

# **Françoise Pereira Sanches**

**Leishmaniose visceral canina: caracterização das alterações histológicas de pele, linfonodo e baço e, a correlação do parasitismo tecidual com a expressão do iNOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora:

Profa. Dra Márcia Dalastra Laurenti

São Paulo

2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sanches, Françoise Pereira

Leishmaniose visceral canina : caracterização das alterações histológicas de pele, linfonodo e baço e, a correlação do parasitismo tecidual com a expressão do iNOS / Françoise Pereira Sanches. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Márcia Dalastra Laurenti.

***Dedicatória***

---

**Ao meu querido pai Francisco (em memória),**

*Pelo exemplo de honestidade, caráter, ética, e por todo seu esforço e incentivo,  
que me permitiram concluir mais esta etapa da minha vida. Dedico este trabalho a  
ti, meu pai*

***Agradecimientos***

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, minha orientadora de mestrado, pela confiança no desenvolvimento deste projeto, pela oportunidade do aprendizado e pela realização de um grande sonho. Não há palavras para expressar toda a minha gratidão. Obrigada de coração por toda a amizade, paciência, compreensão, conselhos, gentileza, simplicidade e carinho. Aprendi muito com seus ensinamentos, não apenas técnicos, mas de humildade e sabedoria.

À minha família, que é o alicerce da minha vida. Meus queridos pais, Laura Pereira Sanches e Francisco Sanches Soares (em memória). À minha irmã Drú, por todo apoio e amizade. Ao Deco, por todo companherismo, apoio, paciência, incentivo, palavras doces nos momentos difíceis e também alegres. Aos meus dois filhotes de quatro patas, Olive e Bó, que ficaram ao meu lado durante todo o tempo dedicado a este projeto - amor incondicional. Amo todos vocês.

Ao Prof. Luiz Felipe Domingues Passero, por todo carinho, paciência, por compartilhar seus conhecimentos, pela humildade e dedicação à ciência. Agradeço-lhe pela ótima recepção junto ao LIM-50, pelo bom humor, pelas palavras inteligentes e pelo senso de justiça constante, o que o torna esse grande ser humano.

Ao amigo Prof. Márcio Moreira, exemplo de médico veterinário e amor pelos animais, que me apresentou à Prof<sup>a</sup> Dra Márcia Dalastra Laurenti– não tenho palavras por toda a minha gratidão.

Aos amigos e funcionários do LIM-50, Lia Negrão, Dra. Claudia Gomes, Dra. Vânia da Matta e Edson Tadeu.

À Thaise Yumi Tomokane, técnica do LIM-50, por toda contribuição na execução deste trabalho. Muito obrigada.

Ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), do município de Araçatuba (SP), por autorizar a seleção dos animais para este projeto.

Aos Professores que participaram da banca do Exame de Qualificação do Mestrado, Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira, Prof. Dr. Luiz Felipe Passero e Prof. Dr. José Ângelo Lindoso.

Aos novos colegas que encontrei no LIM-50, especialmente Ana Kely, Bruno, Carol, Edu, Fábio, Fernandinha e Mari.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da FMUSP, especialmente à Tânia, bem como aos bibliotecários dessa Faculdade, em especial à Valéria, pela ajuda para com a ficha catalográfica.

Ao meu querido amigo Ossamuro Umehara – meu guru e exemplo de sabedoria oriental, paciência e amor à Medicina Veterinária – minha eterna gratidão.

À minha querida amiga Mariana Bas – pela amizade, apoio, senso de humor, e enorme ajuda para com a revisão final desta dissertação. Muito obrigada por todo carinho e amizade.

À médica veterinária Dra. Márcia Teixeira pela enorme colaboração e paciência na revisão final deste trabalho.

Ao meu gestor da Novartis Saúde Animal, Gustavo Tesolin, pela compreensão para com a concretização deste trabalho, pelas palavras certas nos momentos mais difíceis, por toda paciência, motivação e amizade - a minha admiração e gratidão.

Aos animais que deram a vida a este trabalho – meu eterno respeito e gratidão.

E a todas as pessoas que estiveram presentes, compartilhando deste momento tão especial. Muito obrigada!

