativas e sim por lesões nodulares e frequentemente ulcerativas. A ulceração pode ocasionalmente ocorrer na lepra nas reações do tipo I, vistas tipicamente nos pacientes TT ou BT, mas o curso clínico agudo não confere com a evolução geralmente crônica do GLC. As lesões do GLC ocorreram com freqüência no pavilhão auricular, região onde podem existir lesões na lepra lepromatosa. No entanto, os animais com GLC não apresentam lesões generalizadas e simétricas por todo o corpo nem sinais de acometimento sistêmico. Histologicamente há também diferenças. Piogranulomas bem definidos ocorreram em metade dos casos e mesmo nos infiltrados mais epitelióides, os

neutrófilos estavam sempre presentes. Os neutrófilos não são relatados na lepra humana, a não ser nas reações do tipo II (eritema nodoso hansênico) que não apresenta compatibilidade clínica com o GLC. A independência ou a ausência de associação entre a quantidade de células gigantes e o padrão histopatológico, células gigantes e a quantidade de bacilos, bem como entre o padrão histopatológico e a quantidade de bacilos não conferem com os achados da lepra. Na lepra, essas características inter relacionadas permitem a classificação dos pacientes em um dos grupos do espectro. A falta de relação dessas variáveis no estudo histopatológico não suporta que diferenças na resistência do hospedeiro possam eventualmente existir e influenciar na recuperação clínica. O envolvimento nervoso, característico da lepra, não foi verificado em nenhum dos casos de GLC. Embora a informação sobre sensibilidade das lesões seja difícil de ser avaliada em animais, na histopatologia, os feixes nervosos no interior do processo inflamatório apresentavam-se íntegros. Ademais, nenhum bacilo foi encontrado no interior dos nervos. Entretanto, para melhor avaliação do comprometimento nervoso a técnica de imunoistoquímica anti proteína S-100 poderia mostrar resultados mais esclarecedores. (FLEURY, 2005). Diante do exposto, sugerimos que **granuloma micobacteriano cutâneo canino**, como já anteriormente citado (SMITH, 1979), seja mais apropriado para essa enfermidade.

A PCR é uma técnica de grande valor no diagnóstico etiológico de infecções micobacterianas em animais, especialmente para os agentes de difícil cultivo ou daqueles não cultiváveis (HUGHES *et al.*, 2000). Em nosso estudo, a PCR foi positiva na maioria dos casos testados, comprovando a presença de DNA micobacteriano nas lesões do GLC. O número de pares de base verificados foi similar ao descrito por Hughes *et al.* (2000), validando a técnica realizada.

Os resultados negativos provavelmente ocorreram devido à conservação inadequada do material em formol, que pode ter desintegrado o DNA e impossibilitado a sua amplificação. A análise de amostras com pequena quantidade de bacilos visualizados na histopatologia não justifica os resultados negativos encontrados. Outras amostras caracterizadas histopatologicamente com raros bacilos apresentaram resultados positivos na PCR, garantindo o diagnóstico preciso mesmo com pouco material genético.

A amplificação e seqüenciamento das regiões V2 e V3 do gene 16s rRNA têm sido recomendada para o diagnóstico e a identificação de espécies de micobactérias (HUGHES *et al.*, 2000; FOLEY *et al.*, 2002; CHAKRAVORTY *et al.*, 2007). Estas regiões apresentam grande heterogeneidade de nucleotídeos capazes de distinguir e identificar espécies (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007), sendo, por isso, realizada em nosso estudo.

A principal espécie da micobactéria causadora do GLC foi descrita inicialmente na Irlanda, a partir de casos australianos e foi denominada *Mycobacterium murphy* (HUGHES *et al.*, 2000). Em 2002, pesquisa semelhante foi executada nos Estados Unidos, com resultados de 99 a 100% de homologia com os casos australianos (FOLEY *et al.*, 2002). No presente estudo, o *M. murphy* também foi o agente identificado com maior frequência. Entretanto, o restante das micobactérias seqüenciadas, além de não serem homólogas ao *M. murphy* e às descritas na literatura, também não foram semelhantes entre si, sugerindo maior variedade de espécies responsáveis pelo GLC no Brasil.

