CLAUDIO NAZARETIAN ROSSI

Avaliação da imunidade celular na pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e sua correlação com transmissibilidade ao vetor

SÃO PAULO

2013

CLAUDIO NAZARETIAN ROSSI

Avaliação da imunidade celular na pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e sua correlação com transmissibilidade ao vetor

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2830
FMVZ

Rossi, Claudio Nazaretian

Avaliação da imunidade celular na pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e sua correlação com transmissibilidade ao vetor / Claudio Nazaretian Rossi. -- 2013.

89 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Pele. 3. Xenodiagnóstico. 4. Imunidade celular. 5. Histopatologia. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da imunidade celular na pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com transmissibilidade ao vetor", protocolado sob o nº 2649/2012, utilizando 40 (quarenta) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/6/2012.

We certify that the Research "Evaluation of cellular immunity in the skin of naturally infected dogs with *Leishmania (L.) chagasi* and its relationship with the vector transmissibility", protocol number 2649/2012, utilizing 40 (forty) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 6/20/2012.

São Paulo, 21 de junho de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ROSSI, Claudio Nazaretian

Título: Avaliação da imunidade celular na pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e sua correlação com transmissibilidade ao vetor

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho...

Aos meus pais, Lucia e Roberto,

Pelas demonstrações de amor, caráter e honestidade, pela educação e estrutura familiar proporcionada, além do incentivo e compreensão que me permitiram chegar até aqui. O empenho e exemplo de vida de vocês foram de fundamental importância para eu concluir mais essa etapa. Meu muito obrigado.

Amo vocês!

À minha esposa Manuela,

Pelo amor, apoio, incentivo e confiança depositados em mim ao longo desses anos e que muito me estimularam a seguir em frente e me possibilitaram alcançar mais esse objetivo de vida. Agradeço-a por tudo.

Eu te amo!

Aos meus irmãos Frederico, Danilo e Eduardo, às minhas cunhadas Eliane, Michele e Fabiana, aos meus sobrinhos Fernanda, Rhuan e Júlia, e às queridas Kátia e Dinah,

Pelo carinho, apoio e paciência demonstrados durante essa longa jornada. Ser parte da família de vocês é uma dádiva para mim e que, somando-se à nossa amizade, torna-se de imensurável importância. Agradeço a todos vocês.

Com amor!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson,

Meu orientador, Professor Titular do Departamento de Clínica Médica (VCM) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), exemplo de ética, honestidade, caráter e profissionalismo, inicialmente por me aceitar como orientado e, além disso, pela dedicação, incentivo, pelos valiosos ensinamentos transmitidos, pela oportunidade de aprendizado proporcionada junto ao atendimento da rotina do Serviço de Dermatologia do Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ-USP e, principalmente, pelas demonstrações de amizade e confiança em todos os momentos. Saio com a consciência tranquila de que, se não consegui, pelo menos tentei assimilar o máximo que pude dos seus conhecimentos técnicos e, o que me é mais importante e valioso, com a certeza de que aprendi muito com o seu exemplo de ser e agir. Sinceramente, a você, minha eterna gratidão e admiração.

Muito obrigado!

À Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti,

Professora Adjunto do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), pela contribuição em todas as etapas desse Projeto, além dos conhecimentos transmitidos, apoio, amizade, incentivo e confiança demonstrada, bem como pela aprazível convivência durante todo esse período e por ter cedido as dependências do Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50) da FM-USP para o processamento de todas as amostras. Sem a sua valorosa contribuição esse trabalho não seria possível.

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre me protegendo e guiando meus passos e por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, Lucia e Roberto, pelo carinho, incentivo e por compreenderem essa minha escolha profissional.

À minha esposa Manuela, pelo amor, apoio e incentivo durante essa longa jornada das nossas vidas.

Aos meus irmãos Frederico, Danilo e Eduardo, às minhas cunhadas Eliane, Fabiana e Michele, aos meus sobrinhos Fernanda, Rhuan e Júlia, e às familiares Kátia e Dinah que, mesmo de longe, demonstraram seu companheirismo e sempre me apoiaram.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, novamente e outras tantas vezes e que, tenho certeza, não serão suficientes para agradecê-lo por tudo.

À Pós-Graduação da FMVZ-USP, pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Doutorado em Clínica Veterinária.

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária do VCM da FMVZ-USP, não só por me permitir ingressar no mesmo, mas, também, pela calorosa acolhida e agradável convivência durante todo esse tempo.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Laboratório LIM-50 do Departamento de Patologia da FM-USP, por permitir processar todas as amostras em sua estrutura física e por disponibilizar técnicos qualificados para auxiliar na execução das mesmas.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Araçatuba (FMVA-UNESP), por permitir a realização de toda a fase de colheita de amostras e execução de parte da fase experimental desse Projeto em sua estrutura física.

Ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba, pela acolhida e por autorizar a seleção dos animais utilizados na etapa experimental.

À Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, novamente e tantas outras vezes e que, certamente, não serão suficientes para agradecê-la por tudo.

À Profa. Dra. Mary Marcondes, Professora Adjunto do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal (DCCRA) da FMVA-UNESP, por contribuir na realização da parte experimental, bem como pelos conhecimentos transmitidos, apoio, amizade, incentivo e por me proporcionar conhecer e me apaixonar por esse cativante “universo acadêmico”.

Aos pesquisadores Paulo Filemon Paulocci Pimenta e Nágila Francinete Costa Secundino, do Laboratório de Entomologia do Instituto René Rachou (FIOCRUZ, Minas Gerais, Brasil), pelo auxílio na execução da parte experimental desse Projeto.

À Thaíse Yumie Tomokane, técnica do LIM-50, pela contribuição na execução de toda a parte experimental desse Projeto, pelos ensinamentos, apoio técnico, amizade, agradável convívio e por colaborar na análise estatística dos dados obtidos. A sua colaboração foi muito importante para a conclusão desse trabalho, obrigado por tudo!

Aos Professores que gentilmente aceitaram participar da Banca de Defesa do Doutorado, tanto os membros Titulares quanto os Suplentes, em especial aqueles que efetivamente participarem da Defesa e que, com toda a certeza, muito contribuirão na melhoria da qualidade técnica do conteúdo final desse trabalho.

Aos Professores que participaram da banca do Exame de Qualificação do Doutorado, os Professores Titulares Carlos Eduardo Larsson e Márcia Mery Kogika, do VCM da FMVZ-USP, e o Prof. Silvio Arruda Vasconcellos, do Departamento de Epidemiologia dessa mesma Faculdade.

Aos Professores, Residentes e Funcionários do HOVET e do VCM, pela convivência pacífica e amizade demonstrada durante todo esse tempo.

Aos Médicos Veterinários do HOVET da FMVZ-USP, pelos ensinamentos transmitidos e pelo agradável convívio, em especial aos Drs. Carlos Eduardo Larsson Júnior e Gustavo Seixas Dias, respectivamente, atual e ex Médico Veterinário lotado no Serviço de Dermatologia do HOVET-USP, também pela cooperação e amizade demonstradas.

Aos colegas “dermatólogos” Aline Santana, Msc. Ângela Velloso Yazbek, Msc. Camila Domingues de Oliveira, Júlia Só Severo, Juliana Odaguiri, Msc. Luis Eduardo B. Lucarts, Msc. Simone Maruyama, do Serviço de Dermatologia do HOVET da

FMVZ-USP pela aprazível convivência, troca de conhecimentos e pelo apoio demonstrado.

Aos demais pós-graduandos da FMVZ-USP, em especial os já anteriormente citados, além dos queridos amigos Dra. Daniela Ramos, Msc. Bruno Bertassoli, Msc. Francisco Ferreira Lima Júnior e Msc. Thiago Marcelo Oliveira pelo apoio, cumplicidade e amizade incondicional nesses anos de convivência.

Aos meus adoráveis parentes e amigos, por entenderem minhas ausências e por me apoiarem nessa importante etapa da minha vida.

Aos novos amigos que fiz no LIM-50, especialmente os pós-graduandos Ana Kely, Carol, Fábio, Fernandinha, Mariana e Marina, além dos funcionários Edson Tadeu, Lia Negrão, Thaíse Yumie Tomokane e dos Drs. Cláudia Gomes, Felipe Passero e Vânia da Matta.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da FMVZ-USP, bem como aos bibliotecários dessa Faculdade, em especial à Elza Faquim, pela contribuição na normatização da parte escrita desse trabalho.

Aos animais, que muito contribuíram na escolha dessa bonita e tão gratificante profissão, em especial aos nossos queridos e já falecidos Bóxers Blitz, Inah, Ivory, Jô e Nefthys, além do Dachshund Paul e do gato Bill. Também aos que estão atualmente conosco, os cães Barry, May, Lina Bo Bardi e Lúcio Costa.

A todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, a concluir esse trabalho.

“Simplesmente” o Cão

*De olhares profundos,
Uma alma bonita.
Caminhar imponente,
Mudou a minha vida.
De rara beleza,
Lúcida, centrada.
Que olha pedindo,
Mas sem cobrar nada.
Amar é ter medo.
Medo de perder.
E temerosa aprendo,
A amar esse Ser.
Que Ser é esse, tão puro?
É o Ser humano? Não.
Essa criatura tão ímpar,
É apenas chamada de “cão”.
Um curto substantivo,
Que denomina um gigante.
Gigante que é frágil, indefeso.
Leal e nunca distante.
Caráter e doação,
Amor e felicidade.
Criatura tão boa, de instintos tão ternos,
De alma tão grande, real amizade.
Uma coisa é cravada em meu coração,
Para poucos felizardos é fácil entender.
Se não fosse o cão, “simplesmente” o cão,
Cito Schopenhauer: “Eu não amaria viver”.*

(Manuela Guimarães Nazaretian Rossi)

RESUMO

ROSSI, C. N. **Avaliação da imunidade celular na pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e sua correlação com transmissibilidade ao vetor.** [Evaluation of cellular immunity in the skin of naturally infected dogs with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* and its relationship with the vector transmissibility]. 2013. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Foram selecionados aleatoriamente 38 cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* oriundos de Araçatuba, São Paulo, área endêmica para leishmaniose visceral, e os quais foram distribuídos em dois grupos: o primeiro com 24 cães sintomáticos e, o outro, composto por 14 animais assintomáticos. Correlacionou-se a caracterização clínica (assintomáticos ou sintomáticos) com os: potencial em infectar o inseto vetor, padrão inflamatório da pele, perfil de imunidade celular e parasitismo tegumentar desses cães. Quanto ao número de formas amastigotas/mm² no tegumento, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1584$), sendo que a densidade de parasitos na pele mostrou uma correlação positiva moderada com os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* ($p = 0,042$). Quanto à infectividade ao vetor, evidenciada pelo xenodiagnóstico, 16 (66,7%) cães sintomáticos e 13 (93%) assintomáticos foram capazes em transmitir *Leishmania* aos flebotomíneos, dentre estes, respectivamente, seis (37,5%) e oito (61,5%) animais não apresentavam parasitismo cutâneo, embora todos, de ambos os grupos, tenham sido positivos quando da pesquisa de parasitos no linfonodo poplíteo. Observou-se um maior percentual de transmissibilidade para o vetor a partir de cães assintomáticos ($p = 0,0494$). As alterações histológicas cutâneas foram similares em ambos os grupos e se caracterizaram, de modo geral, por um infiltrado inflamatório, ora focal ora difuso, na derme, constituído, principalmente, por células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), variando de discreto a intenso. Quanto à caracterização da resposta imune celular no tegumento dos animais, somente a densidade (células/mm²) de células iNOS⁺ foi significativamente maior na derme dos cães sintomáticos quando comparado aos assintomáticos ($p = 0,0368$). Observou-se correlação positiva moderada entre a densidade de parasitos na pele e a densidade de macrófagos ($p = 0,031$), de células T CD4⁺ ($p = 0,015$) e CD8⁺ ($p = 0,023$), e, também, naquela de células iNOS⁺ relativamente a de células T

CD3⁺ ($p = 0,005$), CD4⁺ ($p = 0,001$) e CD8⁺ ($p = 0,0001$). Verificou-se, ainda, correlação negativa moderada com o número de manifestações clínicas e/ou gravidade da enfermidade ($p = 0,028$), confirmando, assim, maior transmissibilidade de parasitos ao vetor, a partir de animais assintomáticos, demonstrando-se, dessa forma, que tais cães são fontes de infecção em potencial para insetos vetores em áreas endêmicas para leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina. Pele. Xenodiagnóstico. Imunidade celular. Histopatologia.

ABSTRACT

ROSSI, C. N. **Evaluation of cellular immunity in the skin of naturally infected dogs with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* and its relationship with the vector transmissibility.** [Avaliação da imunidade celular na pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e sua correlação com transmissibilidade ao vetor]. 2013. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Thirty-eight dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* were randomly selected from Araçatuba of São Paulo state (Brazil), an endemic area for visceral leishmaniasis. The subjects were distributed into two groups: the first comprising 24 symptomatic dogs and the second consisting of 14 asymptomatic dogs. Possible correlations of clinical characterization (in both symptomatic and asymptomatic subjects) with potential to infect the insect vector, skin inflammatory pattern, cutaneous cellular immunity profile and cutaneous parasitism were investigated. Regarding to the number of cutaneous leishmania amastigotes/mm², there was not a significant difference between the groups ($p = 0.1584$); density of skin parasites showed a moderate positive correlation with anti-*Leishmania* antibody titers ($p = 0.042$). Concerning to the infectivity to the insect vector, as evidenced by xenodiagnosis, 16 (66.7%) symptomatic and 13 (93%) asymptomatic dogs were able to transmit *Leishmania* to phlebotomines. Among these, six (37.5%) and eight (61.5%) dogs, respectively, did not show cutaneous parasitism, although all participant dogs were found positive when searching for parasites in the popliteal lymph nodes. Asymptomatic dogs showed higher transmissibility to the vector than symptomatic ones ($p = 0.0494$). Histological features in the skin were similar in both groups and were generally characterized by an inflammatory infiltrate, either diffuse or focal, in the dermis, mainly consisted of mononuclear cells (macrophages, lymphocytes and plasma cells), varying from mild to intense. Concerning characterization of the cutaneous cellular immune response, only iNOS⁺ cells density (cells/mm²) was significantly higher in the dermis of the symptomatic dogs compared to the asymptomatic ones ($p = 0.0368$). Moderate positive correlation between the cutaneous parasites density and the macrophages density ($p = 0.031$), the CD4⁺ T cells ($p = 0.015$) and CD8⁺ T cells ($p = 0.023$) were observed. Furthermore, density of iNOS⁺ cells in relation to CD3⁺ T cells ($p = 0.005$), CD4⁺ T cells ($p = 0.001$) and CD8⁺