***“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.  
Não na vitória propriamente dita.”***

Mahatma Gandhi



## ***Lista De Abreviaturas***

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-IgG:	Anti-imunoglobulina G
Anti-iNOS2:	Anti- Óxido Nítrico Sintetase Indusível 2
CD21:	Grupamento de Diferenciação 21
CD4:	Grupamento de Diferenciação 4
CD8:	Grupamento de Diferenciação 8
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
DO:	Densidade Óptica
ELISA:	Enzima imunoensaio
FOXP3:	<i>Forkhead Box P3</i>
HE:	Hematoxilina-eosina
IFN- $\gamma$ :	Interferon gama
IgG:	Imunoglobulina G
IHQ:	Reação de imunoistoquímica
IL-10:	Interleucina 10
IL-2:	Interleucina 2
IL- $\beta$ :	Interleucina beta
iNOS:	Óxido Nítrico Sintetase Indusível
L.:	<i>Leishmania</i>
LCAD:	Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa
LCDB:	Leishmaniose Cutânea Disseminada <i>Borderline</i>

LCL:	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCM:	Leishmaniose Cutânea Mucosa
LPS:	Lipopolissacarideo
LV:	Leishmaniose Visceral
LVA:	Leishmaniose Visceral Americana
LVC:	Leishmaniose Visceral Canina
NO:	Óxido Nítrico
PBS:	Tampão Fosfato Salino
PMN:	Células Polimorfonucleares
r-IFN- $\gamma$ :	Interferon Gama recombinante
SFM:	Sistema Fagocitário Mononuclear
TGF- $\beta$ :	Fator de Transformação do Crescimento beta
Th1:	Células T auxiliares 1
Th2:	Células T auxiliares 2
TNF- $\alpha$ :	Fator de Necrose Tumoral Alfa

***Resumo***

---

## RESUMO

SANCHES, FP. *Leishmaniose visceral canina: caracterização das alterações histológicas de pele, linfonodo e baço e, a correlação do parasitismo tecidual com a expressão do iNOS*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar as alterações histológicas de pele, linfonodo e baço, determinar a densidade de parasitas e de células iNOS<sup>+</sup>, assim como correlacionar o parasitismo com a expressão de iNOS em pele, baço e linfonodo de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. Foram selecionados aleatoriamente, 28 cães infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba, os quais foram distribuídos em dois grupos, de acordo com sinais clínicos e exames laboratoriais, em sintomáticos (n=18) e assintomáticos (n=10). Um grupo de 6 animais oriundos de área não endêmica para leishmaniose visceral foram empregados como controle negativo. As alterações histológicas de pele foram similares em ambos os grupos clínicos, sintomáticos e assintomáticos, e se caracterizaram por um infiltrado inflamatório na derme, formado por células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), que variou de discreto a intenso. No linfonodo, as alterações histológicas foram também semelhantes entre os grupos clínicos, e se caracterizaram por hiperplasia e hipertrofia da área cortical e para-cortical, que variou de discreta a intensa; e por hiperplasia e hipertrofia de macrófagos na região medular, caracterizando em muitos casos uma linfadenite granulomatosa. No baço, alterações histológicas da polpa branca e polpa vermelha foram similares entre os grupos sintomáticos e assintomáticos, com hipoplasia e atrofia de polpa branca e hipertrofia e hiperplasia de macrófagos na polpa vermelha, variando de moderado a intenso. Quanto ao número de formas amastigotas/mm<sup>2</sup> tanto na pele, como no linfonodo e baço, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos clínicos ( $p=0,2104$ ), ( $p=0,2401$ ) e ( $p=0,8869$ ), respectivamente. Em relação à densidade de células iNOS<sup>+</sup>(células/mm<sup>2</sup>), observamos que a infecção por *Leishmania* levou ao aumento do número destas células na pele, no baço e no linfonodo em relação ao controle ( $p<0,05$ ). Porém, quando analisamos a densidade de células iNOS<sup>+</sup> entre os grupos clínicos, sintomáticos e assintomáticos, não observamos diferença significativa tanto na pele ( $p=0,3026$ ), como em linfonodo ( $p=0,3257$ ) e baço ( $p=0,5940$ ). Observou-se correlação fraca e não significativa entre a densidade de parasitas e a densidade de células expressando iNOS<sup>+</sup> no tegumento; porém no linfonodo, verificou-se correlação negativa moderada e significativa ( $p=0,0034$ )

entre o parasitismo e a expressão de células iNOS<sup>+</sup>, assim como no baço ( $p=0,0329$ ), sugerindo que o óxido nítrico deve exercer um papel importante no controle do parasitismo em vísceras.