Essa variedade de micobactérias, associada à semelhança clínico epidemiológica de todos os casos de GLC estudados, apontam para a possibilidade de tratarem-se de microrganismos saprófitas e pouco patogênicos, concordando com a literatura (CHARLES *et al.*, 1999; FOLEY *et al.*, 2002).

As micobactérias induzem resposta inflamatória do tipo granulomatosa (COLLINS, 1999; RINGLER, 2000) e várias espécies, inclusive as saprófitas, têm sido envolvidas em dermatoses granulomatosas de cães, gatos e também de humanos. As micobacterioses atípicas em cães e gatos são um exemplo. Causadas por microrganismos saprófitas, comumente encontrados na água e no solo, são inoculados na pele por material contaminado. As micobacterioses atípicas caracterizam-se por nódulos, úlceras e tratos fistulosos crônicos ou recorrentes, que ocorrem sobretudo em abdome ventral e região inguinal, diferindo do quadro clínico de GLC. A maioria das micobactérias envolvidas é classificada como de rápido crescimento e incluem *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. xenopi* e *M. thermoresistibile* (MUNDELL, 1995; LEMARIE, 1999), havendo também um relato de *M. goodii* em cão (BRYDEN *et al.*, 2004). A homologia entre estas micobactérias de rápido crescimento e

as identificadas no presente estudo foi baixa (menor que 94%), com apenas a *M. smegmatis* apresentando homologia de 97% com uma das amostras analisadas.

Atualmente, com o desenvolvimento de novas técnicas moleculares de diagnóstico, novos microrganismos têm sido descritos em enfermidades infecciosas. A lepra felina, micobacteriose que se assemelha ao GLC e conhecidamente causada pelo *M. lepraemurium*, teve recentemente novas espécies incluídas em sua etiologia como o *Mycobacterium* sp. strain Tarwin (FYFE *et al.*, 2008). De forma semelhante ao GLC, os microrganismos causadores da lepra felina são de difícil cultivo e a transmissão parece ocorrer por trauma (feridas provocadas por ratos, picadas de insetos ou introdução de material contaminado) (MUNDELL, 1995; FYFE *et al.*, 2008). Assim como ocorre na lepra felina, outras espécies de micobactérias, provavelmente saprófitas e inoculadas por vetores ou trauma, estão envolvidas na patogenia do GLC, como demonstrado no presente estudo. Clinicamente, as lesões observadas na lepra felina causadas pelas diferentes espécies de micobactéria se assemelham entre si (FYFE *et al.*, 2008), o que também foi verificado nos casos de GLC aqui descritos. Entretanto, apesar da ocorrência de novas espécies, o *M. murphy* representa um importante agente etiológico da doença, uma vez que foi encontrado em outros países e identificado na maioria dos casos brasileiros (HUGHES *et al.*, 2000; FOLEY *et al.*, 2002).

5. CONCLUSÕES

- Os cães de grande porte e pelagem curta, sobretudo os animais da raça Boxer, foram os mais acometidos pelo GLC. Não houve predisposição sexual, sendo a maior ocorrência, em animais de meia idade.
- As lesões caracterizaram-se principalmente como nódulos firmes e múltiplos, ulcerados ou não, localizados, sobretudo, em pavilhões auriculares. Os animais acometidos não apresentaram alterações da saúde sistêmica e o prognóstico da doença foi favorável.
- Histopatologicamente, o GLC caracterizou-se por dermatite nodular ou difusa granulomatosa ou piogranulomatosa, com ou sem necrose, acometendo a derme e o tecido subcutâneo e fazendo parte dos diagnósticos diferenciais das lesões granulomatosas em cães.
- Os BAAR ocorreram em quantidades e morfologias distintas. Não foi verificada associação significativa entre a quantidade de bacilos com o padrão histopatológico, com celularidade predominante do infiltrado inflamatório, com a necrose ou com a quantidade de células gigantes.
- Em função dos achados anatomo clínicos, sugere-se que o termo mais apropriado para a doença seja granuloma micobacteriano cutâneo canino.
- O *Mycobacterium murphy* foi a espécie de micobactéria identificada na maioria dos casos, à semelhança do que foi observado em dois estudos prévios. Entretanto, outras espécies, não descritas na literatura, também ocorreram.