T cells ($p = 0.0001$) were found positively correlated at a moderate level. It was also found a moderate negative correlation between cutaneous parasites density and the number of clinical signs and/or disease severity ($p = 0.028$), confirming greater parasites transmission to the vector from asymptomatic animals. It was therefore demonstrated that these dogs are potential sources of infection to insect vectors in endemic areas for canine visceral leishmaniasis.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis. Skin. Xenodiagnosis. Cellular Immunity. Histopathology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cães com leishmaniose visceral sintomáticos provenientes de Araçatuba (SP), demonstrando: (A) - alopecia lombossacral, pele ceratótica, liquenificada, melanodérmica e escamo-crostosa com presença de escamas micáceas e pitiriásicas; (B) - discreta mioatrofia temporal, além de alopecia em ponte nasal, periorbitária e de pavilhão auricular, encimada por escamas asbestiformes branquicentas; (C) - alopecia lombossacral em placa com lesão erodo-crostosa central e presença de crostas melicéricas; (D) - alopecia e edema podal, lesões erododescamativas, bem como onicogribose 49
- Figura 2 - Gráfico em *dot plot* e em *box plot* mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, de anticorpos anti-*Leishmania* (DO) detectados pela técnica de ELISA no soro de cães assintomáticos ou sintomáticos com leishmaniose visceral oriundos do município de Araçatuba (SP) 50
- Figura 3 - Micrografia demonstrativa da presença em linfonodos poplíteos de formas amastigotas (setas) em esfregaço de punção aspirativa corado por coloração tipo-Romanovsky (A) e em corte histológico submetido à técnica de imunoistoquímica (B) de cães com leishmaniose visceral oriundos do município de Araçatuba (SP) 51
- Figura 4 - Micrografia demonstrativa da presença de parasitos (setas) detectados pela técnica de imunoistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomático (A) ou sintomático (B), oriundos do município de Araçatuba (SP) 51
- Figura 5 - Gráfico em *dot plot* e em *box plot* mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, de formas amastigotas detectadas pela técnica de imunoistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, oriundos do município de Araçatuba (SP) 52
- Figura 6 - Micrografia demonstrativa do padrão inflamatório observado por avaliação histológica (HE) da pele de cães com leishmaniose visceral oriundos do município de Araçatuba (SP): (A) Infiltrado inflamatório mononuclear perianexial na derme; (B) Infiltrado inflamatório dérmico formado por macrófagos, linfócitos e plasmócitos; (C) Formas sugestivas de amastigotas de *Leishmania* em meio ao infiltrado inflamatório mononuclear (seta); (D) Formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos na derme superficial (seta) 55
- Figura 7 - Micrografia demonstrativa da presença de macrófagos (setas) detectados pela técnica de imunoistoquímica na pele de cão assintomático (A) ou sintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP) 56

Figura 8 - Gráfico em <i>dot plot</i> e em <i>box plot</i> mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, da contagem de macrófagos detectados pela técnica de imunoistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, oriundos do município de Araçatuba (SP).....	56
Figura 9 - Micrografia demonstrativa da presença de células marcadas pelo anti-CD3 (setas) detectado pela técnica de imunoistoquímica na pele de cão assintomático (A) ou sintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP).....	57
Figura 10 - Gráfico em <i>dot plot</i> e em <i>box plot</i> mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, da contagem de células marcadas pelo anti-CD3 detectado pela técnica de imunoistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, oriundos do município de Araçatuba (SP)	57
Figura 11 - Micrografia demonstrativa da presença de células marcadas pelo anti-CD4 (setas) detectado pela técnica de imunoistoquímica na pele de cão assintomático (A) ou sintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP).....	58
Figura 12 - Gráfico em <i>dot plot</i> e em <i>box plot</i> mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, da contagem de células marcadas pelo anti-CD4 detectado pela técnica de imunoistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, oriundos do município de Araçatuba (SP)	58
Figura 13 - Micrografia demonstrativa da presença de células marcadas pelo anti-CD8 (setas) detectado pela técnica de imunoistoquímica na pele de cão assintomático (A) ou sintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP).....	59
Figura 14 - Gráfico em <i>dot plot</i> e em <i>box plot</i> mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, da contagem do marcador CD8 ⁺ detectado pela técnica de imunoistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, oriundos do município de Araçatuba (SP).....	59
Figura 15 - Micrografia demonstrativa da presença de células marcadas pelo anti-iNOS (setas) detectado pela técnica de imunoistoquímica na pele de cão assintomático (A) ou sintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP).....	60
Figura 16 - Gráfico em <i>dot plot</i> e em <i>box plot</i> mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, da contagem de células marcadas pelo anti-iNOS detectado pela técnica de imunoistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, oriundos do município de Araçatuba (SP)	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência (número e percentagem) de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, segundo o sexo e a faixa etária (meses), originários do município de Araçatuba (SP) - São Paulo - 2013.....	48
Tabela 2 - Frequência (número e percentagem) de vetores da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i> examinados e infectados de acordo com a avaliação pela técnica de xenodiagnóstico realizada em cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, provindos do município de Araçatuba (SP) - São Paulo - 2013.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório e do parasitismo tegumentar de cães assintomáticos (n = 9) ou sintomáticos (n = 18), portadores de lesões microscópicas cutâneas decorrentes de leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP) - São Paulo - 2013.....	54
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

DO - Densidade óptica

DPP - Teste imunocromatográfico rápido

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbant assay*

FM-USP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FMVA-UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista

FMVZ-USP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde

HE - Hematoxilina-eosina

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

ICQ - Imunocitoquímica

IDR - Intradermorreação, teste intradérmico de Montenegro

IFN- γ - Interferon gama

IHQ - Imunoistoquímica

IL-2 - Interleucina-2

IL-4 - Interleucina-4

IL-5 - Interleucina-5

IL-10 - Interleucina-10

IL-12 - Interleucina-12

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

LIM-50 - Laboratório de Investigações Médicas

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

LVH - Leishmaniose visceral humana

MHC-classe II - Complexo principal de histocompatibilidade de classe II

NNN - Novy-MacNeal-Nicolle

NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação em cadeia de polimerase

rhIFN- γ - Interferon gama recombinante humano

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute* - 1640

Tc1 - Linfócitos T citotóxicos do tipo 1

Tc2 - Linfócitos T citotóxicos do tipo 2

TGF- β - Fator de crescimento tumoral beta

Th-1 - Imunidade celular

Th-2 - Imunidade humoral

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

XDG - Xenodiagnóstico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1	LEISHMANIOSES	26
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO.....	26
2.3	LEISHMANIOSE VISCERAL	27
2.3.1	Epidemiologia	27
2.3.2	Reservatório doméstico	28
2.3.3	Transmissão.....	29
2.3.4	Patogenia.....	29
2.3.5	Manifestações clínicas no cão	32
2.3.6	Diagnóstico	33
2.3.7	Importância da pele na leishmaniose visceral	36

Capítulo 1 – AVALIAÇÃO DO PADRÃO INFLAMATÓRIO E DA IMUNIDADE CELULAR NA PELE DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* E SUA CORRELAÇÃO COM TRANSMISSIBILIDADE AO VETOR

3	INTRODUÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS	42
4.2	DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL	43
4.3	XENODIAGNÓSTICO.....	43
4.4	PESQUISA DE DNA DE <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> POR PCR	44
4.5	EXAME HISTOLÓGICO DO PADRÃO INFLAMATÓRIO DA PELE	45
4.6	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA PELE	45
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5	RESULTADOS	48
5.1	DIAGNÓSTICO CLÍNICO, PARASITOLÓGICO E SOROLÓGICO	48
5.2	XENODIAGNÓSTICO.....	52
5.3	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PADRÃO INFLAMATÓRIO DA PELE.....	53
5.4	AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR DA PELE	55
5.5	ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS.....	61

6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é zoonose causada por protozoário do gênero *Leishmania* que, de acordo com a espécie do agente envolvido, divide-se em dois grandes grupos de leishmanioses: a tegumentar e a visceral. No Brasil, ambas ocorrem e, muitas vezes, estão presentes em um mesmo município, sendo que, na cidade de Araçatuba, região noroeste do estado de São Paulo e local de obtenção das amostras utilizadas no presente estudo, somente a forma visceral da doença é endêmica, cujo agente etiológico é a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.

No que concerne ao ciclo epidemiológico da LV, cientificamente considera-se que é por meio de inseto vetor a forma mais importante de transmissão da enfermidade a hospedeiros vertebrados. No Brasil, o flebotomíneo hematófago *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie envolvida na disseminação. Embora seja descrita como uma doença rural, típica de ambientes silvestres, atualmente se sabe que ela pode ser igualmente contraída em zonas suburbanas e urbanas, tendo sido notificados casos autóctones, humanos e/ou caninos, até o momento, em 23 Unidades Federativas. Epidemiologicamente, por apresentar uma maior quantidade de parasitos na pele relativamente ao humano infectado, o cão é considerado o reservatório mais importante da leishmaniose em áreas endêmicas urbanizadas e, também em função disso, uma das estratégias indicadas pela FUNASA para o controle da LV no País consiste na eliminação do cão doméstico soropositivo, assintomático ou sintomático, sendo tal medida considerada bastante controversa e baldada.

Clinicamente, a leishmaniose visceral canina pode causar um quadro sistêmico crônico, com cortejo mórbido inespecífico e, em geral, similar às manifestações clínicas em humanos. A ocorrência de sintomas e a sua gravidade é diretamente dependente da imunidade do hospedeiro infectado. De modo geral, cães ditos “resistentes” por não desenvolver a doença, os denominados “assintomáticos” ou, também, aqueles que ostentam manifestações clínicas mais “brandas” e, muitas vezes, consideradas “inespecíficas” para a enfermidade, apresentam, de grosso modo, uma imunidade celular relativamente eficaz, normalmente funcionando como “reservatórios” do parasito. Por outro lado, aqueles

reputados como “suscetíveis” e que apresentam alterações clínicas aparentes e/ou passíveis de comprovação laboratorial, designados de “sintomáticos”, geralmente desenvolvem uma imunidade celular não protetora e, ao mesmo tempo, uma exacerbada imunidade humoral.

Referente especificamente à caracterização imunopatológica da pele de cães acometidos pela LV, trata-se de ponto deveras importante a ser avaliado, uma vez que é, geralmente, no seu tegumento que ocorre a inoculação do parasito, sendo, portanto, tal análise reputada como importante para aclarar não somente o tipo de resposta imune local, mas, também, permitir que se conjecture sobre aquela sistêmica gerada no indivíduo parasitado. Ainda, há que se considerar que o estudo do parasitismo da pele do cão infectado seja, igualmente, fundamental, na medida em que pressupostamente corresponde à principal fonte de infecção do inseto vetor no meio urbano. No que tange especificamente às características imunopatológicas da pele de cães infectados considerados sintomáticos, comparativamente àqueles nominados assintomáticos, a bibliografia existente ainda é muito escassa e, portanto, pouco elucidativa no atinente ao assunto, embora alguns poucos estudos tenham demonstrado poder haver certa relação entre a sintomatologia clínica e o aspecto histológico cutâneo. Além disso, há divergência de informações concernentes ao grau de infectividade do inseto vetor comparativamente a partir de animais sintomáticos ou assintomáticos.

Em face ao retro exposto, é que o presente estudo foi delineado, tendo por fulcro os seguintes objetivos: analisar as alterações histológicas e quantificar a carga parasitária em pele biopsiada de cães, assintomáticos ou sintomáticos, naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi* oriundos do município de Araçatuba, São Paulo, área endêmica para a enfermidade; avaliar a resposta imune celular no mesmo material, por meio da técnica de imunistoquímica; verificar o potencial desses animais em infectarem o inseto vetor, por meio da técnica de xenodiagnóstico, e correlacionar com o perfil de imunidade celular evidenciado e com o parasitismo tegumentar desses cães, de acordo com a caracterização clínica (assintomáticos ou sintomáticos).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antroponoses de distribuição mundial, de evolução insidiosa, de caráter crônico, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que inclui várias espécies, e que eliciam manifestações tanto viscerais como tegumentares. São, classicamente, subdivididas em duas formas, segundo o agente envolvido: a leishmaniose tegumentar, que apresenta manifestações cutâneas (localizada ou difusa), em mucosas e/ou zonas mucocutâneas, e a leishmaniose visceral, com alterações sistêmicas e/ou tegumentares (RIBEIRO, 1997; MICHALSKY et al., 2002; SILVEIRA et al., 2009). Quando não tratada, a LV constitui a forma mais grave e fatal (WHO, 2010) da protozoose.

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente trata-se de protozoário pleomórfico da ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania* que, de acordo com o comportamento evolutivo do parasito no tubo digestório do vetor, é agrupado em dois subgêneros: *Leishmania*, com desenvolvimento restrito às porções anterior e média do intestino (ROSS, 1903); e *Viannia*, que se desenvolve desde a porção proximal do tubo gástrico até o intestino (LAINSON; SHAW, 1987).

Leishmania sp é protozoário pleomórfico que completa seu ciclo de vida em dois hospedeiros distintos, sendo um vertebrado, mormente canídeos, murídeos ou humanos (KONTOS; KOUTINAS, 1993), nos quais o parasito apresenta-se sob a forma aflagelada, denominada amastigota, que se multiplica no interior das células do sistema mononuclear fagocitário por divisão binária (SLAPPENDEL, 1988; BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998). O outro hospedeiro é invertebrado, representado por insetos hematófagos, nos quais as amastigotas, após serem ingeridas por ocasião do repasto sanguíneo, transformam-se, no tubo digestório, em formas

flageladas, denominadas promastigotas, que, na sequência, após quatro dias, já podem ser transmitidas a novo hospedeiro (SLAPPENDEL, 1988; BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998).

A espécie envolvida na infecção depende da região geográfica, sendo três os agentes etiológicos identificados na LV: a *Leishmania (L.) donovani* na Ásia e África; a *Leishmania (L.) infantum* na Ásia, Europa e África, e a *Leishmania (L.) chagasi* nas Américas (CUNHA; CHAGAS, 1937; LAINSON; SHAW, 1987; MARZOCHI; MARZOCHI; CARVALHO, 1994). Apesar da perene discordância entre pesquisadores, semelhanças estruturais verificadas por meio de estudos moleculares permitem sugerir que a *L. (L.) chagasi* e a *L. (L.) infantum* sejam uma mesma espécie, levando alguns autores denominarem-na de *L. (L.) infantum chagasi* o agente etiológico, dessa enfermidade, também nas Américas (MAURÍCIO et al., 1999; SHAW, 2006).

2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL

2.3.1 Epidemiologia

A LV é endêmica em 77 países nos quatro continentes. De acordo com a OMS, cerca de 90% dos casos de LVH notificados ocorrem em Bangladesh, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2010), sendo que a disseminação se deve, em parte, a mudanças climáticas, movimentos migratórios e presença de co-infecção com o HIV, causador da Síndrome de imunodeficiência adquirida humana (DUJARDIN et al., 2008). Na América Latina, já foi detectada em 12 países (WHO, 2010), sendo que, no Brasil, casos de LVH foram identificados em 26 (96,3%) das 27 Unidades da Federação, com infecções autóctones diagnosticadas em 21 (80,8%) delas e, em aproximadamente, 1300 municípios brasileiros (BRASIL, 2012). As principais áreas acometidas no País estão na região Nordeste (47,1% dos casos), seguida pelas regiões Norte e Sudeste com cerca de 18% dos casos brasileiros de LVH em cada uma delas (BRASIL, 2012).