Descritores: Leishmaniose visceral canina. Pele. Baço. Linfonodo. Histologia. Imunidade celular. Óxido nítrico.

***Abstract***

---

## ABSTRACT

SANCHES, FP. *Canine visceral leishmaniasis: characterization of histologic alterations of skin, lymph nodes and spleen, and correlation of tissue parasitism with the expression of iNOS*. [Dissertation]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of Sao Paulo: 2013.

The present study aimed the characterization the histological features in skin, lymph nodes and spleen; determination of the parasitism density and the cells expressing iNOS; and correlation between the parasitism and the expression of iNOS in the skin, lymph nodes and spleen of dogs naturally committed by visceral leishmaniasis. Twenty-eight naturally infected dogs by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* were selected randomly from the Zoonosis Control Center of Araçatuba municipality and distributed in two groups according to the clinical signs and laboratory exams, symptomatic (n=18) and asymptomatic (n=10) animals. A group of six animals from non-endemic region for visceral leishmaniasis was used as negative control. Histological changes in skin were similar in both clinical groups, symptomatic and asymptomatic, and were characterized by a focal and diffuse inflammatory infiltrate in the dermis of mononuclear cells (macrophages, lymphocytes, plasmocytes), that varied from discrete to intense. In lymph nodes, the histological changes were also similar in both clinical groups, and were characterized by hyperplasia and hypertrophy of the cortical and para-cortical area, that varied from discrete to intense; and hyperplasia and hypertrophy of macrophages in the medullar region characterizing in many cases a granulomatous lymphadenitis. In spleen, the histological alterations in the white pulp and red pulp were similar in both clinical groups, with hypoplasia and hypotrophy of the white pulp and hypertrophy and hyperplasia of macrophages in red pulp varying from moderate to intense. Regarding the results of parasitism density (amastigotes/mm<sup>2</sup>), we did not observe any significant difference between the clinical groups in skin ( $p=0.2104$ ), lymph nodes ( $p=0.2401$ ) and spleen ( $p=0.8869$ ). Concerning to the density of iNOS<sup>+</sup> cells, we observed that the infection by *Leishmania* caused an increase in the number of these cells in the skin, in spleen and lymph nodes in relation to the control group ( $p<0.05$ ). However, when we analyzed the density (cells /mm<sup>2</sup>) of iNOS<sup>+</sup> expressing cells in clinical groups, symptomatic and asymptomatic, we did not observe any significant difference in the skin ( $p=0.3026$ ), in lymph nodes ( $p=0.3257$ ) and spleen ( $p=0.5940$ ). A weak and non-significant correlation was observed between the



parasite density and the density of iNOS<sup>+</sup> cells in the skin. However, in the lymph node a significant and moderate correlation ( $p=0.0034$ ) was observed between the parasitism and iNOS<sup>+</sup> cells, as well as in the spleen ( $p=0.0329$ ), suggesting that nitric oxide plays an important role in the control of the parasitism in the viscera.

Descriptors: Canine visceral leishmaniasis. Skin. Spleen. Lymph nodes. Histology. Cellular immunity. Nitric oxid.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Corte histológico da pele de cão com leishmaniose visceral mostrando infiltrado inflamatório mononuclear perianexal na derme (A) e o intenso parasitismo em meio ao infiltrado linfohistioplasmocitário (B) (HE). A Figura 1C mostra o percentual da intensidade do processo inflamatório e do parasitismo na derme, onde 0 (-) representa negativo, 1 (+) discreto, 2 (++) moderado e 3 (+++) intenso.....26**
- Figura 2 - Corte histológico do linfonodo de cão com leishmaniose visceral mostrando ativação folicular na região cortical (A) e hiperplasia e hipertrofia de macrófagos na área medular (B) (HE). A Figura 2C mostra o percentual da intensidade da hiperplasia/hipertrofia da cortical, paracortical, medular e a intensidade do parasitismo no linfonodo poplíteo, onde 0 (-) representa negativo, 1 (+) discreto, 2 (++) moderado e 3 (+++) intenso .....28**
- Figura 3 – Corte histológico do baço de cão com leishmaniose visceral mostrando hiperplasia folicular na polpa branca (A) e hiperplasia e granulomas epitelióides com a presença de células gigantes na polpa vermelha (B) (HE). A Figura 2C mostra o percentual da intensidade da hiperplasia/hipertrofia da polpa branca e da polpa vermelha e a intensidade do parasitismo no baço, onde 0 (-) representa negativo, 1 (+) discreto, 2 (++) moderado e 3 (+++) intenso.....30**
- Figura 4 – Fotomicrografia demonstrativa da presença de formas amastigotas do parasita detectadas pela técnica de imunoistoquímica na pele de cão sintomático (A) e assintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP) .....32**
- Figura 5 – Fotomicrografia demonstrativa da presença de formas amastigotas do parasita detectadas pela técnica de imunoistoquímica no linfonodo de cão sintomático (A) e assintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP).....34**