6. REFERÊNCIAS

- 1- ACKERMAN, A.B.; CHONGCHITNANT, N.;SANCHEZ, J.; GUO, Y.; BENNIN, B.; REICHEL, M.; RANDALL, M.B. **Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases – An algorithmic method based on pattern analysis.** 2nd ed. Baltimore: Williams Wilkins, 1997. 944 p.
- 2- ALLMETSAT – Weather reports and forecasts, satellite images, tropical cyclones, world climate data. Available at: <http://pt.allmetsat.com/clima>. Accessed Jan 20, 2009.
- 3- BRYDEN, S.L.; BURROWS, A.K.; O’HARA, A.J. *Mycobacterium goodii* infection in a dog with concurrent hyperadrenocorticism. **Veterinary Dermatology**, v.15, p.331-338, 2004.
- 4- CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.69, p.330-339, 2007.
- 5- CHARLES, J.; MARTIN, P.; WIGNEY, D.I.; MALIK, R.; LOVE, D.N. Cytology and histopathology of canine leproid granuloma syndrome. **Australian Veterinary Journal**, v.77, p.799–803, 1999.
- 6- COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. R. **Robbins Pathologic basis of disease.** 6 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999. p.50-88.

- 7- CORNEGLIANI, L.; FONDEVILA, D.; VERCELLI, A.; MANTERO, G.; FONDATI, A. PCR technique detection of *Leishmania* spp. but not *Mycobacterium*spp. in canine cutaneous 'sterile' pyogranuloma/ granuloma syndrome . **Veterinary Dermatology**, v.16, p.233-238, 2005.
- 8- FLEURY, R.N. Critérios para o emprego da classificação de Ridley e Jopling na rotina dos laboratórios de anatomia patológica (Primeira parte). **Educação Continuada em Hanseníase**, v.30, n.2, 2005.
- 9- FLEURY, R.N. Critérios para o emprego da classificação de Ridley e Jopling na rotina dos laboratórios de anatomia patológica (Segunda parte). **Educação Continuada em Hanseníase**, v.31, n.1, 2006.
- 10- FOLEY, J.E.; BORJESSON, D.; GROSS, T.L.; RAND, M.; NEEDHAM, M.; POLAND, A. Clinical, microscopic and molecular aspects of canine leproid granuloma in the United States. **Veterinary Pathology**, v.39, p.234-239, 2002.
- 11- FYFE, J.A.; MCCOWAN, C.; O'BRIEN, C.R.; GLOBAN, M.; BIRCH, C.; REVILL, P.; BARRS, V.R.D.; WAYNE, J.; HUGHES, M.S.; HOLLOWAY, S.; MALIK, R. Molecular characterization of a novel fastidious mycobacterium causing lepromatous lesions of the skin, subcutis, cornea, and conjunctiva of cats living in Victoria, Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.2, p.618-626, 2008.
- 12- GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 932p.

- 13- HUGHES, M.S.; JAMES, G.; BALL, N.; SCALLY, M.; MALIK, R.; WIGNEY, D.I.; MARTIN, P.; CHEN, S.; MITCHELL, D.; LOVE, D.N. Identification by 16S rRNA gene analyses of a potential novel mycobacterial species as an etiological agent of canine leproid granuloma syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.3. p.953-959, 2000.
- 14- LARSSON, C.; MICHALANY, N.; PINHEIRO, S.R.; LEDON, A.L.B.P.; VASCONCELLOS, S.A. Mycobacteriosis in domestic dogs. Report of two cases in São Paulo. **Revista Fac Medicina Veterinária Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.31, p.35-41, 1994.
- 15- LEMARIE, S.L. Mycobacterial dermatitis. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.29, n.6, p.1291-1301, 1999.
- 16- LUCAS, S. Bacterial diseases. In: ELDER, D.; ELENITSAS, R; JAWORSKY, C.; JOHNSON Jr., B. **Lever's Histopathology of the Skin**. 8th Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p. 477-488.
- 17- MALIK, R. Mycobacterial diseases affecting the skin or subcutis of cats and dogs. **Veterinary Dermatology**, v.15, suppl.1, p.16, 2004.
- 18- MALIK, R.; HUGHES, M. S.; MARTIN, P; WIGNEY, D. Canine leproid granuloma syndrome (Canine leprosy). In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. St Louis: Saunders Elsevier. 3 ed. 2006. p.480-482.
- 19- MALIK, R.; LOVE, D. N.; WIGNEY, D. I.; MARTIN, P. Mycobacterial nodular granulomas affecting the subcutis and skin of dogs (canine leproid