No Brasil, a antroponose, que era de ocorrência tipicamente rural passou, a partir de 1980, a ser responsável por epidemias em áreas urbanas (WERNECK,

2010). A prevalência da doença apresentou, desde então, um acentuado crescimento no País, não só em número de casos, mas, também, na sua dispersão geográfica (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). As alterações ambientais, causadas pelo intenso processo migratório de um grande contingente populacional do campo para as cidades estimulado por questões econômicas e/ou sociais, aliado às secas periódicas, promoveram o chamado “esvaziamento rural” e levaram a um processo de urbanização crescente. Tais mudanças acarretaram a expansão das áreas endêmicas, forçaram a adaptação do vetor ao ambiente urbano e contribuíram para o aparecimento de novos focos. Por falta de condições sócio-econômicas, essas populações passaram a habitar verdadeiros bolsões de pobreza do meio urbano, mas não perderam o vínculo com sua cultura rural e continuam mantendo não só seus cães, como também pequenos animais de produção. Esse fato é importante não só pela falta de condições higiênico-sanitárias, que propiciam a reprodução do vetor, mas, além disso, por permitir a introdução do agente etiológico em área indene (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; BRASIL, 2006).

2.3.2 Reservatório doméstico

Epidemiologicamente, os cães são considerados os principais reservatórios domésticos de *Leishmania* sp, sendo preponderante a sua participação para a manutenção do ciclo da doença, constituindo-se, assim, no principal elo na cadeia de transmissão da LV (SLAPPENDEL; FERRER, 1998; MELO, 2004). Essa hipótese baseia-se nos fatos da enfermidade ser mais prevalente na população canina, relativamente à humana, e na constatação de que os casos humanos normalmente são precedidos por casos caninos, pois estes últimos apresentam uma quantidade muito maior de parasitos por área tegumentar, relativamente ao evidenciado em humanos infectados (CASTRO, 1996; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; SCOTT; WILLIAM; GRIFFIN, 2001; BANETH, 2006), levando a maior possibilidade de infecção do vetor pela *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MARZOCHI et al., 1985; MOLINA et al., 1994; TRAVI et al., 2001) e daí a transmiti-la a suscetíveis humanos (QUEIROZ et al., 2011). Finalmente, destaque-se o fato de que tanto cães sintomáticos quanto assintomáticos apresentam igual importância como fonte de infecção aos flebotomíneos hematófagos (MOLINA et al., 1994; GUARGA et al.,

2000; LAURENTI et al., 2013). A morbidade da LVC em áreas endêmicas pode atingir percentis de até 70 a 90% da população animal (PALTRINIERI et al., 2010; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012). Já, na população humana, a incidência varia de 1 a 2% (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

2.3.3 Transmissão

No Brasil, a transmissão da leishmaniose é realizada pela picada de fêmeas de insetos hematófagos pertencentes à ordem Díptera, da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia* (LAINSON et al., 1994), sendo a *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie envolvida (REY, 2001). É ela conhecida popularmente como: cangalha, cangalhinha, orelha-de-veado, mosquito palha, birigui, tatuquira, tatuíra, bererê, catuqui, murutinga, escangalhado, asa branca, asa dura ou asa reta (BRASIL, 1997; MARZOCHI; SCHUBACH; MARZOCHI, 1999; FEITOSA et al., 2000; REY, 2001). Afora ela, a *Lutzomyia cruzi* parece também participar como vetor no estado do Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 1998), a *Lutzomyia intermedia*, no litoral do Município do Rio de Janeiro (MARZOCHI; MARZOCHI; CARVALHO, 1994), e a *Lutzomyia neivai* (*Nissomyia neivai*) e a *Lutzomyia sallesi* (*Evandromyia sallesi*) nas Minas Gerais (SARAIVA et al., 2009). Alguns autores associam o período de maior transmissibilidade àquelas das estações chuvosas, quando os insetos invadem o domicílio picando o homem e outros animais domésticos (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Existem outras formas de transmissão da LV, porém, até o momento, a presença do inseto vetor hematófago é considerado elemento essencial na cadeia de transmissão da doença (GONTIJO; MELO, 2004).

2.3.4 Patogenia

A patogênese da LVC, induzida pela *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*, nas condições ambientais brasileiras, necessita cada vez mais de estudos aprofundados, uma vez que a maior parte da bibliografia compilada, atinente ao assunto, refere-se à doença causada pelo parasito em condições experimentais de infecção ou, por

analogia, a estudos da medicina humana (KONTOS; KOUTINAS, 1993; QUINNELL et al., 2003). A LVC pode ser considerada como doença imunomediada devido à capacidade do parasito em modificar o sistema imune do indivíduo parasitado (MIRANDA et al., 2007; BANETH et al., 2008).

As formas promastigotas, inoculadas na pele do cão através do inseto vetor, promovem uma resposta inflamatória local caracterizada, inicialmente, pela ação do sistema complemento, que possui uma atividade lítica importante, uma vez que contribui para a migração de polimorfonucleares, como neutrófilos e eosinófilos, para o sítio de infecção, causando morte parasitária (LAURENTI et al., 2004). As células fagocitárias, relacionadas à imunidade inata, utilizam-se de mecanismos químicos e celulares de resposta rápida para controlar o crescimento e/ou a eliminação do agente invasor (ABBAS et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2010). Os parasitos que escapam desse sistema de defesa são, então, fagocitados pelas células do sistema fagocitário, principalmente os macrófagos, e sofrem, no interior dessas células ativadas, a ação de mecanismos leishmanicidas, tais como a produção de óxido nítrico e do estresse oxidativo, pelos radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (MAUËL; CORRADIN; BUCHMÜLLER-ROUILLER, 1991).

Algumas formas amastigotas, consideradas “resistentes”, que não são lisadas podem, porém, persistir no sítio de infecção e ali proliferarem através de mecanismos de escape, tais como: indução da produção de mediadores imunossupressores, tais como o TGF- β , capaz de inibir a função macrofágica e a IL-10, capaz de suprimir as citocinas; o TNF- α e o IFN- γ , que são muito importantes no controle das infecções por *Leishmania* sp (TSUNAWAKI et al., 1988; DING et al., 1990). Os protozoários, ao conseguirem escapar dos mecanismos da resposta inata, podem eliciar dois tipos de respostas imunes adquiridas, sendo uma celular, com participação dos linfócitos T, e outra do tipo humoral, com a produção de anticorpos pelo envolvimento de linfócitos B (ABBAS et al., 2008). Essa etapa é considerada crucial para o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro (KONTOS; KOUTINAS, 1993).

Como a *Leishmania* sp é parasito intracelular obrigatório, as defesas do hospedeiro são altamente dependentes da imunidade celular e resultam da atividade dessas células T que, por sua vez, é determinada pela produção de citocinas que as subdividem em células T auxiliares CD4⁺ do tipo Th-1 e células T auxiliares CD4⁺ do

tipo Th-2. A resposta efetiva contra o parasito baseia-se numa resposta do tipo Th-1, que consiste na indução da produção de citocinas, como IL-2 e IL-12, IFN- γ , TNF- α e linfotóxina que, dentre diversas outras ações, ativam macrófagos a produzir substâncias reativas de oxigênio e nitrogênio, como NO, estimulando, assim, a lise do parasito e, conseqüentemente, contribuindo para a resolução da doença (QUINNELL et al., 2001; FERRER, 2002). Por outro lado, a suscetibilidade resulta de um perfil de resposta basicamente do tipo Th2, considerada antiinflamatória, com produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10, com a conseqüente inexorável progressão da doença (CIARAMELA; CORONA, 2003; TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007). Já, quanto à resposta humoral no cão acometido, a despeito de ser muito exuberante, é, francamente, deletéria e nada protetora (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; FERRER et al., 1995; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000).

Estudos sugerem, ainda, que a resistência à infecção é dependente da habilidade das células T CD4⁺ secretarem IFN- γ , o qual induz a ativação dos macrófagos (PINELLI et al., 1995; BOGDAN, 2001), resultando na produção de NO pela enzima iNOS, que parece ter um papel importante no controle da infecção por *Leishmania* em cães (ZAFRA et al., 2008). Em experimentos *in vitro* verificou-se que macrófagos de cães infectados com *L. (L.) infantum* e ativados com rhIFN- γ produzem aumento na expressão de iNOS e diminuem o parasitismo em seu citoplasma quando comparado aos macrófagos infectados e não ativados utilizados como controles (SISTO et al., 2001). Concomitantemente, os linfócitos T CD8⁺ são, também, importantes no desenvolvimento da resposta imune, sendo considerados essenciais na imunidade frente à infecção de camundongos (MÜLLER et al., 1993) e de cães (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al., 1995). São eles subdivididos em: linfócitos Tc1, capazes de destruir células infectadas, através de perforinas e/ou de mecanismos associados à apoptose, via ativação da caspase 8 (TRAPANI; SMYTH, 2002) e de forte produção de IFN- γ , TNF- α e de Tc2, que destroem microorganismos intracelulares através da via das perforinas e granzimas, sendo capazes de produzir principalmente IL-4, IL-5 e IL-10 (DOBRZANSKI et al., 2004). Além disso, as células T CD8⁺ participam diretamente na produção de IFN- γ e na sua regulação pelas células T CD4⁺ (HERATH; KROPF; MÜLLER, 2003), bem como apresentam importante papel na resolução da infecção por espécies do gênero *Leishmania*. Tal fato foi constatado ao terem sido identificados linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico

de cães assintomáticos, porém, não os sendo a partir de casos de LVC ditos sintomáticos (PINELLI et al., 1995). Ainda, os linfócitos cutâneos do tipo T CD3⁺, incluindo os subtipos T CD4⁺ e T CD8⁺, são considerados os principais mediadores da imunidade celular local e da produção de anticorpos (PINELLI et al., 1999), tendo grande importância na proteção contra infecções em mucosas de pacientes humanos (ANTONELLI et al., 2006).

2.3.5 Manifestações clínicas no cão

Apesar da grande diversidade de manifestações clínicas da LVC, há animais aparentemente saudáveis e totalmente assintomáticos, bem como aqueles que exibem sintomatologia característica de estágios finais da enfermidade. A doença canina pode permanecer clinicamente inaparente por longos períodos (LONGSTAFFE et al., 1983).

A infecção por *Leishmania (L.) infantum chagasi* em caninos causa, na maior parte dos casos, uma doença sistêmica, de decurso crônico, que elicia manifestações clínicas inespecíficas e relativamente similares àquelas observadas em humanos infectados. Os sintomas mais comumente observados, tanto no cão quanto no homem, são anemia, perda de peso e aumento dos órgãos linfóides (MARZOCHI et al., 1985; SLAPPENDEL; GREENE, 1990; FERRER, 1992; FERRER et al., 1995; RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; NOLI, 1999). Os animais acometidos por LV podem apresentar, de forma associada ou isolada, alterações hemáticas, tegumentares e fanéricas, renais, hepáticas, cardíacas, pulmonares, oftálmicas, ósteo-articulares e neurológicas (MARZOCHI et al., 1985; SWENSON et al., 1988; FERRER, 1992; WOLSCHRIJN et al., 1996; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000). Ainda, devido à ocorrência de infecções oportunistas concomitantes, o quadro clínico pode se apresentar complicado, com má resposta à eventual terapia instituída e, conseqüentemente, com pior prognóstico (CASTRO, 1996; RIBEIRO, 1997; NOLI, 1999).

No que se refere às manifestações clínicas cutâneas, embora seja reconhecido que a dermatite seja achado comum na LVC, a intensidade da inflamação da pele de animais de áreas endêmicas que possa ser correlacionada à presença do parasito não é sabida. Dentre as principais alterações tegumentares, a dermatite esfoliativa, caracterizada pela presença de escamas branco-prateadas, em quantidade moderada à intensa, na pele de cães hipotricóticos, alopecicos ou mesmo com cobertura pilar normal, devido à flogose (granulomatosa e/ou piogranulomatosa), com ou desprovido de adenite sebácea cutânea (KOUTINAS et al., 1993), representa o achado mais comum da LVC (KOUTINAS et al., 1993; SCOTT; WILLIAM; GRIFFIN, 2001). Alguns cães podem, ainda, apresentar uma resposta imune efetiva e, em função disso, não apresentar qualquer sintoma clínico, ou, também, desenvolver apenas nódulos cutâneos, no ponto de inoculação do parasito, sendo que a essa reação tecidual, usualmente localizada na trufa e nas orelhas, designa-se “cancro primário de inoculação” (VIDOR et al., 1991). Tais lesões não pruriginosas, pouco dolorosas e que geralmente desaparecem espontaneamente entre um e seis meses podem apresentar diâmetros variando de 1 a 3 cm, serem alopecicas, ulceradas e, às vezes, com deposição de crostas (FERRER, 1999).

2.3.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da LVC é de difícil consecução devido à pleora e à variedade de sintomas da enfermidade, gerando, portanto, raras alterações patognomônicas. Consequentemente, pode-se aventar outras enfermidades, tornando os exames subsidiários realmente necessários para a confirmação da diagnose de suspeição (FEITOSA et al., 2000; SINGH; SIVAKUMAR, 2003; BRASIL, 2006; FEITOSA, 2006). Além disso, enquanto a prevalência da infecção, em áreas endêmicas, pode chegar a mais de 40% da população canina, o percentil de animais assintomáticos alcança índices de até 80%, em relação à população de infectados (BANETH et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2010), o que, por óbvio, dificulta sobremaneira o diagnóstico. Esses animais podem permanecer assintomáticos por

toda a vida ou desenvolver alterações clínicas após períodos que variam de três meses a alguns anos (FERRER et al., 1995).

Relativamente ao diagnóstico específico da LVC, este pode ser realizado basicamente por métodos parasitológicos, sorológicos, imunoalérgicos e moleculares. Dentre os primeiros, o exame parasitológico direto é o método mais empregado na rotina clínica, sendo considerado, por alguns autores, como o “padrão ouro” para o diagnóstico da enfermidade (DYE; VIDOR; DEREURE, 1993; LEONTIDES et al., 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2003) por permitir a observação de formas amastigotas do parasito em material obtido de aspirados esplênicos, de linfonodos e de medula óssea; de fragmentos hepáticos biopsiados e de esfregaços sanguíneos, corados com corantes de rotina, tais como Giemsa, Wright e Panótico (SWENSON et al., 1988; WOLSCHRIJN et al., 1996; CIARAMELLA; CORONA, 2003). As formas amastigotas são reconhecidas pela sua forma, de esférica a ovóide, medindo entre 2 e 5 µm e contendo núcleo arredondado e cinetoplasto alongado (SWENSON et al., 1988; WOLSCHRIJN et al., 1996; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006). A especificidade deste método é, virtualmente, de 100% mas, dependendo do tempo despendido na procura do parasito, a sensibilidade cai, passando a ser de, no máximo, 80% em indivíduos com sintomas manifestos e menor ainda em animais soropositivos assintomáticos (SLAPPENDEL; GREENE, 1990). A parasitemia, quando evidenciada no exame parasitológico, é muito variável, não tendo correlação direta com a intensidade da sintomatologia (PALTRINIERI et al., 2010) embora, em animais assintomáticos, o achado de *Leishmania* sp seja pouco frequente (CARDOSO et al., 1998). Em alguns pacientes a visualização de parasitos é muito laboriosa e os resultados negativos não são incomuns, especialmente nos casos crônicos (SLAPPENDEL, 1988; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006).

Outros métodos parasitológicos comumente utilizados para o diagnóstico da leishmaniose são as técnicas de IHQ e ICQ, que podem, muitas vezes, na possibilidade de haver um pequeno número de formas amastigotas no tecido lesado, auxiliar na sua detecção, sendo, de maneira geral, os exames mais sensíveis para tal (FERRER et al., 1988a; MOREIRA et al., 2007). Além disso, permitem, ainda, seu emprego em tecido fixado e já processado pelas técnicas usuais de histologia, sendo a pele e os órgãos linfóides aqueles mais amplamente avaliados, apresentando, independentemente do quadro clínico dos cães acometidos, altos

valores de sensibilidade e especificidade (MOREIRA et al., 2007). Além desses, o cultivo em Meio NNN ou no Meio RPMI-1640 é outro método também empregado para a detecção do parasito (TROTZ-WILLIAMS; GRADONI, 2003). A sensibilidade depende de vários fatores, tais como o tipo de meio utilizado e a quantidade de material depositada nos tubos de cultivo (CIARAMELLA et al., 1997).