- Figura 6 – Fotomicrografia demonstrativa da presença de formas amastigotas do parasita detectadas pela técnica de imunistoquímica no baço de cão sintomático (A) e assintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP) .....36**
- Figura 7 - Fotomicrografia demonstrativa da presença do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral assintomático (A) ou sintomático (B) oriundos do município de Araçatuba (SP) .....38**
- Figura 8 - Fotomicrografia demonstrativa da presença do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunistoquímica no linfonodo de cães com leishmaniose visceral assintomático (A) ou sintomático (B) oriundos do município de Araçatuba (SP) .....40**
- Figura 9 - Fotomicrografia demonstrativa da presença do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunistoquímica no baço de cães com leishmaniose visceral assintomático (A) ou sintomático (B) oriundos do município de Araçatuba (SP) .....42**

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, do número de formas amastigotas detectadas pela técnica de imunistoquímica na pele de pavilhão auricular de cães com leishmaniose visceral assintomáticos e sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP) .....31**
- Gráfico 2 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, de parasitas detectados pela técnica de imunistoquímica no linfonodo poplíteo de cães com leishmaniose visceral assintomáticos e sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP) .....33**
- Gráfico 3 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, de parasitas detectados pela técnica de imunistoquímica no baço de cães com leishmaniose visceral assintomáticos e sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP).....35**
- Gráfico 4 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunistoquímica na pele de cães controle e com leishmaniose visceral assintomáticos ou sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP) .....37**
- Gráfico 5 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunistoquímica no linfonodo de cães controle e com leishmaniose visceral assintomáticos e sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP) .....39**

**Gráfico 6 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunistoquímica no baço de cães controle e com leishmaniose visceral assintomáticos e sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP) .....41**

**Gráfico 7 – Representação gráfica de correlação entre a densidade de parasitas e a densidade de células iNOS<sup>+</sup> na pele (A), no linfonodo (B) e no baço (C) de cães assintomáticos e sintomáticos com leishmaniose visceral oriundos do município de Araçatuba (SP).....43**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 DOENÇAS COEXISTENTES NO CÃO COM LEISHMANIOSE VISCERAL         CANINA .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS NA LEISHMANIOSE         VISCERAL CANINA.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 PATOGENIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 RESPOSTA IMUNE NO CÃO COM LEISHMANIOSE VISCERAL .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6 PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 GERAL .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 ESPECÍFICOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 POPULAÇÃO CANINA.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE         VISCERAL CANINA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA PELE, LINFONODO E BAÇO.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 IMUNOISTOQUÍMICA EM TECIDO PARAFINADO PARA DETECÇÃO DE         PARASITAS EM FRAGMENTOS DE PELE, LINFONODO E BAÇO DE CÃO. ....</b>	<b>21</b>
<b>3.6 IMUNOISTOQUÍMICA EM TECIDO PARAFINADO PARA DETECÇÃO DE         CÉLULAS iNOS+ EM FRAGMENTOS DE PELE, LINFONODO E BAÇO DE         CÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>3.7 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE PARASITOS E CÉLULAS iNOS+ .....</b>	<b>22</b>
<b>3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>22</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO, PARASITOLÓGICO E SOROLÓGICO .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA PELE, LINFONODO E BAÇO.....</b>	<b>24</b>

<b>4.3 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTAS .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS INOS+ EM PELE, LINFONODO E BAÇO .....</b>	<b>36</b>
<b>4.5 CORRELAÇÃO ENTRE PARASITISMO TECIDUAL E EXPRESSÃO DE CÉLULAS iNOS+ EM FRAGMENTOS DE PELE, LINFONODO E BAÇO .....</b>	<b>42</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>57</b>
<b>7.1 ANEXO A – Aprovação CEP-FMUSP .....</b>	<b>57</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