- granuloma syndrome). **Australian Veterinary Journal**. v.76, n.6, p.403–407, 1998.
- 20-MALIK, R.; MARTIN, P.; WIGNEY, D.; SWAN, D.; SATTTLER, P.S.; CIBILIC, D.; ALLEN, J.; MITCHELL, D.H.; CHEN, S.C.A.; HUGHES, M.S.; LOVE, D.N. Treatment of canine leproid granuloma syndrome: preliminary findings in seven dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n.1, p.30-36, 2001.
- 21-MUNDELL, A.C. Mycobacterial skin diseases in small animals. In: BONAGURA, J.D.; KIRK, R.W. **Kirk's Current Veterinary Therapy XII**. Part A. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p. 622-625.
- 22-NEVES, R.G.; GUILHON, R.M.P. Hanseníase. In: DIÓGENES, M.J.N.; GUILHON, R.M.P.; GONÇALVES, H.S.; NEVES, R.G. **Atlas de Dermatopatologia Tropical**. Fortaleza: Inova, 1997. p.13-51.
- 23-PANICH, R.; SCOTT, D.W.; MILLER, W.H. Canine cutaneous sterile pyogranuloma/ granuloma syndrome: a retrospective analysis of 29 cases (1976 to 1988). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.27, p. 519-528, 1991.
- 24-R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- 25-RIDLEY, D.S.; JOB, C.K. The pathology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**. 1 ed. New York: Churchill – Livingstone, 1985. p. 100-133.

- 26-RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. A classification of leprosy for research purposes. **Leprosy Review**, v.33, p.119-128, 1962.
- 27-RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy**, v.34, n.3, p.255-273, 1966.
- 28- RINGLER, D.J. Inflamação e Reparo. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2000. p.119-165.
- 29-SANTORO, D.; PRISCO, M.; CIARAMELLA, P. Cutaneous sterile granulomas/ pyogranulomas, leishmaniasis and mycobacterial infections. **Journal of Small Animal Practice**, v.49, nov., p.552-561, 2008.
- 30-SAS INSTITUTE/ **Users guide**, version 9, Cary, 2006. 501p.
- 31-SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Small Animal Dermatology**. 6 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. 1528 p.
- 32-SMITH, R.I.E. Canine skin tuberculosis. *Rhod. Veterinary Journal*, v.3, p.63-64, 1973
- 33- THRUSFIELD, M.V. **Veterinary Epidemiology**. 3 ed. Blackwell, 2007. 610 p.

34- TWOMEY, L.N.; WUERZ, J.A.; ALLEMAN, A.R. A “down under” lesion on the muzzle of a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p.161-163, 2005.

7. ANEXO

1) Avaliação estatística da associação entre padrão histopatológico e quantidade de bacilos nas lesões GLC:

Table of Arranjo by Bacilos

Arranjo	Bacilos	Frequency,	Percent ,	Row Pct ,	Col Pct ,+ ,++ ,+++ , Total
<i>ffffffffffffffffffffffffffffffff</i>					
DIFUSO	5, 8, 6, 19	14.29, 22.86, 17.14, 54.29	26.32, 42.11, 31.58, 45.45, 53.33, 66.67,		
<i>ffffffffffffffffffffffffffffffff</i>					
MULTINOD	6, 7, 3, 16	17.14, 20.00, 8.57, 45.71	37.50, 43.75, 18.75, 54.55, 46.67, 33.33,		
<i>ffffffffffffffffffffffffffffffff</i>					
Total	11 15 9 35	31.43 42.86 25.71 100.00			