Já, a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp circulantes, utilizando-se de técnicas sorológicas, constitui um instrumento importante no diagnóstico da LVC, porém, embora geralmente apresentem alta sensibilidade e especificidade, seus resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e específicos e podem gerar resultados tanto falso-positivos como falso-negativos (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Os principais métodos sorológicos empregados para o diagnóstico da enfermidade em cães são: a RIFI, amplamente empregada para diagnosticar a LVC em todo o mundo (SLAPPENDEL; FERRER, 1998) e que, até recentemente, era uma das técnicas preconizadas para a detecção da doença no Brasil, pelos Ministérios da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; o ELISA e o DPP, métodos atualmente recomendados pelos referidos Ministérios para o diagnóstico da protozoose canina no País (BRASIL, 2012).

Quanto aos métodos imunoalérgicos, o mais utilizado para o diagnóstico da LV é a IDR, que avalia a ocorrência de resposta de hipersensibilidade do tipo tardia, ou seja, pela detecção de resposta imune celular frente ao parasito (PINELLI et al., 1994; CARDOSO et al., 1998; SOLANO-GALLEGO et al., 2000; SOLANO-GALLEGO et al., 2005). É, normalmente, mais empregada para acompanhamento da resposta à terapia instituída nos indivíduos acometidos, sendo que os valores de sensibilidade e especificidade, descritos na bibliografia, enfocando pacientes humanos, variam de 83,7 a 100% (NOGUEIRA et al., 2008), todavia, em cães, são escassos os estudos com tal teste, sendo mais utilizada a título experimental na espécie (RODRÍGUEZ-CORTÉZ et al., 2007a; RODRÍGUEZ-CORTÉZ et al., 2007b).

Outra forma de diagnóstico da enfermidade embasa-se em métodos moleculares, como a PCR, convencional ou em tempo real, por meio dos quais é possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do parasito, possibilitando, inclusive, o seu sequenciamento e, conseqüentemente, permitindo identificar a

espécie de *Leishmania* sp envolvida na infecção (MARY et al., 2004). Pode-se, ainda, por meio da PCR em tempo real, determinar a carga parasitária presente na amostra, constituindo-se em uma boa perspectiva para o diagnóstico da LVC (GOMES et al., 2008; MAIA; CAMPINO, 2008). Os métodos moleculares apresentam sensibilidade e especificidade bastante elevadas, próximas a 100% (ASHFORD et al., 1995; ROURA; SÁNCHEZ; FERRER, 1999; MOREIRA et al., 2007), tendo, no entanto, como principais desvantagens, a necessidade de laboratórios bem equipados e acurada habilidade técnica de quem os executa (FERRER, 1999; BRASIL, 2006).

Finalmente, o XDG é a técnica que consiste em submeter o animal infectado a picadas do inseto vetor, criado em laboratório, e posteriormente verificar a presença de parasitos nos insetos ingurgitados. Trata-se, portanto, de método laborioso e de difícil execução, sendo, de maneira geral, mais utilizado para fins de pesquisa que propriamente para o diagnóstico da enfermidade de *per se* (SOARES et al., 2011).

2.3.7 Importância da Pele na Leishmaniose Visceral

O estudo da pele é pressupostamente importante, pois, corresponde ao tecido em que há a inoculação do parasito no cão, ou seja, a porta de entrada da infecção (KEMP; THEANDER; KHARAZMI, 1996). A posterior transmissão aos flebotomíneos pode ocorrer enquanto houver parasitismo tegumentar ou no sangue periférico dos reservatórios caninos (CAMARGO et al., 2007). Destarte, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos, a persistência, tempo de permanência e a localização da *Leishmania* na pele dos animais com LV, porém, é considerado um importante tecido reservatório de parasitos tanto em cães infectados sadios quanto naqueles doentes (ABRANCHES et al., 1991; SOLANO-GALLEGO et al., 2001), sendo que, aparentemente, as orelhas são as áreas cutâneas mais frequentemente infectadas (TRAVI et al., 2001; XAVIER et al., 2006) pela aparente maior exposição à picada do inseto vetor (TRAVI et al., 2001).

No que concerne à presença de parasitismo cutâneo e a sua possível correlação com o aspecto histológico do tegumento do cão infectado, alguns estudos mostraram que o tipo de infiltrado inflamatório, presente na pele de animais parasitados, pode refletir o exato perfil de resposta imune gerada pelo hospedeiro contra o parasito e, por conseguinte, pode ser considerado como marcador morfológico de suscetibilidade ou de resistência à infecção (FERRER et al., 1988a; FONDEVILA; VILAFRANCA; FERRER, 1997; LEMOS de SOUZA et al., 2000). Alguns pesquisadores observaram, também, que pode haver uma relação entre a sintomatologia clínica e o aspecto histológico da pele. Cães assintomáticos ou com poucos sintomas geralmente apresentam número moderado de células de Langerhans, poucos queratinócitos, expressando MHC-classe II, além de reduzido número de macrófagos. Já, aqueles com doença grave geralmente demonstram grande quantidade de macrófagos com vacúolos repletos de parasitos, poucas células de Langerhans e queratinócitos sem expressão de MHC-classe II, representando, assim, um padrão de suscetibilidade compatível com o desenvolvimento de doença (FONDEVILA; VILAFRANCA; FERRER, 1997; SOLANO-GALLEGO et al., 2004). Tais informações permitem que se conjecture que pesquisar a relação entre a resposta imune sistêmica e o padrão imunopatológico da pele de animais infectados poderá favorecer o entendimento da relação entre infecção e transmissão da doença (FONDEVILA; VILAFRANCA; FERRER, 1997; SANTOS et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004).

Especificamente quanto ao padrão histopatológico detectado na pele de cães com LV, frequentemente observa-se a ocorrência de dermatite perivascular mononuclear, superficial ou profunda; hiperqueratose, paraqueratótica ou ortoqueratótica, folicular e/ou epidérmica; dermatite intersticial, além de adenite sebácea; inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa e perifoliculite, também, granulomatosa (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005). Podem, ainda, ocorrer, porém menos comumente, quadros de dermatite periglandular, de dermatites: liquenóide, nodular ou pustular intraepidérmica, paniculite lobular, foliculite supurativa e vasculite necrotizante (SOLANO-GALLEGO et al., 2004). Já, no que concerne a carga parasitária da pele de cães infectados, estudos demonstraram que animais assintomáticos apresentam menor carga

parasitária em órgãos como pele, baço e medula óssea (MICHALSKY et al., 2007; VERÇOSA et al., 2008).

Relativamente ao potencial de transmissão ao inseto vetor em se comparando cães sintomáticos, com graus variados de manifestações clínicas, com aqueles assintomáticos, as informações presentes na bibliografia consultada são bastante divergentes. Enquanto alguns autores demonstraram que cães assintomáticos são incapazes de propiciar a infecção dos flebotomíneos com *Leishmania (L.) infantum chagasi* (TRAVI et al., 2001; VERÇOSA et al., 2008), outros comprovaram que a transmissão ocorre de forma equivalente ao observado em cães com poucos sintomas, porém, em menor proporção que aqueles francamente sintomáticos (COURTENAY et al., 2002; COSTA-VAL et al., 2007; MICHALSKY et al., 2007; AMORIM et al., 2011; SOARES et al., 2011). Outros, ainda, enfatizam que cães com LVC assintomáticos são mais “competentes” em transmitir o parasito ao inseto vetor que os ditos sintomáticos (MOLINA et al., 1994; GUARGA et al., 2000; LAURENTI et al., 2013).

A importância da LV como zoonose, associada à sua crescente dispersão territorial no País, à inaudita dificuldade de controle do inseto vetor, o risco de transmissão para o humano suscetível, bem como a gravidade da doença, na espécie canina, justificam a necessidade de tornar público o problema como forma de tentar impedir sua crescente disseminação. Além disso, em se tratando o programa governamental de controle da enfermidade, na discutível eliminação do seu principal reservatório no meio urbano, no caso o cão (BRASIL, 2012), é de extrema importância que se obtenha um diagnóstico acurado na tentativa de se evitar o sacrifício, intempestivo e errôneo, de animais falso-positivos sendo, portanto, primordial que se conheça em detalhes a relação entre o estado clínico (assintomáticos ou sintomáticos) de cães parasitados com a capacidade de infecção ao vetor flebotomíneo, com o padrão histológico da pele, com a carga parasitária tegumentar e, ainda, com o tipo de imunidade celular manifesta na pele dos animais infectados.

Capítulo 1 – AVALIAÇÃO DO PADRÃO INFLAMATÓRIO E DA IMUNIDADE CELULAR NA PELE DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* E SUA CORRELAÇÃO COM TRANSMISSIBILIDADE AO VETOR

3 INTRODUÇÃO

A LV é zoonose causada por protozoário do gênero *Leishmania*, sendo, no Brasil, a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* o agente etiológico da enfermidade e cuja transmissão entre hospedeiros vertebrados ocorre principalmente por meio da picada do inseto vetor *Lutzomyia longipalpis* (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Epidemiologicamente, o cão (*Canis familiaris*) é considerado o seu principal reservatório doméstico, uma vez que tanto cães sintomáticos quanto aqueles assintomáticos são altamente competentes em transmitirem o protozoário para o vetor natural (MOLINA et al., 1994; GUARGA et al., 2000; LAURENTI et al., 2013), bem como pelo fato de que o parasitismo cutâneo de animais infectados foi associado à transmissão do parasito para humanos (QUEIROZ et al., 2011). A pele geralmente corresponde ao tecido em que há a inoculação do agente etiológico da LV no cão, ou seja, a porta de entrada da infecção (KEMP; THEANDER; KHARAZMI, 1996), bem como é a partir do tegumento ou do sangue periférico parasitado que os reservatórios caninos podem infectar os vetores (CAMARGO et al., 2007). Destarte, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos, a persistência, tempo de permanência e a localização da *Leishmania* na pele dos animais com LV, porém, é considerado um importante tecido reservatório de parasitos tanto em cães infectados sadios quanto naqueles doentes (ABRANCHES et al., 1991; SOLANO-GALLEGO et al., 2001), sendo que, aparentemente, as orelhas são as áreas cutâneas mais frequentemente infectadas (TRAVI et al., 2001; XAVIER et al., 2006) pela aparente maior exposição à picada do inseto vetor (TRAVI et al., 2001).

Especificamente quanto ao padrão histopatológico detectado na pele de cães com LV, frequentemente observa-se a ocorrência de dermatite perivascular

mononuclear superficial ou profunda; hiperqueratose, paraqueratótica ou ortoqueratótica, folicular e epidérmica; dermatite intersticial, além de adenite sebácea; inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa e perifoliculite, também, granulomatosa (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005). Podem, ainda, ocorrer, porém menos comumente, quadros de dermatite periglandular, dermatites: liquenóide, nodular ou pustular intraepidérmica, paniculite lobular, foliculite supurativa, e vasculite necrotizante (SOLANO-GALLEGO et al., 2004). Já, no que concerne a carga parasitária de cães infectados, demonstraram que animais assintomáticos apresentam menor carga parasitária em órgãos como pele, baço e medula óssea (MICHALSKY et al., 2007; VERÇOSA et al., 2008).

Quanto à ocorrência de parasitismo cutâneo e a sua possível correlação com o aspecto histológico da pele do cão infectado, alguns estudos verificaram que o tipo de infiltrado inflamatório, presente no tegumento de animais parasitados, pode refletir o exato perfil de resposta imune gerada pelo hospedeiro contra o parasito e, portanto, pode ser considerado como marcador morfológico de suscetibilidade ou de resistência à infecção (FERRER et al., 1988a; FONDEVILA; VILAFRANCA; FERRER, 1997; LEMOS de SOUZA et al., 2000). Pesquisadores observaram, também, que pode haver uma relação entre a sintomatologia clínica e o aspecto histológico da pele. Tais informações permitem que se conjecture que pesquisar a relação entre a resposta imune sistêmica e o padrão imunopatológico da pele de animais infectados poderá favorecer o entendimento da relação entre infecção e transmissão da doença (FONDEVILA; VILAFRANCA; FERRER, 1997; SANTOS et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004).

A LVC pode ser considerada como doença imunomediada devido à capacidade do parasito em modificar o sistema imune do indivíduo parasitado (MIRANDA et al., 2007; BANETH et al., 2008). Como a *Leishmania* sp é parasito intracelular obrigatório, as defesas do hospedeiro são altamente dependentes da imunidade celular e resultam da atividade das células T que, por sua vez, é determinada pela produção de citocinas que as subdividem em células T auxiliares CD4⁺ do tipo Th-1 e células T auxiliares CD4⁺ do tipo Th-2 (QUINNELL et al., 2001; FERRER, 2002). Estudos sugerem que a resposta efetiva contra o parasito baseia-se numa resposta do tipo Th-1 e que a resistência à infecção é dependente da habilidade das células T CD4⁺ secretarem IFN- γ , o qual induz a ativação dos

macrófagos (PINELLI et al., 1995; BOGDAN, 2001), resultando na produção de NO pela enzima iNOS, que parece ter um papel importante no controle da infecção por *Leishmania* em cães (ZAFRA et al., 2008). Concomitantemente, os linfócitos T CD8⁺ são, também, importantes no desenvolvimento da resposta imune e considerados essenciais na imunidade frente à infecção em cães (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al., 1995). Ainda, os linfócitos cutâneos do tipo T CD3⁺, incluindo os subtipos T CD4⁺ e T CD8⁺, são considerados os principais mediadores da imunidade celular local e da produção de anticorpos (PINELLI et al., 1999), tendo, em humanos, um papel importante na proteção contra infecções em mucosas (ANTONELLI et al., 2006).

Em face ao exposto, é que o presente estudo foi delineado, fundamentado nos seguintes objetivos: correlacionar a caracterização clínica (assintomáticos ou sintomáticos) de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi* oriundos do município de Araçatuba, São Paulo, área endêmica para a enfermidade, com o potencial desses animais em infectarem o inseto vetor, com o padrão histológico da pele, com o perfil de imunidade celular evidenciado no mesmo tecido e com o parasitismo tegumentar desses cães.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado no presente estudo consistiu-se de fragmentos de pele parafinados oriundos de projeto previamente aprovado pelo Comitê de Bioética da FM-USP, São Paulo, Brasil, sob o nº de protocolo 706/04 e foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de Animais” da FMVZ-USP, protocolado sob o nº 2649/2012, e adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. As amostras foram colhidas na FMVA-UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil, e processadas no LIM-50 da FM-USP.