## ***Introdução***

---



## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas um complexo de doenças, de caráter zoonótico, que acometem o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos. Estas doenças são causadas por protozoários digenéticos, do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. O seu ciclo biológico ocorre em dois hospedeiros, sendo um vertebrado, que inclui uma variedade de mamíferos, entre eles os canídeos, marsupiais, roedores e os primatas; e o outro um invertebrado, que são insetos pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phebotominae, gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Há mais de 20 espécies de *Leishmania*, que podem ser transmitidas aos humanos por 30 espécies de diferentes flebotomíneos (Pearson e Steigbigel, 1996). A leishmaniose permanece ainda como um severo problema de saúde pública (Desjeux, 2004) e, é considerada a terceira infecção mais importante do grupo das doenças causadas por vetores, depois da malária e da filariase linfática (Solano-Gallego et al., 2009). Atualmente, estimam-se que 12 milhões de pessoas, em 88 países, estejam infectadas e, a cada ano, um a dois milhões de novos casos humanos são registrados, dos quais 500.000 casos são identificados como leishmaniose visceral, de acordo com World Health Organization (WHO, 2011). A infecção por *Leishmania* manifesta-se sob duas formas clínicas principais, a visceral e a tegumentar, dentre as formas tegumentares podem ser caracterizadas a forma cutânea localizada (LCL), cutânea mucosa (LCM), cutânea disseminada *borderline* (LCDB) e cutânea anérgica difusa (LCAD) (Silveira et al., 2004; Silveira et al.; 2005). A leishmaniose visceral é a forma mais severa da doença, na qual os órgãos vitais são afetados (WHO, 2012), e quando não tratada, torna-se fatal; estima-se, anualmente, 59.000 casos de mortes por esta doença (Desjeux, 2004).

De acordo com a região geográfica, são identificados três agentes etiológicos causadores da doença: *Leishmania (L.) chagasi* nas Américas, *Leishmania (L.) donovani* na África e Ásia e *Leishmania (L.) infantum* na Europa, Ásia e África (Cunha e Chagas, 1937; Lainson e Shaw, 1987; Marzochi et

al.,1994). Embora haja várias discussões entre os pesquisadores, Shaw (2006) sugere, de acordo com a *International Commission on Zoological Nomenclature* 1999, o uso do nome *Leishmania (L.) infantum chagasi* para o parasita presente na América Latina, devido à ausência de diferenças entre subespécies de *L. infantum* e *L. chagasi*.

A leishmaniose visceral é o maior problema de saúde pública, particularmente no Brasil, onde 2000 a 3000 casos são reportados por ano (Courtenay et al., 2002). Observou-se um crescimento da enfermidade nas grandes cidades, desde a década de 1980, na qual a doença tem se tornado endêmica e epidêmica, resultando em um aumento contínuo dos casos de leishmaniose humana (Maia-Elkhoury et al., 2008). A doença tem emergido nos últimos anos associada ao aumento dos fatores de riscos tais como: alterações ambientais, migração humana e o *status* imunológico do hospedeiro (Desjeux, 2004; Dujardin, 2006).

As formas, humana e canina, da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ocorrem endemicamente em vários estados da região Norte, Nordeste, Centro-Oeste e na região Sudeste, nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (Yamamoto et al., 1988; Evans et al., 1990; Costa et al., 1991; Paranhos – Silva et al., 1996; Tafuri et al., 1996). Até 1998, não havia referência de casos autóctones de leishmaniose visceral no homem ou no cão no estado de São Paulo. Em maio de 1998, foi detectado um foco de leishmaniose visceral canina (LVC) no município de Araçatuba, localizado na região Noroeste do estado de São Paulo (Luvizotto et al., 1999). Posteriormente, verificou-se que a leishmaniose visceral canina (LVC) ocorria de forma endêmica, não só no referido município, mas também em municípios circunvizinhos. Segundo dados do centro de vigilância epidemiológica do estado de São Paulo, a doença canina encontra-se em processo de expansão com municípios acometidos próximos à capital paulista.

## 1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Na medicina veterinária, a leishmaniose causada pela *Leishmania (L.) infantum* é a mais importante entre os cães, e é uma das maiores zoonoses globalmente reconhecidas, a qual provoca uma doença severa e fatal nesta espécie (Solano-Gallego, 2009). O fato desta enfermidade apresentar maior prevalência na população canina do que na humana, deve-se à constatação de que os casos humanos são precedidos dos caninos (Deane e Deane, 1955; Lainson e Shaw, 1987; Santa Rosa e Oliveira, 1997).