Statistics for Table of Arranjo by Bacilos

Statistic	DF	Value	Prob
<i>ffffffffffffffffffffffffffffffff</i>			
Chi-Square	2	0.9071	0.6354
Likelihood Ratio Chi-Square	2	0.9197	0.6314
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.8563	0.3548
Phi Coefficient		0.1610	
Contingency Coefficient		0.1589	
Cramer's V		0.1610	

WARNING: 33% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.
The FREQ Procedure

Statistics for Table of Arranjo by Bacilos

Fisher's Exact Test

ffffffffffffffffffffffffffffffff

Table Probability (P) 0.0615

Monte Carlo Estimate for the Exact Test

Pr <= P 0.6280

99% Lower Conf Limit 0.6155

99% Upper Conf Limit 0.6405

Number of Samples 10000

Initial Seed 74076

Sample Size = 35

2) Avaliação estatística da associação entre infiltrado inflamatório predominante e quantidade de bacilos verificados nas lesões de GLC:

Table of Infiltrado by Bacilos

Infiltrado	Bacilos			Total
Frequency	5	8	5	18
Percent	27.78	44.44	27.78	100.00
Row Pct	45.45	53.33	50.00	
Col Pct	13.89	22.22	13.89	50.00
GRANULOM				
Frequency	6	7	5	18
Percent	33.33	38.89	27.78	100.00
Row Pct	54.55	46.67	50.00	
Col Pct	16.67	19.44	13.89	50.00
PIOGRANU				
Frequency	11	15	10	36
Percent	30.56	41.67	27.78	100.00
Row Pct				
Col Pct				

Statistics for Table of Infiltrado by Bacilos

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	2	0.1576	0.9242
Likelihood Ratio Chi-Square	2	0.1578	0.9242
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.0464	0.8295
Phi Coefficient		0.0662	
Contingency Coefficient		0.0660	
Cramer's V		0.0662	

Fisher's Exact Test

Table Probability (P)	0.0826
-----------------------	--------

Monte Carlo Estimate for the Exact Test

Pr <= P	1.0000
99% Lower Conf Limit	0.9995
99% Upper Conf Limit	1.0000
Number of Samples	10000
Initial Seed	74076

Sample Size = 36

3) Avaliação estatística da associação entre quantidade de células gigantes e quantidade de bacilos visualizados nas lesões de GLC:

Table of CelGigante by Bacilos

CelGigante	Bacilos	Frequency	Percent	Row Pct	Col Pct	Total
+++	2	2	4	8	5.56	5.56
+++	2	2	4	8	5.56	5.56
+++	4	4	8	11.11	11.11	22.22
+++	8	8	16	22.22	22.22	44.44
++c	2	7	4	13	5.56	19.44
++c	7	4	13	11.11	36.11	47.22
++c	4	4	8	11.11	11.11	22.22
++c	13	13	26	36.11	36.11	72.22
AUSENTE	7	6	2	15	19.44	16.67
AUSENTE	6	2	15	16.67	5.56	41.67
AUSENTE	2	2	4	5.56	5.56	11.11
AUSENTE	15	15	30	41.67	41.67	83.33
Total	11	15	10	36	30.56	41.67
Total	15	10	36	27.78	100.00	36

Statistics for Table of CelGigante by Bacilos

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	4	5.9312	0.2043
Likelihood Ratio Chi-Square	4	6.0229	0.1974
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	3.5720	0.0588
Phi Coefficient		0.4059	
Contingency Coefficient		0.3761	
Cramer's V		0.2870	

WARNING: 78% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

The FREQ Procedure

Statistics for Table of CelGigante by Bacilos

Fisher's Exact Test

Table Probability (P)	9.919E-04
-----------------------	-----------

Monte Carlo Estimate for the Exact Test

Pr <= P	0.2320
99% Lower Conf Limit	0.2211
99% Upper Conf Limit	0.2429
Number of Samples	10000
Initial Seed	74076

Sample Size = 36

4) Avaliação estatística da associação entre padrão histopatológico e quantidade de células gigantes visualizadas nas lesões de GLC:

Table of padrao by cg

```

padrao  cg
Frequency,
Percent ,
Row Pct ,
Col Pct ,cg+ ,cg++ ,cga , Total
#####^#####^#####^#####^
dif    , 9, 5, 8, 22
        , 23.08, 12.82, 20.51, 56.41
        , 40.91, 22.73, 36.36,
        , 64.29, 62.50, 47.06,
#####^#####^#####^#####^
multi  , 5, 3, 9, 17
        , 12.82, 7.69, 23.08, 43.59
        , 29.41, 17.65, 52.94,
        , 35.71, 37.50, 52.94,
#####^#####^#####^#####^
Total  14  8  17  39
        35.90 20.51 43.59 100.00
    
```

Statistics for Table of padrao by cg

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	2	1.0784	0.5832
Likelihood Ratio Chi-Square	2	1.0803	0.5826
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.9335	0.3340
Phi Coefficient		0.1663	
Contingency Coefficient		0.1640	
Cramer's V		0.1663	

WARNING: 33% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.
 The SAS System 03:41 Friday, January 22, 2009 2
 The FREQ Procedure

Statistics for Table of padrao by cg

```

Fisher's Exact Test
#####^#####^#####^#####^
Table Probability (P) 0.0534
    
```

Monte Carlo Estimate for the Exact Test

Pr <= P	0.6471
99% Lower Conf Limit	0.6348
99% Upper Conf Limit	0.6594

Number of Samples 10000
 Initial Seed 13554
 Sample Size = 39

6) Risco relativo das raças acometidas com GLC:

RAÇAS	Número de cães	Percentual (%)	Risco Relativo	p
Boxer	19	50	15,945	<0,0001
Rotweiller	4	10.52632	3,788	0,0111
SRD	4	10.52632	0,7310	0,5525
Labrador	3	7.894737	1,7516	0,3495
Teckel	2	5.263158	1,369	0,664
Terrier Brasileiro	1	2.631579	2,7658	0,3121
Dogue de Bordeaux	1	2.631579	20,081	0,0018
Fila Brasileiro	1	2.631579	4,0767	0,1613
Griffon de Bruxes	1	2.631579	-	-
Weimaraner	1	2.631579	2,93	0,2853
Pit Bull	1	2.631579	1,1991	0,8574

7) Percentual e Intervalos de confiança na avaliação estatística de localização anatômica das lesões do GLC:

LOCALIZAÇÃO	Número de cães	Percentual (%)	Limite Inferior	Limite Superior
Pavilhão auricular	28	77.77778	0.6041406	0.8927469
Pavilhão auricular e cabeça	2	5.555556	0.009681305	0.200143968
Pavilhão auricular e membro	1	2.777778	0.001451713	0.162035772
Pavilhão auricular e focinho	1	2.777778	0.001451713	0.162035772
Pavilhão auricular, focinho e face	1	2.777778	0.001451713	0.162035772
Membro pélvico	1	2.777778	0.001451713	0.162035772
Ponte nasal	1	2.777778	0.001451713	0.162035772
Pavilhão auricular, cabeça e membro pélvico	1	2.777778	0.001451713	0.162035772

8) Percentual e Intervalos de confiança na avaliação estatística de tipo de pelagem dos cães acometidos com GLC:

PELAGEM	Número de cães	Percentual (%)	Limite Inferior	Limite Superior
Curta	28	77.77778	0.6041406	0.8927469
Média	7	19.44444	0.08800966	0.36565772
Longa	1	2.77778	0.001451713	0.162035772

9) Percentual e Intervalos de confiança na avaliação estatística do porte dos cães acometidos com GLC:

PORTE	Número de cães	Percentual (%)	Limite Inferior	Limite Superior
Pequeno	4	11.11111	0.03620337	0.27002900
Médio	2	5.55556	0.009681305	0.200143968
Grande	30	83.33333	0.6652978	0.9303666

10) Percentual e Intervalos de confiança na avaliação estatística da quantidade de lesões dos cães acometidos com GLC:

LOCAL	Número de cães	Percentual (%)	Limite Inferior	Limite Superior
Única	3	9.375	0.02452973	0.26166554
Múltiplas	29	90.625	0.7383345	0.9754703

12) Percentual e Intervalos de confiança na avaliação estatística da distribuição de casos de GLC nos meses do ano de acordo com a temperatura no Brasil:

LOCAL	Número de cães	Percentual (%)	Limite Inferior	Limite Superior
Meses temperaturas mais altas (setembro a março)	17	65.38462	0.4436496	0.8205687
Meses temperaturas mais baixas (abril a agosto)	9	34.61538	0.1794313	0.5563504

13) Sequenciamento genético das amostras de GLC amplificadas pela PCR:

- **PV 224187**

ACGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAT
 GACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTGCAGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTA
 TCAGCTTGTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
 ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGT
 TGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGC
 CAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCG

- **PV 143453**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATG
 ACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTGCAGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
 CAGCTTGTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
 TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
 TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
 GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAG

- **PV 229037**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATG
 ACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTGCAGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
 CAGCTTGTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
 TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
 TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
 GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAG

- **PV 153353-0**

ACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATAC
ACCTCGCTGGCCGCATGGTCTGGTGGGGAAAGCTTTTGCAGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCC
TATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGG
GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCCCTTTCAGCACAGACGAAGCGCGAGTGACGGTATGTGCAGAAGAAGGACCG
GCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC

- **PV 24646**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATG
ACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTGCAGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTGGTGGGGTGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **PV 41284**

AGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAA
GCTTTTGCAGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGATGGCCTACCA
AGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
GACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGC
AAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGGTGCGA

- **PV 256223-1**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATG
ACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTGCAGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTGGTGGGGTGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **PV 68327**

GGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTG
CGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGATGGCCTACCAAGGCGAC
GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCC
CGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGAC
GGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT

- **PV 250472**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATG
ACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **PV 48239**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATG
ACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **PV 256223-3**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATG
ACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **PV 69127**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATG
ACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **PV 51075**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATG
ACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT

GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **PV 223797**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATACA
CCCTGCTGGTCGCATGGCCTGGTGGGGGAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCT
ATCAGCTTGTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGG
TGCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
TTGTAAACCTCTTTCAGCCGACGAAGCGTGAGTGACGGTAGGCCGTAGAAGAAGCACCGG
CCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **PV 61690**

ACGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAT
GACCACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTA
TCAGCTTGTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
GTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGT
TGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGC
CAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCG

- **PV 59694**

TGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAC
CACGAAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCA
GCTTGTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGT
CGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT
AAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **NH166/05**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGG
ACCGCATGCTGCATGGTGTGTGGTGCAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
ACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTACAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **NH 36/04**

TGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAC
CACGGACCTTCATGGCGTTGTGGTGGAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
ACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATA

TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTACCAGGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGC
CAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **NH 166 /05 07**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGG
ACCGCATGCTGCATGGTGTGTGGTGCAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
ACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTTCAGTAGGGACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTACAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **NH38/0602**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGG
ACTACGCGATGCATGTCGTGTGGTGGAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTTCATAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTAGAGAAGAAGCACCGGCCA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

- **NH 166/05 06**

CGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGG
ACCGCATGCTGCATGGTGTGTGGTGCAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
ACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTTCAGTAGGGACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTACAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA

14) Quadro: Concentrações e purezas do DNA dos fragmentos cutâneos de GLC:

Amostras de GLC	Pureza	Concentração DNA (ng/μL)
PV 224187	1,71	639,2
PV 143458	2,04	103,4
PV 229037	2,03	387,6
PV 153353-O	1,84	162,4
PV 24646	2,08	102,1
PV 48520	1,98	89,2
PV 41284	1,99	98,4
PV 256223-1	2,08	48,3
PV 68327	2,06	128,4
PV 250472	2,01	131,1
PV 48239	1,98	89,4
PV 256223-3	1,99	154,3
PV 69127	1,76	104,5
PV 51075	1,97	92,7
PV 223797	2,07	242,1
PV 61690	1,98	159,6
PV 62874	1,84	10,6
PV 59694	1,95	86,7
PV 276312	1,86	35,0
NH 166/05	1,82	81,1
NH 36/04	1,70	54,8
PV 70318	1,67	89,5
NH 166/05 07	1,84	55,5
NH 38/06 02	1,66	38,4
NH 166/05 06	1,76	34,4