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram selecionados cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*, com idade superior a seis meses de idade, de quaisquer dos sexos, sintomáticos ou assintomáticos, dentre os encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba (21°12'32" S e 50°25'58" O), no noroeste do estado de São Paulo, Brasil, área altamente endêmica para leishmaniose visceral. Os animais foram escolhidos aleatoriamente em dois momentos distintos, sendo o primeiro em abril (11 cães sintomáticos e oito assintomáticos) e o segundo em setembro (13 cães sintomáticos e seis assintomáticos) de 2010, e reunidos em dois grupos: o primeiro composto por 24 animais sintomáticos apresentando manifestações clínicas de leishmaniose, tais como perda de peso, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, palidez de membranas mucosas, lesões cutâneas, onicogrifose, epistaxe e/ou queratoconjuntivite. O outro formado por 14 cães assintomáticos, ou seja, sem manifestações clínicas aparentes, exceto discreto aumento de linfonodo em sete animais (50%), porém, que apresentavam níveis de proteínas séricas inferiores a 8,5 mg/dL e de creatinina sérica com valores dentro dos limites de normalidade, de acordo com a *International Renal Interest Society* (IRIS, 2006). Os cães sintomáticos foram ainda classificados segundo a gravidade da doença, sendo que aqueles que se apresentavam clinicamente doentes e azotêmicos foram considerados como portadores de quadro clínico grave. Já, os animais com níveis de creatinina sérica

inferiores a 1,4 mg/dL e com manifestações clínicas mais brandas, embora também clinicamente enfermos, foram classificados como acometidos por quadro clínico leve. Para cada animal foi confeccionada uma ficha individual com os dados obtidos, onde se dispuseram a idade, sexo, sintomas coligidos e evidenciados pelo exame físico.

4.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Todos os animais utilizados apresentaram exame parasitológico positivo para leishmaniose, resultado este obtido após confecção de esfregaço, em lâmina, de material oriundo de linfonodo poplíteo colhido por citologia aspirativa por agulha fina (30x8mm) acoplada a seringa estéril (10mL). As amostras foram coradas com corante rápido tipo-Romanovsky (Panótico Rápido®, Laborclin, Paraná, Brasil) e observadas ao microscópio óptico de luz, em aumento de 100x, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp. Os cães, também, foram avaliados, por sorologia, para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp por meio da técnica de ELISA com antígeno puro de *Leishmania (L.) infantum chagasi* e com o conjugado fosfatase alcalina anti-IgG canino, conforme previamente descrito (COLOMBO et al., 2011). Foram considerados positivos os animais que apresentaram sorologicamente DO com títulos superiores à DO média acrescida de três desvios-padrões daquela obtida utilizando-se soros de cães sadios e não infectados.

4.3 XENODIAGNÓSTICO

Xenodiagnóstico foi realizado com vetores obtidos da colônia de Flebotomíneos do Laboratório de Entomologia do Instituto René Rachou (FIOCRUZ, Minas Gerais, Brasil). Utilizou-se *Lutzomyia longipalpis* de primeira geração, de 3 a 5 dias de idade, capturadas a campo na Gruta de Lapinha, localizada no estado de Minas Gerais, Brasil (19°03' S e 43°57' O) e que, até a realização dos experimentos, foram mantidos com solução açucarada a 5% *ad libitum*.

O XDG foi realizado em duas etapas, sendo que na primeira delas foram utilizados 19 cães (11 sintomáticos e oito assintomáticos) e, na segunda, outros 19 animais (13 sintomáticos e seis assintomáticos). Após serem selecionados, os cães

foram sedados com acepromazina a 1% (0,25 mg/kg, Acepran[®], Univet, São Paulo, Brasil) e, posteriormente, anestesiados com pentobarbital sódico (15mg/Kg, Hypnol 3%[®], Fontoveter, São Paulo, Brasil) e monitorados durante a realização do XDG. Aproximadamente 50 vetores foram acondicionados em recipientes plásticos individuais (10 cm de diâmetro x 5 cm de comprimento) com uma das extremidades aberta e telada com tela de nylon de malha fina. Os recipientes foram fixados na face interna de um dos pavilhões auriculares de cada animal e cobertos com pedaço de tecido preto para mimetizar condições ideais para que o vetor *Lutzomyia longipalpis* se alimentasse do sangue dos cães.

Após 60 minutos de repasto sanguíneo, os recipientes foram removidos e os vetores separados e mantidos à temperatura de 25-27°C e com umidade relativa de 90%. Posteriormente à digestão do sangue pelos vetores (4-5 dias pós-repasto), foram eles dissecados para identificar a presença de formas promastigotas do parasito. Para confirmar a presença de parasitos do gênero *Leishmania*, o conteúdo, oriundo da dissecação dos vetores positivos por microscopia óptica, foi submetido à análise pela técnica de PCR.

Imediatamente após a execução do xenodiagnóstico, os animais foram sacrificados com injeção intravenosa de solução de cloreto de potássio a 19,1% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), procedimento este realizado de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil. Posteriormente ao óbito, foram colhidos, com o auxílio de *punch* de 6mm, fragmentos de pele do pavilhão auricular da totalidade dos cães e, em seguida, imersos em solução tamponada com fosfato a 10% e com 0,01 M e processados pelas técnicas usuais de microscopia óptica de luz para a obtenção de cortes para estudos histológicos e imunológicos.

4.4 PESQUISA DE DNA DE *Leishmania (L.) infantum chagasi* POR PCR

O conteúdo do tubo digestório, oriundo da dissecação de cada vetor comprovadamente positivo à microscopia óptica de luz, pelo encontro de formas promastigotas, foi submetido à extração de DNA total utilizando-se um kit comercial

(Illustra Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin Kit-GE Healthcare[®], Little Chalfont, Reino Unido).

Uma sequência alvo, baseada no gene mini-exon com aproximadamente 200 cópias por genoma nuclear de *Leishmania* sp foi amplificada usando-se os seguintes primers: PG1 (*forward*) 5'-TTT ATT GGT ATG CGA AAC TTC C-3' e PG2 (*reverse*) 5'-GAA ACT GAT ACT TAT ATA GCG TTA G-3', em reação com volume final de 25µL.

A amplificação da sequência alvo ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e então 72°C por 6 minutos para a extensão final.

O fragmento específico de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* de 360 pares de bases foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (PAIVA et al., 2006). A PCR incluiu controles positivos (DNA de *L. (L.) infantum chagasi* de cultura) e controles negativos (todos os reagentes, exceto DNA).

4.5 EXAME HISTOLÓGICO DO PADRÃO INFLAMATÓRIO DA PELE

As biopsias de pele foram processadas pelas técnicas histológicas usuais para a obtenção de cortes, corados pela técnica de HE para exame histológico do padrão inflamatório da pele por microscopia óptica de luz com o intuito de verificar a eventual presença do parasito, as características do processo inflamatório, bem como para a determinação do parasitismo. Para o estudo histopatológico, foi realizada análise comparativa semiquantitativa dos cortes corados pelo HE atribuindo-se cruzes de acordo com a intensidade dos diferentes processos caracterizados, onde: (-) negativo, (+) discreto, (++) moderado e (+++) intenso.

4.6 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA PELE

Os fragmentos de pele obtidos por biopsia excisional da orelha onde foi realizado o xenodiagnóstico foram fixados em solução de formaldeído a 10% tamponado com fosfato a 0,01 M e processados pelas técnicas usuais de

microscopia. Foi realizado estudo imunoistoquímico do material com o intuito de avaliar o parasitismo tecidual e os aspectos da imunidade celular na pele, utilizando-se, para tanto, os marcadores para *Leishmania* (produzido no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da FM-USP, São Paulo, Brasil), anti-CD3 (DakoCytomation® A0452, Dako, Glostrup, Dinamarca), anti-CD4 (Novocastra® NCL-L-CD4-368, Leica, Nussloch, Alemanha), anti-CD8 (Novocastra® NCL-L-CD8-295, Leica, Nussloch, Alemanha), anti-NOS2 (NOS2® SC-651, Santa Cruz Biotech, Califórnia, Estados Unidos) e anti-macrófagos (Serotec® MCA874G, AbD Serotec, Kidlington, Alemanha).

A reação de IHQ para detecção de parasitos foi realizada em cortes histológicos parafinados utilizando-se anticorpo policlonal anti-*Leishmania* produzido em camundongo e diluído 1/500 em solução salina tamponada (PBS) a 0,01 M contendo 1% de soro albumina bovina (BSA), com o kit LSAB (Dako, Glostrup, Dinamarca), de acordo com Moreira et al. (2007). Para controle da reação de IHQ, peles de cães com parasitismo de escasso a moderado, por *Leishmania*, foram empregadas como controles positivos e a omissão do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo.

Para avaliação da resposta imune celular na pele, o tecido foi desparafinado e hidratado seguindo-se a recuperação antigênica utilizando o tampão citrato 10 mM pH 6,0 a 95°C por 30 minutos em banho-maria. Após bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio 3% e de ligações inespecíficas com solução de leite desnatado (Molico®, Nestlé, São Paulo, Brasil) a 6% em PBS 0,15 M aplicou-se os anticorpos primários, anti-CD3 e anti-macrófago nas diluições de 1:50 e 1:100, respectivamente. Para a revelação da reação, foi utilizado o kit LSAB (DakoCytomation® K0690, Dako, Glostrup, Dinamarca) e o substrato cromogênico, DAB+H₂O₂ (diaminobenzidina com peróxido de hidrogênio - DakoCytomation® K3468, Dako, Glostrup, Dinamarca). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris e após a desidratação, as lâminas foram montadas com resina e lamínulas. Para os anticorpos, anti-NOS2, anti-CD4 e anti-CD8, o kit de revelação utilizado foi o Novolink (Novocastra® RE7280-K, Leica, Nussloch, Alemanha), onde se incubou o reagente pós-primário seguido pelo polímero. A recuperação antigênica para o anticorpo anti-CD4 foi feita empregando-se o tampão EDTA 1 mM, pH 8,0 e o tampão de lavagem utilizado foi o TRIS 0,05 M,

pH 7,2; e para o anticorpo anti-CD8 foi empregado o tampão Tris-EDTA (10mM Tris Base, 1mM EDTA) pH 9,0 para a recuperação antigênica.

O parasitismo tecidual e a densidade de células imunomarcadas foi avaliada por análise quantitativa morfométrica utilizando-se de fotomicroscópio (Axioskop 2 plus®, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a um microcomputador. Para tal, foram fotografados 10 campos de cada corte histológico, que representava um animal, em objetiva de 40x. A quantidade de parasitos e de células imunomarcadas foram contadas empregando-se o programa Axion Vision 5.0® (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Posteriormente, foi calculado o número médio de amastigotas e de células imunomarcadas por milímetro quadrado em cada um dos cortes.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se um programa de computador comercialmente disponível (Prism 5 for Windows®, GraphPad Prism Software Inc., Califórnia, Estados Unidos). Fez-se uma correlação do estado clínico (assintomáticos e sintomáticos) com o perfil histológico, de imunidade celular, de carga parasitária na pele com a taxa de transmissibilidade para o vetor utilizando-se o teste de correlação de Spearman. O teste não paramétrico de Mann-Whitney U foi empregado para avaliar diferenças na proporção de vetores infectados com a imunidade celular e parasitismo do tegumento relativamente à caracterização clínica dos animais. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO, PARASITOLÓGICO E SOROLÓGICO

Trinta e oito cães naturalmente infectados foram classificados em sintomáticos (n = 24) e assintomáticos (n = 14) de acordo com as manifestações clínicas de leishmaniose visceral canina (LVC) e pela avaliação de bioquímica sérica realizada. Em relação aos animais utilizados no presente estudo, 53% (20/38) eram fêmeas, sendo 12 sintomáticos e oito assintomáticos, e os demais 47% (18/38) machos, dos quais 12 sintomáticos e seis assintomáticos. No que concerne a idade, 40% (15/38) eram animais jovens, entre seis e 24 meses de idade, sendo 10 sintomáticos e cinco assintomáticos, 42% (16/38) apresentavam entre 24 e 72 meses de idade, dos quais 10 sintomáticos e seis assintomáticos, e 18% (7/38) tinham mais que 72 meses de idade, quatro sintomáticos e três assintomáticos (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência (número e percentagem) de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, segundo o sexo e a faixa etária (meses), originários do município de Araçatuba (SP) - São Paulo - 2013

Forma clínica	Sexo		Faixa etária (meses)		
	M	F	6-24	25-72	>72
Assintomático	6 (33%)	8 (40%)	5 (33%)	6 (37,5%)	3 (43%)
Sintomático	12 (67%)	12 (60%)	10 (67%)	10 (62,5%)	4 (57%)
Total	18 (47%)	20 (53%)	15 (40%)	16 (42%)	7 (18%)

Nota: M - Machos; F - Fêmeas; % - Percentagem.

Dentre os animais sintomáticos, as manifestações clínicas mais frequentemente observadas foram linfadenomegalia (95,8%), lesões cutâneas (91,7%), esplenomegalia (66,7%), perda de peso (62,5%), hepatomegalia e

onicogrifose (54,2%). Relativamente aos achados tegumentares, os mais frequentemente encontrados foram alopecia e dermatite esfoliativa (68,2%) (Figura 1).

Figura 1 - Cães com leishmaniose visceral sintomáticos provenientes de Araçatuba (SP), demonstrando: (A) - alopecia lombossacral, pele ceratótica, liquenificada, melanodérmica e escamo-crostosa com presença de escamas micáceas e pitiriásicas; (B) - discreta mioatrofia temporal, além de alopecia em ponte nasal, periorbitária e de pavilhão auricular, encimada por escamas asbestiformes branquicentas; (C) - alopecia lombossacral em placa com lesão erodo-crostosa central e presença de crostas melicéricas; (D) - alopecia e edema podal, lesões erododescamativas, bem como onicogrifose

Fonte: Rossi, C. N. São Paulo (2013)

Já, relativamente aos assintomáticos, um discreto aumento de volume de linfonodos poplíteos foi verificado em 50% dos animais, porém, esses não apresentaram nenhuma outra alteração clínica ou laboratorial. Quanto à avaliação bioquímica, 63% (15/24) dos animais sintomáticos apresentaram aumento dos

valores séricos de creatinina ($>1,4$ mg/dL) e 54% (13/24) demonstraram hiperproteinemia ($>9,0$ g/dL), enquanto os assintomáticos mostraram valores séricos de proteína e creatinina dentro da normalidade. Ainda, baseado no diagnóstico sorológico, 36/38 (94,7%) dos animais apresentaram resultado de ELISA positivo, entretanto, um cão sintomático (4,2%) e outro assintomático (7,1%) foram soronegativos. Os títulos sorológicos foram maiores nos animais sintomáticos quando comparados aos assintomáticos ($p = 0,0411$) (Figura 2).

Figura 2 - Gráfico em *dot plot* e em *box plot* mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, de anticorpos anti-*Leishmania* (DO) detectados pela técnica de ELISA no soro de cães assintomáticos ou sintomáticos com leishmaniose visceral oriundos do município de Araçatuba (SP)

Fonte: Rossi, C. N. São Paulo (2013)

A identificação de formas amastigotas de *Leishmania* em linfonodo foi observada no exame parasitológico direto e por análise imunoistoquímica na totalidade dos animais (100%) (Figura 3).