Os cães (*Canis familiaris*) são considerados os principais reservatórios domésticos, e o parasitismo na pele destes animais está associado à transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* para humanos (Queiroz et al., 2011). Estes animais podem ser infectados por diferentes espécies do parasita, sendo que a mais importante das espécies é a *L. (L.) infantum chagasi*. O período de incubação é muito variável, podendo se estender de três meses até sete anos (Slappendel e Ferrer, 1998).

Estudos recentes indicam que a LVC tem se expandido para áreas não endêmicas, como é o caso de regiões do Norte da Itália (Otranto, 2009), Sul do Brasil (Tomaz-Soccol et al., 2009) e Norte da Argentina (Salomón, 2008). Confirmou-se também a presença do vetor *L. longipalpis* em Bella Unión, no Uruguai (Salomón, 2011), área até então considerada não-endêmica. Estes achados confirmam que o vetor está, de fato, colonizando as áreas de fronteira Uruguai-Argentina-Brasil, e indicam potencial de risco para cães e humanos que vivem nestas regiões. O estabelecimento da LVC em novas áreas geográficas está associado ao aumento do movimento de cães infectados, sejam eles adotados de áreas endêmicas ou que viajaram para as mesmas, além de populações suscetíveis à doença.

Em região endêmica para a doença, nem todos os cães que são infectados com o parasita pela fêmea do flebotomíneo desenvolvem a enfermidade (Berrahal et al., 1996). Deve-se levar em consideração que muitos cães permanecem assintomáticos após a infecção, mas em alguns casos, são capazes de transmiti-lo

parasita, assim como também, aqueles cães que desenvolvem os sintomas da LVC (Reis et al., 2010). Laurenti et al. (2013) através do xenodiagnóstico, mostraram que cães assintomáticos são importantes fontes de infecção de maior potencial para o vetor que os animais sintomáticos.

O Brasil é considerado o país com o maior registro de LVC nas Américas (WHO, 2008). Desde a década de 80, o número de casos em humanos tem aumentado, tornando-se uma doença endêmica e epidêmica (Maia-Elkhoury et al., 2008). O programa de controle brasileiro foca na eliminação massiva de cães soropositivos (Moreira et al., 2004); embora a eficácia da eutanásia, como medida de controle para a prevenção da LVA, seja contraditória (Courtenay et al., 2002; Nunes et al., 2008).

## **1.2 DOENÇAS COEXISTENTES NO CÃO COM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Infecções e parasitoses, tais como: erliquiose, babesiose, espirocercose, demodicose, hepatozoonoses, dirofilariose, anaplasnose, entre outras, são exemplos de doenças coexistentes com a leishmaniose visceral no cão (Mylonakis et al., 2008); além das doenças imuno-mediadas como o pênfigo foliáceo e lupus eritematoso sistêmico; doenças endócrinas como o hipotireoidismo e várias neoplasias (Saridomichelakis, 2009).

Em áreas endêmicas, além dos casos de LVC na rotina da clínica veterinária, nota-se também a presença das doenças coexistentes, devido às condições de manejo, animais idosos e a imunossupressão provocada pela LVC. Por sua vez, a supressão da imunidade celular, causada pela leishmaniose, pode aumentar a suscetibilidade desses cães ao contato com novos patógenos ou infecções latentes, como: *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum* e *Demodex canis* (Gaskin et al., 2002; Ferrer, 2004; Cringoli et al.; 2002; Mozos et al., 1999). Por outro lado, estas doenças coexistentes no cão, podem torná-lo mais suscetível

a infecção por *Leishmania*, permitindo desta forma, a multiplicação do parasito e aumentando os níveis de anticorpos e o desenvolvimento da doença (Gradoni et al, 2005; Miranda et al., 2008; Ferrer, 2004; Cringoli et al., 2002).