Figura 3 - Micrografia demonstrativa da presença em linfonodos poplíteos de formas amastigotas de *Leishmania* (setas) em esfregaço de punção aspirativa corado por coloração tipo-Romanovsky (A) e em corte histológico submetido à técnica de imunohistoquímica (B) de cães com leishmaniose visceral oriundos do município de Araçatuba (SP)

Fonte: Rossi, C. N. São Paulo (2013)

Já, na pele, foi observada a presença do parasito em 14/24 (58,3%) dos cães sintomáticos e, somente em 5/14 (35,7%) dos animais assintomáticos. O número de formas amastigotas/mm² (média $\pm$ desvio padrão) no tegumento dos animais assintomáticos ($537,28 \pm 378,75$) e sintomáticos ($1336,37 \pm 866,77$) não apresentou diferença significativa entre os grupos clínicos ($p = 0,1584$) (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Micrografia demonstrativa da presença de parasitos (setas) detectados pela técnica de imunohistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomático (A) ou sintomático (B), oriundos do município de Araçatuba (SP)

Fonte: Rossi, C. N. São Paulo (2013)

Figura 5 - Gráfico em *dot plot* e em *box plot* mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, de formas amastigotas detectadas pela técnica de imunoistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, oriundos do município de Araçatuba (SP)

Fonte: Rossi, C. N. São Paulo (2013)

5.2 XENODIAGNÓSTICO

Um total de 637 flebotomíneos ingurgitados foram examinados após repasto sanguíneo, tendo sido 270 e 367 vetores, respectivamente, alimentados em 24 animais sintomáticos e de 14 assintomáticos. O percentil de infecção foi maior nos vetores que se alimentaram de cães assintomáticos (104 - 38,5%) comparativamente àqueles que sugaram animais sintomáticos (91 - 24,7%), mostrando uma maior taxa de transmissibilidade ($p = 0,0494$) para o vetor dos animais assintomáticos (Tabela 2).

Dezesseis animais sintomáticos (67%) infectaram os flebotomíneos, sendo que seis (37,5%) destes não apresentavam parasitismo cutâneo; já dentre os cães assintomáticos, todos, exceto um (93%), foram competentes em infectar pela

Leishmania os vetores, incluindo oito (61,5%) nos quais não se verificou presença de formas amastigotas no seu tegumento segundo os resultados histológicos e imunoistoquímicos. Deve-se ressaltar que a totalidade dos animais, assintomáticos ou sintomáticos, foram positivos quando da pesquisa de parasitos no linfonodo poplíteo.

Tabela 2 - Frequência (número e percentagem) de vetores da espécie *Lutzomyia longipalpis* examinados e infectados de acordo com a avaliação pela técnica de xenodiagnóstico realizada em cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, provindos do município de Araçatuba (SP) - São Paulo - 2013

Forma clínica	N	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	
		examinados/positivos	% infectados
Assintomático	14	270/104	38,5
Sintomático	24	367/91	24,7

Nota: N - Número de casos; % - Percentagem.

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PADRÃO INFLAMATÓRIO DA PELE

As alterações histológicas do padrão inflamatório da pele caracterizaram-se, de maneira geral, pela presença de infiltrado inflamatório tanto na derme superficial, como perianexial, formado, principalmente, por células mononucleares, quais sejam: macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Tal infiltrado variou de discreto a intenso, por vezes focal ou difuso (Figura 6). Aspecto histológico de pele hígida, não mostrando qualquer tipo de lesão tecidual ou parasitismo, foi observado em 25% (6/24) dos animais sintomáticos e em 36% (5/14) dos animais assintomáticos. A identificação de resposta inflamatória do tipo granulomatosa foi observada na pele de apenas um animal (2,6%) do grupo sintomático. A presença de formas amastigotas de *Leishmania* foi observada em 46% (11/24) dos animais sintomáticos e em 36% (5/14) daqueles assintomáticos nos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (Quadro 1).

Quadro 1 - Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório e do parasitismo tegumentar de cães assintomáticos (n = 9) ou sintomáticos (n = 18), portadores de lesões microscópicas cutâneas decorrentes de leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP) - São Paulo - 2013

Animal	Infiltrado Inflamatório dérmico								Parasito	
	Intenso	Discreto	Focal	Difuso	PMN	MAC	LINF	PLC	HE	IHQ
A-1	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
A-2	+	-	+	-	-	++	+	-	-	-
A-3	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
A-4	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
A-5	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+++
A-6	-	+	-	+	-	+	+	-	+	++
A-7	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+++
A-8	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
A-9	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
S-1	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
S-2	+	-	-	+	-	++	+	+	-	-
S-3	+	-	-	+	+	++	+	+	+	++
S-4	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
S-5	+	-	-	+	-	+++	+	++	+	++
S-6	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
S-7	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+++
S-8	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
S-9	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
S-10*	+	-	-	+	-	+++	+	+	+	++
S-11	-	+	+	-	-	+	+	-	+	++
S-12	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+++
S-13	+	-	-	+	-	++	+	+	+	++
S-14	-	+	+	-	-	+	+	-	-	++
S-15	+	-	-	+	-	+++	+	+	+++	+++
S-16	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
S-17	-	+	-	+	-	+	+	+	-	++
S-18	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+++

Nota: A - Assintomático; S - Sintomático; PMN - leucócito polimorfonuclear; MAC - Macrófago; LINF - Linfócito; PLC - Plasmócito; HE - Coloração de hematoxilina-eosina; IHQ - Reação de imunistoquímica; (-) - negativo; (+) - discreto; (++) - moderado; (+++) - intenso; * - Presença de granuloma

Figura 6 - Micrografia demonstrativa do padrão inflamatório observado por avaliação histológica (HE) da pele de cães com leishmaniose visceral oriundo do município de Araçatuba, São Paulo: (A) Infiltrado inflamatório mononuclear perianexial na derme; (B) Infiltrado inflamatório dérmico constituído por macrófagos, linfócitos e plasmócitos; (C) Formas sugestivas de amastigotas de *Leishmania* em meio ao infiltrado inflamatório mononuclear (seta); (D) Formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos na derme superficial (seta)

Fonte: Rossi, C. N. (2013)

5.4 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR DA PELE

Quanto à caracterização da resposta imune celular no tegumento dos animais estudados (Figuras 7 a 16), observa-se que, embora, o número médio de células/mm² tenha sido maior na pele dos animais sintomáticos, os marcadores de macrófagos e células T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺, não evidenciaram diferenças significativas entre ambos os grupos clínicos. A média e o desvio padrão do número de macrófagos/mm² foi de 249,18 ± 28,47 nos animais assintomáticos e de 344,56 ± 51,81 naqueles sintomáticos ($p = 0,2147$) (Figura 8).

Figura 7 - Micrografia demonstrativa da presença de macrófagos (setas) detectados pela técnica de imunohistoquímica na pele de cão assintomático (A) ou sintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP)

Fonte: Rossi, C. N. São Paulo (2013)

Figura 8 - Gráfico em *dot plot* e em *box plot* mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, da contagem de macrófagos detectados pela técnica de imunohistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, oriundos do município de Araçatuba (SP)

Fonte: Rossi, C. N. São Paulo (2013)

No caso da contagem de células $CD4^+/\text{mm}^2$, a média e o desvio padrão, foram, nos animais assintomáticos, respectivamente de $146,08 \pm 42,20$, enquanto nos sintomáticos, de $382,35 \pm 84,65$ ($p = 0,0510$) (Figura 12).

Figura 11 - Micrografia demonstrativa da presença de células marcadas pelo anti-CD4 (setas) detectado pela técnica de imunohistoquímica na pele de cão assintomático (A) ou sintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP)

Fonte: Rossi, C. N. São Paulo (2013)

Figura 12 - Gráfico em *dot plot* e em *box plot* mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, da contagem de células marcadas pelo anti-CD4 detectado pela técnica de imunohistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, oriundos do município de Araçatuba (SP)

Fonte: Rossi, C. N. São Paulo (2013)

Finalmente, quanto à densidade (células/mm²) de células iNOS⁺, foi significativamente maior na derme dos cães sintomáticos quando comparado aos assintomáticos ($p = 0,0368$). A média e o desvio padrão do número de células iNOS⁺/mm² nos animais assintomáticos foi de $346,43 \pm 76,41$, enquanto nos sintomáticos correspondeu a $669,90 \pm 114,07$ (Figura 16).

Figura 15 - Micrografia demonstrativa da presença de células marcadas pelo anti-iNOS (setas) detectado pela técnica de imunohistoquímica na pele de cão assintomático (A) ou sintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP)

Fonte: Rossi, C. N. (2013)

Figura 16 - Gráfico em *dot plot* e em *box plot* mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, da contagem de células marcadas pelo anti-iNOS detectado pela técnica de imunohistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos ou sintomáticos, oriundos do município de Araçatuba (SP)

Fonte: Rossi, C. N. (2013)

5.5. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS

Em relação à correlação dos resultados obtidos, observou-se correlação positiva moderada entre a densidade de parasitas na pele frente à de macrófagos ($r = 0,3501$; $p = 0,031$), de células T CD4⁺ ($r = 0,4007$; $p = 0,015$) e CD8⁺ ($r = 0,3773$; $p = 0,023$), caracterizando que quanto maior o parasitismo tecidual de maior magnitude será a resposta flogística. Correlação positiva também moderada foi verificada entre as densidades de células iNOS⁺ e de células T CD3⁺ ($r = 0,4522$; $p = 0,005$), CD4⁺ ($r = 0,5475$; $p = 0,001$) e CD8⁺ ($r = 0,5946$; $p = 0,0001$), tornando patente que a ativação de macrófagos com a produção de óxido nítrico, está diretamente imbricada à resposta imune celular. Tal como se pressupunha, houve uma correlação forte positiva entre as densidades de células T CD3⁺ e de células T CD4⁺ ($r = 0,7738$; $p = 0,0001$) e CD8⁺ ($r = 0,7309$; $p = 0,0001$).

A densidade de protozoários na pele evidenciou uma correlação considerada como positiva moderada frente aos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* ($r = 0,3316$; $p = 0,042$).

Finalmente, no que tange os resultados obtidos pelo xenodiagnóstico, a taxa de infecção dos flebotomíneos mostrou uma moderada correlação positiva com os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* ($r = 0,3215$; $p = 0,049$), no entanto, permitiu evidenciar correlação negativa moderada com o número de manifestações clínicas e/ou a gravidade da protozoose ($r = -0,2516$; $p = 0,028$), confirmando, assim, uma maior transmissibilidade de parasitos para o vetor relativamente aos assintomáticos. Não foi observada qualquer correlação entre os índices de infecção dos flebotomíneos com a faixa etária ($r = -0,1753$; $p = 0,3137$), tampouco com o sexo ($r = 0,0432$; $p = 0,208$). Merece destaque que não se observou qualquer correlação entre o parasitismo tegumentar e a taxa de infecção dos flebotomíneos ($r = 0,2117$; $p = 0,202$).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi idealizado com o intuito de avaliar a importância de cães parasitados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, tanto os sintomáticos quanto aqueles assintomáticos, em servir como fonte de infecção para o inseto vetor, bem como de avaliar e comparar o padrão histológico, a carga parasitária e a imunidade celular da pele de caninos infectados, correlacionando com a sua caracterização clínica.

As manifestações clínicas mais frequentes evidenciadas nos 24 caninos sintomáticos foram aquelas relativas a estruturas linfóides (linfadenomegalia em 95,8%); ao tegumento (91,7%), retratadas principalmente por alopecia e dermatite esfoliativa; a órgãos como baço (esplenomegalia em 66,7%) e fígado (hepatomegalia em 54,2%). Tais achados corroboram o disposto, de há muito, na bibliografia (FERRER et al., 1988b; SLAPPENDEL; FERRER, 1998; VERÇOSA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2010), mormente no que se refere à pele (FERRER et al., 1988b; KOUTINAS et al., 1993; CIARAMELA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; SCOTT; WILLIAM; GRIFFIN, 2001; SILVA et al., 2001; ALVAR et al., 2004; LIMA et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2005; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2010), sendo esta considerada, do ponto de vista clínico na LVC, como o órgão, além de mais exposto, o mais acometido pela protozoose.

Ao se avaliar a possibilidade de identificação de formas amastigotas de *Leishmania*, comparativamente, na pele e no linfonodo poplíteo, embora o parasito tenha sido observado tanto no exame parasitológico direto de linfonodo como por análise imunoistoquímica na totalidade dos 38 animais, sintomáticos ou assintomáticos, a sua detecção tegumentar só foi possível em 71,4% dos cães sintomáticos (14/24) e somente em 35,7% daqueles assintomáticos (5/14). Tais resultados estão de acordo com aqueles de Figueiredo et al. (2010) e Lima et al. (2010). Permite-se aventar a hipótese de que a detecção tegumentar de parasitos tem menor sensibilidade relativamente àquela de órgãos linfóides, onde há, por óbvio, uma maior concentração de protozoários. No entanto, o fato do parasito ter sido detectado na pele, em praticamente, três quartas partes (71,4%) dos caninos

sintomáticos e em um terço (35,7%) daqueles assintomáticos, bem caracteriza o papel do tegumento canino na transmissão da *Leishmania* ao flebotomíneo em áreas urbanas.

No que tange especificamente à carga parasitária identificada em pele, os resultados ora obtidos diferem daqueles publicados por Lima et al. (2010), que verificaram haver uma maior densidade de parasitos na pele em detrimento ao identificado nos órgãos linfóides, independentemente do estado clínico dos cães avaliados. Especificamente no que se refere ao número de formas amastigotas/mm² (média $\pm$ desvio padrão) detectadas no tegumento comparativamente entre os grupos clínicos, não houve diferença significativa ($p = 0,1584$), corroborando, portanto, o observado por outros pesquisadores (MADEIRA et al., 2004; LIMA et al., 2010). Tais dados, porém, destoam do verificado por outros autores (GIUNCHETTI et al., 2006; REIS et al., 2006b), que verificaram uma maior ocorrência em animais sintomáticos relativamente aos assintomáticos. Merece destacar que Solano-Gallego et al. (2004), evidenciaram a presença de parasitismo cutâneo tão somente em animais sintomáticos. Já, quanto à preocupante ocorrência de parasitismo na pele de cães assintomáticos, foi ela, também, relatada por outros autores (MADEIRA et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2006; VERÇOSA et al., 2008; MADEIRA et al., 2009; LIMA et al., 2010; LAURENTI et al., 2013).

O diagnóstico sorológico mostrou correlação com a densidade de parasitas na pele, sendo que somente um cão sintomático (4,2%) e outro assintomático (7,1%) foram soronegativos. Relativamente aos títulos sorológicos, esses foram superiores nos animais sintomáticos quando comparados aos assintomáticos ($p = 0,0411$). Estudos pretéritos, também, demonstraram que a detecção do parasito em animais infectados está diretamente correlacionada à presença de anticorpos séricos circulantes (DYE et al., 1993; MADEIRA et al., 2004; SANTOS et al., 2008).

No atinente à ocorrência do diagnóstico parasitológico estabelecido em dois casos em detrimento de resultados obtidos por exame sorológico, existem outros relatos dispostos na bibliografia em que se demonstrou a presença de *Leishmania* em animais soronegativos (BARROUIN-MELO et al., 2006; SANTOS et al., 2008; MADEIRA et al., 2009). Supõe-se que tal fato possa ocorrer em função da menor produção de anticorpos nas fases iniciais ou terminais da enfermidade ou, também,

naquelas infecções assintomáticas, uma vez que cães parasitados geralmente apresentam um aumento gradativo do título de anticorpos ao longo do tempo de evolução (OLIVA et al., 2006), ou, ainda, pode estar relacionada com a possibilidade desses animais jamais fazerem soroconversão (LEONTIDES et al., 2002; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006), indicando, assim, que um único método diagnóstico pode não identificar todos os animais infectados.

Já, no que se refere ao evidenciado quanto à correlação dos títulos sorológicos com a caracterização clínica dos cães avaliados, o mesmo já houvera sido verificado por outros autores (PINELLI et al., 1994; QUINNELL et al., 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; MENDES et al., 2003; REIS et al., 2006a; COSTA-VAL et al., 2007). Tal fato pode estar relacionado com o decurso crônico da enfermidade (MADEIRA et al., 2004) que, conseqüentemente, estimularia uma exacerbada resposta humoral, conforme o que é habitualmente verificado em caninos sintomáticos (CAMPINO et al., 2000; ALEXANDRE-PIRES et al., 2010). Essa possibilidade, também, poderia explicar a correlação positiva moderada ($p = 0,042$) verificada entre a densidade de parasitos na pele e os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* detectados.

Quanto à avaliação do percentil de infectividade dos flebotomíneos hematófagos, a despeito de cães de ambos os grupos clínicos terem sido importantes fontes de infecção para os vetores, os assintomáticos infectaram uma maior percentagem de fêmeas, indicando, portanto, serem mais “competentes” em transmitir o parasito. Tais resultados são similares aos obtidos por Molina et al. (1994) e Guarga et al. (2000), que verificaram a transmissão de parasitos para o vetor *Phlebotomus perniciosus*, principal espécie responsável pela transmissão do protozoário no Velho Mundo, a partir de cães assintomáticos, em percentis semelhantes aos obtidos após o repasto em animais sintomáticos. Por outro lado, esses resultados confrontam-se daqueles obtidos em prévios estudos brasileiros realizados por Michalsky et al. (2007), que observaram que animais assintomáticos são cerca de quatro vezes menos infectantes aos flebotomíneos que os sintomáticos, e, ainda, naqueles de Verçosa et al. (2008), bem como em estudos colombianos realizados por Travi et al. (2001,2002), que concluíram que nenhum dos cães assintomáticos por eles investigados infectaram os vetores.

No que concerne a correlação dos percentis de infecção do vetor relativamente à caracterização clínica dos animais avaliados, foi observada uma correlação negativa moderada ($p = 0,028$), ou seja, quanto mais manifestações clínicas, menor a proporção de infecção dos vetores, e vice-versa. Tal resultado reforça já referida ocorrência de uma maior transmissibilidade de parasitos para o vetor a partir de animais assintomáticos. Destaque-se, porém, que conclusões obtidas por meta análise realizada por Quinnell e Courtenay (2009), analisando sete estudos publicados, verificaram que a proporção de flebotomíneos infectados não parece ter qualquer relação com a caracterização clínica de cães infectados. De acordo com esses últimos autores, a possibilidade de animais com LVC transmitir parasitos aumenta significativamente com a quantidade de manifestações clínicas presentes, o que também discorda dos resultados ora apresentados. No presente estudo, cães sintomáticos com lesões cutâneas foram menos infectantes aos vetores em relação àqueles assintomáticos, o que pode ser, pressupostamente, explicado pela hipótese aventada em relato publicado há cerca de 80 anos por Adler e Theodor (1931). A dupla de autores observou que a presença de lesões de pele agravada pela presença de patógenos fúngicos ou bacterianos secundários pode interferir negativamente na aproximação dos flebotomíneos. É mister destacar-se que não foram pesquisados outros possíveis eliciadores das lesões tegumentares identificadas nos animais sintomáticos, ora estudados.

Quanto à possibilidade de infecção dos vetores no relativo ao parasitismo cutâneo, não houve correlação entre essas variáveis ($p = 0,202$), bem como não foi observada diferença estatística significativa no que tange à detecção de *Leishmania* na pele de cães assintomáticos ou sintomáticos, concordando com o já verificado por Travi et al. (2001). Ainda, mesmo que com ausência de parasitos no tegumento, animais de ambos os grupos foram capazes de transmiti-los ao flebotomíneo, o que reforça que a ocorrência de parasitismo cutâneo não é primordial para que ocorra a transmissibilidade do protozoário ao inseto vetor. Por outro lado, a totalidade dos animais, de ambos os grupos, foi positiva quando da pesquisa de parasitos em linfonodo poplíteo, tendo sido o achado que demonstrou ter a maior correlação com a positividade do xenodiagnóstico. Assim, permite-se supor que o parasitismo sistêmico pode ser mais importante para a ocorrência de transmissão ao flebotomíneo que o cutâneo. Além disso, uma vez que parasitos circulantes podem

ser, eventualmente, detectados em cães leishmanióticos (MANNA et al., 2004), é plausível aventar a hipótese de que os parasitos, ao deixarem os gânglios linfáticos, através dos vasos linfáticos, caiam na corrente sanguínea, fonte de alimento do vetor.

No atinente aos fatores etário e sexual, quando correlacionados com os resultados obtidos pelo XDG, não foi observada correlação entre a infectividade dos flebotomíneos com a faixa etária ($p = 0,3137$) e tampouco com o sexo ($p = 0,208$). Relativamente à primeira, pressupunha-se haver uma maior infecção do vetor tanto a partir de animais jovens, pela sempre presumida imaturidade do seu sistema imune, bem como daqueles mais velhos, pela maior exposição às múltiplas picadas de insetos vetores em função de viverem, por períodos mais longos, em áreas endêmicas. Já, em relação à segunda variável, qual seja o gênero, supõe-se que este, realmente, não influencie na transmissão do parasito ao flebotomíneo.

Especificamente quanto ao padrão inflamatório detectado por exame histológico da pele dos animais estudados, os achados obtidos corroboram aqueles dispostos na bibliografia compilada. Genericamente, também se descreve a presença, predominante, em cães infectados, de infiltrado inflamatório, na derme superficial, caracterizado, principalmente, por células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), que pode variar de discreto a intenso, por vezes, focal, ou, mesmo, difuso (TAFURI et al., 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2010). É importante aventar a hipótese de que, principalmente naqueles animais nos quais não se identificou parasitismo tegumentar, o início do processo inflamatório pode ser atribuído, também, por uma série de outras condições, tais como picadas de outros insetos, que são relativamente contumazes durante todo o ano, em países tropicais (PRATS; FERRER, 1995). Afora isso, autores catalães como Prats e Ferrer (1995) e Mozos et al. (1999) referiram-se aos cotidianos traumatismos (folgedos, brigas) e às ectoparasitoses como primícias de inflamação.

Histologicamente, foi, ainda, identificada, em apenas um animal (2,6%) do grupo sintomático, a presença de evidente resposta granulomatosa. Tal possibilidade já houvera sido previamente relatada por outros autores (MÜLLER et al., 2003; SANTOS et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004;

PAPADOGIANNAKIS, 2005; VERÇOSA et al., 2008), porém, destoa do verificado em parte da literatura compulsada (GIUNCHETTI et al., 2006; XAVIER et al., 2006; MOURA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2010). Muitos pesquisadores concordam que a formação de granuloma provém da presença de patógenos intracelulares, consistindo de um adensamento de macrófagos parasitados circundados por um halo de células mononucleares, contendo monócitos (MURRAY, 2001). Destarte, é mister que se considere que a sua formação também pode decorrer da presença prévia de lesão tegumentar de outra etiologia e que, somente após a chegada do parasito no sítio já lesado, pode levar a uma mudança do padrão inflamatório no sentido de induzir a formação de granulomas (PRATS; FERRER, 1995; MOZOS et al., 1999).

No tocante a observação, por avaliação histológica, de pele com padrão inflamatório aparentemente normal, ou seja, não mostrando qualquer tipo de lesão tecidual, conforme o verificado em 25% (6/24) ou em 36% (5/14) dos animais, respectivamente, sintomáticos ou assintomáticos, já havia sido demonstrado por Solano-Gallego et al. (2004). No que tange a presença de formas amastigotas de *Leishmania*, essa foi observada em apenas 46% (11/24) dos animais sintomáticos e em 36% (5/14) daqueles assintomáticos, nos cortes histológicos corados pela HE, sendo tais resultados similares aos verificados por outros autores (BOURDOISEAU; MARCHAL; MAGNOL, 1997; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). O fato de não terem sido detectados histologicamente parasitos na pele em, respectivamente, um quarto e cerca de um terço dos sintomáticos e daqueles desprovidos de manifestações clínicas, pode ter ocorrido devido à baixa densidade protozoótica presente no tegumento dos cães avaliados. Tal ilação apoia-se na possibilidade de que, após a transmissão percutânea de *Leishmania* pelo inseto vetor, levando-se em consideração a evolução natural da doença, ocorreria a disseminação do protozoário para todo o organismo do animal acometido, permanecendo, portanto, menor quantidade de protozoários no cancro primário de inoculação. Além disso, há que se considerar a baixa sensibilidade do método empregado, bem como que se avenge a possibilidade de que um pequeno fragmento de pele possa não representar o real parasitismo tegumentar como um todo.

Com relação à caracterização da resposta imune celular na pele dos animais estudados, no atinente às contagens de macrófagos e de células T CD3⁺, T CD4⁺ e

T CD8⁺, embora o número médio de células/mm² detectadas tenha sido maior no tegumento dos animais sintomáticos, não foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos (respectivamente, $p = 0,2147$, $p = 0,1285$, $p = 0,0510$ e $p = 0,0500$). Já, quanto à densidade (células/mm²) de células iNOS⁺, esta foi significativamente maior na derme dos cães sintomáticos quando comparado aos assintomáticos ($p = 0,0368$). Tais achados mostram uma similaridade na resposta imune celular comparativamente entre animais assintomáticos ou sintomáticos, embora um número maior de células tenha sido observado na pele daqueles sintomáticos, que, pressupostamente, pode estar relacionado à maior carga parasitária identificada nestes animais, o que, consequentemente, estimularia um maior afluxo de células inflamatórias (COURA-VITAL et al., 2011). Porém, há que se ressaltar que, de acordo com a bibliografia consultada, não era de se esperar que os sintomáticos apresentassem contagens de células iNOS⁺ com índices significativamente superiores comparativamente àqueles assintomáticos (REIS et al., 2006a; ZAFRA et al., 2008; REIS et al., 2009).

Especificamente no que tange os níveis de CD4⁺ identificados, Guarga et al. (2004) verificaram que quanto mais baixas as suas contagens, maiores seriam as possibilidades de infecção do vetor, o que poderia explicar a ocorrência, no presente estudo, de maior índice de infectividade aos flebotomíneos a partir de animais assintomáticos comparativamente aos sintomáticos, embora não se tenha confirmado tal diferença pelo método estatístico ora empregado. Já, quanto ao marcador CD8⁺, é, segundo Reis et al. (2009), a principal célula relacionada à patogenicidade do quadro clínico em caninos. Tais autores demonstraram que baixos níveis circulantes de CD8⁺ estariam relacionados com doença grave e, por outro lado, o seu aumento seria esperado em animais assintomáticos, achado esse que destoa, portanto, do verificado no presente estudo. Porém, é pertinente considerar que, na investigação conduzida por Reis et al. (2009), não se realizou a avaliação do marcador na pele dos animais por eles estudados. Ainda, como se presumia, houve uma correlação positiva forte entre a densidade de células T CD3⁺ e as células T CD4⁺ ($p = 0,0001$) e CD8⁺ ($p = 0,0001$), na medida em que são considerados os principais mediadores da imunidade celular local e, também, da produção de anticorpos (PINELLI et al., 1999), tendo tais células, comprovadamente

em humanos, um importante papel na proteção contra infecções em mucosas (ANTONELLI et al., 2006).

Já, no que se relaciona ao marcador iNOS⁺, era de se esperar maiores contagens nos assintomáticos relativamente aos sintomáticos, uma vez que, de acordo com a bibliografia consultada, a expressão de iNOS⁺ seria fundamental na regulação agindo como molécula efetora prevenindo a multiplicação do parasito. A suposição retro referida baseava-se em resultados provenientes de estudos *in vitro* que verificaram que quando de resposta imune protetora, formas amastigotas de *Leishmania* seriam fagocitadas e, em seguida, destruídas pelos macrófagos ativados (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; GANTT et al., 2001; SISTO et al., 2001). Segundo Zafra et al. (2008), macrófagos contendo grande número de formas amastigotas de *Leishmania* não expressam iNOS⁺, sustentando, assim, aquela hipótese. A mensuração da sua expressão, segundo a bibliografia, seria deveras importante para avaliar o potencial de produção de óxido nítrico, cuja síntese, pelos macrófagos, é ativada pela resposta Th1 (MELBY et al., 1998; BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000), que seria requerida para a efetiva destruição de agentes patogênicos (STENGER et al., 1996; SHIN et al., 2000).

Ainda, no que se refere à correlação das contagens do marcador iNOS⁺ com as demais células ora avaliadas, foi verificada moderada correlação positiva entre a densidade de células iNOS⁺ e T CD3⁺ ($p = 0,005$), CD4⁺ ($p = 0,001$) e CD8⁺ ($p = 0,0001$). Tais achados, pressupostamente, mostram que a ativação macrofágica, com a subsequente produção de óxido nítrico, pode estar diretamente relacionada à exacerbada resposta imune celular e com o baixo parasitismo tegumentar ora verificados, corroborando, portanto, com o demonstrado por Zafra et al. (2008).

Finalmente, no que tange a correlação da densidade de parasitos identificados na pele com os resultados de imunidade celular obtidos, foi observada correlação positiva moderada entre as densidades parasitárias cutânea e aquela de macrófagos ($p = 0,031$), de células T CD4⁺ ($p = 0,015$) e CD8⁺ ($p = 0,023$), mostrando que quanto maior o parasitismo tecidual, mais intensa é a resposta inflamatória (SANTOS et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004).

Diante do exposto, pode-se constatar, levando-se em consideração os resultados ora apresentados, que não houve correlação da transmissibilidade ao

vetor tanto com o padrão inflamatório como com a resposta imune tegumentar, e tampouco, com a carga parasitária evidenciada no mesmo tecido. Afora isso, os achados da presente investigação embasam a hipótese de que o parasitismo dito sistêmico parece ser mais importante para a infecção do flebotomíneo que aquele presente na pele de cães infectados.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo, levando-se em consideração a metodologia empregada, permitem concluir que: animais mesmo assintomáticos são potenciais fontes de infecção para os insetos vetores por serem mais competentes na transmissão do parasito para o flebotomíneo; o parasitismo sistêmico teria maior correlação com a ocorrência de transmissão ao vetor que o tegumentar, independentemente do estado clínico do animal; a principal alteração histológica detectada na pele de cães infectados foi a presença de infiltrado inflamatório na derme superficial, constituído, principalmente, por células mononucleares; a resposta imune celular demonstrou ser semelhante entre os grupos clínicos, exceto pelo marcador iNOS⁺, que apresentou índices dérmicos significativamente superiores nos cães sintomáticos frente àqueles assintomáticos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. B.; LITCHMAN A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 564.
- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SANTOS-GOMES, G. M.; JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, v. 77, p. 557–561, 1991.
- ADLER, S.; THEODOR, O. Skin infection in canine visceral leishmaniasis. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1179, 1931.
- ALEXANDRE-PIRES, G.; BRITO, M. T. V. de; ALGUERÓ, C.; MARTINS, C.; RODRIGUES, O. R.; FONSECA, I. P.; SANTOS-GOMES, G. Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 137, p. 275-283, 2010.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- AMORIM, I. F. G.; SILVA, S. M.; FIGUEIREDO, M. M.; MOURA, E. P.; CASTRO, R. S.; LIMA, T. K. S.; GONTIJO, N. F.; GOLLOB, K. J.; TAFURI, W. L. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes 347 and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in 348 visceral leishmaniasis. **PLoS ONE** 6, e27679, 2011.
- ANTONELLI, L. R.; DUTRA, W. O.; OLIVEIRA, R. R.; TORRES, K. C.; GUIMARÃES, L. H.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K. J. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4-CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 6317–6323, 2006.
- ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JUNIOR, R. H.; BADARÓ, R.; DAVID, J. R. Comparison of the polymerase chain reaction and

serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p. 685-698.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Canine Leishmaniosis. In: Greene C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. St. Louis: Saunders/Elsevier, 2012. p. 735-749.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; de ANDRADE FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIÃO, F. S.; FRANKE, C. R.; AGUIAR, P. H. P.; dos SANTOS, W. L. C.; PONTES de CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **The International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121-134, 1998.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunology Review**, v. 173, p. 17-26, 2000.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin embedded sections of canine skin and lymph nodes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 439-440, 1997.

BRASIL. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. **Leishmaniose tegumentar americana no Brasil: ferida brava**. Brasília: Ministério da Saúde, 1997. 39 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2012. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561>.
Acesso em: 06 maio 2013.

CAMARGO, J.B.; TRONCARELLI, M.Z.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H.
Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, n. 12, p. 86-92, 2007.

CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.; RIÇA-CAPELA, M.; CORTES, S.;
ABRANCHES, P. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p. 269–275, 2000.

CARDOSO, L.; NETO, F.; SOUSA, J. C.; RODRIGUES, M.; CABRAL, M. Use of leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 3, p. 213-220, 1998.

CASTRO, A. G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar)**: normas técnicas. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86 p.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium**, v. 25, p. 358-368, 2003.

COLOMBO, F. A.; ODORIZZI, R. M.; LAURENTI, M. D.; GALATI, E. A.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, p. 26-274, 2011.

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F.; MICHALIK, M. S. M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, v. 174, p. 636-643, 2007.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; VIEIRA, P. M.; CARNEIRO, C. M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **The Veterinary Journal**, v. 190, p. 43-47, 2011.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1314–1320, 2002.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Estudo sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, p. 329-337, 1937.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigm of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 151-156, 2006.

DING, A.; NATHAN, C. F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D. J.; SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 3$ inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . **Journal of Immunology**, v. 145, p. 940-944, 1990.

DOBRZANSKI, M. J.; REOME, J. B.; HOLLENBAUGH, J. A.; DUTTON, R. W. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting Mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 3, p. 1380-1390, 2004.

DUJARDIN, J. C.; CAMPINO, L.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J. P.; GRADONI, L.; SOTERIOU, K.; MAZERIS, A.; OZBEL, Y.; BOELAERT, M. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1013-1018, 2008.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, v. 110, n. 3, p. 647-656, 1993.

FEITOSA, M. M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal, SP. **[Anais...]**. 2006. Disponível em: < http://www.cbpv.com.br/artigos/CBPV_Anais_1LVC.pdf > Acesso em: 9 mar. 2009.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FIGUEIREDO, M. M.; MOURA, E. P.; COSTA, M. M.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 7, p. 877-887, 2010.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D. **Kirk's current veterinary therapy**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. p. 266-270.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain. **Anais...** 1999. p. 6-10.

FERRER, L. Canine Leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In: WSAVA CONGRESS CHOOSES, 8., 2002, Granada. **Proceedings....** 2002. Disponível em: <<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=PR02653>> Acesso em: 13 ago. 2006.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J. A.; DOMINGO, M. Skin-lesions in canine leishmaniasis. **Journal Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-388, 1988a.

FERRER, L.; RABANAL, R.; DOMINGO, M.; RAMOS, J. A.; FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research in Veterinary Science**, v. 44, p. 194-196, 1988b.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 136, n. 20, p. 514-516, 1995.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 319-327, 1997.

GANTT, K. R.; GOLDMAN, T. L.; McCORMICK, M. L.; MILLER, M. A.; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, E. T.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 893-901, 2001.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 100-107, 2006.

GOMES, Y. M.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Journal**, v. 175, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GUARGA, J. L.; LUCIENTES, J.; GARCIA, M. J.; PERIBANEZ, M. A.; ALVAR, J.; CASTILLO, J. A. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Research in Veterinary Science**, v. 69, p. 249-253, 2000.

GUIMARÃES, K. S.; BATISTA, Z. S.; DIAS, E. L.; GUERRA, R. M. S. N. C.; COSTA, A. D. C.; OLIVEIRA, A. S.; CALBRESE, K. S.; CARDOSO, F. O.; SOUSA, C. S. F.; ZAVERUCHA do VALE, T.; ABREU-SILVA, A. L. Canine visceral leishmaniasis in

São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 305-309, 2005.

HERATH, S.; KROPF, P.; MÜLLER, I. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 11-12, p. 559-567, 2003.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista Clínica Veterinária**, v. 11, n. 62, p. 32-38, 2006.

IRIS, 2006. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com>> Acesso em: 5 mar. 2013.

KEMP, M.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. **Immunology Today**, v. 17, n. 1, p. 13-16, 1996.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. Old world canine leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 15, n. 7, p. 949-959, 1993.

KOUTINAS, A. F.; SCOTT, D. W.; KONTOS, V. I.; LEKKAS, S. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. **Veterinary Dermatology**, v. 3, p. 121-130, 1993.

KOUTINAS, A.F.; SCOTT, D. W.; KONTOS, V.; LEKKAS, S. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 35, p. 376-383, 1999.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Ecology and epidemiology: new world. In: PETERS, W.; KILLICK, HENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 291-363.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; SOUZA, A. A. A.; BRAGA, R.; ISHIKAWA, E. A. I. The dermal leishmaniases of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 435-443, 1994.

LAURENTI, M. D.; ORN, A.; SINHORINI, I. L.; CORBETT, C. E. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. **Brazilian Journal of medical Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 427-434, 2004.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C. S. < PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013.

LEMOS de SOUZA, V.; ASCENSÃO, J. S.; SAMPAIO, P. T. V.; RODRIGUES de FREITAS, L. A. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1807-1815, 2000.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 19-27, 2002.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. M. S.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, p. 43-53, 2004.

LIMA, L. V.; CARNEIRO, L. A.; CAMPOS, M. B.; CHAGAS, E. J.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P.; LAINSON, R.; SILVEIRA, F. T. Canine visceral leishmaniasis in amazonian Brazil: comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 5, p. 259-265, 2010.

LONGSTAFFE, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F.; BEDFORD, P. G. C.; HERRTAGE, M. E.; DARKE, P. G. G. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom: a potential human health hazard. **Small Animal Practice**, v. 24, p. 23-30, 1983.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. P.; LEAL, C. A.; MARZOCHI, M. C. A. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 440-444, 2004.

MAIA, C; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274–287, 2008.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 251-262, 2004.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; SOUZA, P. P.; TOLEDO, L. M.; RANGEL FILHO, F. B. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis em Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, n. 1, p. 34-37, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B., CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 39-64.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5249-5255, 2004.

MAUËL, J.; CORRADIN, S. B.; BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages. **Research in Immunology**, v. 142, n. 7, p. 577-580, 1991.

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 237-246, 1999.

MELBY, P. C.; YANG, Yan-Zhu; CHENG, Jun; ZHAO, Weiguo. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 18-27, 1998.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 41-45, 2004. Suplemento 1.

Trabalho apresentado no 13º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e 1 Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, MG, 2004.

MENDES, C. O.; SOUZA, E. P.; BORJA-CABRERA, G. P.; BATISTA, L. M. M.; SANTOS, M. A.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; SOUZA, C. B. P. de. IgG1/IgG2 dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, p. 2589-2597, 2003.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assesment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. In experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: *Psychodidae*: *Phlebotominae*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; da ROCHA-LIMA, A.C.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; dos SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 67–76, 2007.

MIRANDA, S.; MARTORELL, S.; COSTA, M.; FERRER, L.; RAMIS, A. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 251-260, 2007.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491-493, 1994.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n.1, p. 245-252, 2007.

MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; SAMPAIO, W. M.; LIMA, W. G.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; MICHALICK, M. S. M. Histopathological and parasitological analysis of skin biopsies tissues from two distinct anatomical areas of the ears of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 1, n. 1, p. 10-15, 2008.

MOZOS, E.; PÉREZ, J.; DAY, M. J.; LUCENA, R.; GINEL, P. J. Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinical and immunohistochemical study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 257-268, 1999.

MÜLLER, I.; KROPF, P.; ETGES, R. J.; LOUIS, J. A. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. **Infectious Immunology**, v. 61, n. 9, p. 3730-3738, 1993.

MÜLLER, N.; ZIMMERMANN, V.; FORSTER, U.; BIENZ, M.; GOTTSTEIN, B.; WELLE, M. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffinembedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 223-229, 2003.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Internal Journal of Experimental Pathology**, v. 82, p. 249-267, 2001.

NOGUEIRA, M. F.; SOTTO, M. N.; CUCÉ, L. C. American tegumentary leishmaniasis: Langerhans cells in Montenegro skin test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 5, p. 283-286, 2008.

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

OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1318-1322, 2006.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F.; NASCIMENTO, J. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A.; ANDRADE Jr., H. F.; MALAFRONTTE, R. S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, p. 252-259, 2006.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs.

Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; VLEMMAS, J.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p. 227-237, 2005.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; Del REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infectology and Immunology**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J. P.; RUTTEN, V. P. M. G., GEBHARD, D., del REAL, G.; RUITENBERG, E. J. *Leishmania infantum* - specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex restricted manner. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 1594-1600, 1995.

PINELLI, E.; van der KAAIJ, S. Y.; SLAPPENDEL, R.; RUITENBERG, E. J.; BERNARDINA, W.; RUTTEN, V. P. Detection of canine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, n. 2-4, p. 121-126, 1999.

QUEIROZ, N. M. de; DA SILVEIRA, R. C.; DE NORONHA JR., A. C.; OLIVEIRA, T. M.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; SHAW, M. A.; DYE, C.; DAY M. J.; KAYE, P. M. Tissue cytokine response in canine visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1421-1424, 2001.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; RAMOS, P.; KAYE, PM; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 10, p. 161-168, 2003.

QUINNEL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir host and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p. 1915-1934, 2009.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; GUERRA, L. L.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, p. 303-311, 2006a.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 102–116, 2006b.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 87-95, 2009.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 214-240.

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 3, n. 11, p. 13-14, 1997.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; FERNÁNDEZ-BELLÓN, H.; RAMIS, A.; FERRER, L.; ALBEROLA, J.; SOLANO-GALLEGO, L. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, n. 3-4, p. 190-198, 2007a.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMÓN, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.; ALBEROLA, J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 6, p. 683-693, 2007b.

ROSS, R. Further notes on leishman's bodies. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1401, 1903.

ROURA, X.; SÁNCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, v. 144, n. 10, p. 262-264, 1999.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clinica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RUBEIRO, A. A.; PAIVA, H. M.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinarian Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SANTOS, W. L. C.; DAVID, J.; BADARÓ, R.; de FREITAS, L. A. R. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 94, p. 84-94, 2004.

SANTOS, W. L. C. dos; JESUS, E. E.; PARANHOS-SILVA, M.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, J. C.; BALEIRO, C. O.; NASCIMENTO, E. G.; MOREIRA, E. D.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTES-de-CARVALHO, L. C. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 251-259, 2008.

SARAIVA, L.; CARVALHO, G. M.; GONTIJO, C. M.; QUARESMA, P. F.; LIMA, A. C.; FALCÃO, A. L. ANDRADE FILHO, J. D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: *Psychodidae*) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 1159-1163, 2009.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F.; OLIVRY, T.; DUNSTON, S. M.; FARMAKI, R.; KOUTINAS, C. K.; PETANIDES, T. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, v. 18, p. 227-233, 2007.

SCOTT, D. W.; WILLIAM, H. M.; GRIFFIN, G. E. Viral, rickettsial and protozoal skin disease. In:_____. **Müller & Kirk's: small animal dermatology**. 6. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001. p. 517-542.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, n. 5, p. 577-579, 2006.

SHIN, T.; WEINSTOCK, D.; CASTRO, D. M.; ACLAND, H.; WALTER, M.; kim, H. Y.; PURCHASE, H. G. Immunohistochemical study of constitutive neuronal and inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of goat with natural listeriosis. **Journal of Veterinary Science**, v. 1, p. 77-80, 2000.

SILVA, E. S.; ROSCO, E. H.; ARRUDA, L. Q.; GONTIJO, C. M. F.; PAHECO, R. S.; BRAZIL, R. P. Leishmaniose Visceral Canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 23, p. 111-116, 2001.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE CASTRO GOMES, C. M.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 1, p. 55-60, 2003.

SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Inducible nitric oxid synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 247-254, 2001.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. **The Veterinary Quarterly**, v.10, n.1, p.1-16, 1988.

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 450-458.

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 450-458.

SOARES, M. R. A.; MENDONÇA, I. L.; BONFIM, J. M.; RODRIGUES, J. A.; WERNEK, G. L.; COSTA, C. H. N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica**, v. 117, p. 6-9, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMIS, A.; FERNADÉZ-BELLON, H.; RODRÍGUEZ, A.; FERRER, L.; ALBEROLA, J. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 6, p. 815-818, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

STENGER, S.; DONHAUSER, N.; THRÜRING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, p. 1501-1514, 1996.

SWENSON, C. L.; SILVERMAN, J.; STROMBERG, P. C.; JOHNSON, S. E.; WILKIE, D. A.; EATON, K. A.; KOCIBA, G. J. Visceral leishmaniasis in an English Foxhound from an Ohio research colony. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 9, p. 1089-1092, 1988.

TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. R. de; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 203-212, 2001.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 735-747, 2002.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSÓRIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p. 119-124, 2001.

TRAVI, B. L.; FERRO, C.; CADENA, H.; MONTROYA-LERMA, J.; ADLER, G. H. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sandflies from non-endemic areas. **Research in Veterinary Science**, v. 72, p. 83-86, 2002.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to *leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229-242, 2007.

TROTZ-WILLIAMS, L.; GRADONI, L. Disease risks for the travelling pet: Leishmaniasis. **In Practice**, v. 25, n. 4, p. 190-197, 2003.

TSUNAWAKI, S.; SPORN, M.; DING, A.; NATHAN, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. **Nature**, v. 334, p. 260-262, 1988.

VERÇOSA, B. L.; LEMOS, C. M.; MENDONÇA, I. L.; SILVA, S. M.; de CARVALHO, S. M.; GOTO, H.; COSTA, F. A. Transmission potential, skin inflammatory response and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 45, 2008.

XAVIER, S. C.; ANDRADE, H. M.; MONTE, S. J. H.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 17, 2006. Doi 10.1186/1746-6148-2-17. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/17>>. Acesso em: 05 jun. 2013.

ZAFRA, R.; JABER, J. R.; PÉREZ-ECIJA, R. A.; BARRAGÁN, A.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; PÉREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 353-359, 2008.

WERNECK, G. L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.

WOLSCHRIJN, C. F.; MEYER, H. P.; HAZEWINDEL, H. A. W.; WOLVEKAMP, W. Destructive polyarthritis in a dog with leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, n. 12, p. 601-603, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2012. Disponível em: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en. Acesso em: 06 maio 2013.