A erliquiose e a leishmaniose são as maiores doenças causadas por vetores em cães e, com ampla distribuição mundial. Ambos agentes infecciosos são patógenos intra-celulares, que se utilizam de macrófagos como células hospedeiras. Disseminam-se da pele do hospedeiro para o baço, fígado e medula óssea e, ativam mecanismos imunológicos do hospedeiro, com objetivo de induzir respostas imunopatológicas (Mekuzas et al., 2008). Os sinais clínicos da LVC e erliquiose canina são muito parecidos tais como: fraqueza, letargia, anorexia, perda de peso, epistaxe, febre, mucosas pálidas, enfartamento de linfonodos, esplenomegalia e alterações oculares (Atanaskova et al., 2011). Embora a *Ehrlichia canis* seja transmitida por carrapatos, principalmente pelo *Boophilus Rhipicephalus sanguineus* e, a *Leishmania (L.) infantumchagasi* por flebotomíneos, de acordo com Dantas-Torres et al., (2010), o DNA de *L. infantum* foi encontrado em glândula salivar do carrapato do cão *Rhipicephalus sanguineus*. Sendo assim, é de extrema importância avaliar rotineiramente cães com suspeita de leishmaniose para outras infecções parasitárias em áreas endêmicas, principalmente, em cães idosos e, casos com quadro clínico atípico (Ferrer, 2004).

### **1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

De acordo com Baneth et al.,(2008), as manifestações clínicas da LVC podem variar muito, como consequência dos numerosos mecanismos patogênicos da doença, assim como, a diferença dos órgãos afetados e a diversidade da resposta imune individual de cada hospedeiro.

Reis et al., (2010) afirma que o curso natural da LVC depende de vários fatores entre eles: carga parasitária, imunidade celular, subconjunto de células

local, resposta humoral e a expressão de citocinas. A importância desses fatores em cada indivíduo, e o diferente equilíbrio estabelecido entre eles, resulta na aparência da dinâmica do espectro das manifestações clínicas, que vão desde animais assintomáticos resistentes à severidade da doença em animais naturalmente infectados, os quais são suscetíveis. Além do mais, estes parâmetros tem valores para o progresso da infecção.

Cães com leishmaniose visceral podem apresentar um amplo espectro de sinais clínicos, entre eles: lesões cutâneas, onicogribose, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, perda de peso, atrofia muscular, intolerância a exercícios, diminuição do apetite, letargia, poliúria e polidipsia, lesões oculares, epistaxe, vômito e diarreia (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999; Baneth et al., 2008; Feitosa, 2000). As lesões de pele caracterizam-se, principalmente, por descamação, alopecia, dermatite pustular, dermatose ulcerativa e doença nodular, a qual depende da resposta imune do hospedeiro (Adler e Theodor, 1931; Cunha, 1938; Torres, 1941; Ferrer et al., 1988). A LVC está associada com a alta prevalência de doença renal crônica (Costa et al., 2003), daí a necessidade de se avaliar a função renal, de acordo com *International Renal Interest Society* (IRIS, 2006). Desta forma, a doença renal pode ser a única manifestação clínica da LVC, podendo progredir de uma leve proteinúria até a síndrome nefrótica ou estágio final da doença renal (Solano-Gallego et al., 2009).

Aproximadamente 60-80% dos cães podem ter contato com o parasita, mas não demonstrarem sinais clínicos característicos da doença. Porém, apresentam títulos de anticorpos específicos ou resposta imune mediada por células. Convém ressaltar, no entanto, que a porcentagem de cães resistentes à enfermidade não está totalmente estabelecida (Ferrer, 1999).

Alguns cães após a infecção desenvolvem uma resposta imune efetiva mediada por linfócitos T específicos, com produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 entre outras citocinas (Pinelli et al., 1994). Esses animais não demonstram qualquer sinal clínico da doença ou podem apenas desenvolver nódulos cutâneos no ponto de inoculação. A reação tecidual nestes locais é designada como “cancro

deinoculação” e, são usualmente localizadas no nariz ou nas orelhas. Estas lesões podem apresentar-se com diâmetros de 1-3 cm, alopecicas, ulceradas e, às vezes, com crostas, não pruriginosas, pouco dolorosas e, geralmente, desaparecem espontaneamente entre um a seis meses (Ferrer, 1999).

As alterações histopatológicas viscerais encontradas na LVC são similares às descritas na doença humana (Keenan et al., 1984a), embora as lesões cutâneas estejam presentes nos cães, muitas vezes, em caráter intenso, o que não ocorre na doença humana.

Os órgãos linfóides são os principais alvos na doença. Os linfonodos encontram-se frequentemente enfartados, com perilinfoadenite, hipertrofia dos cordões e dos folículos, intensa fibrose, seios dilatados e hiperplasia de macrófagos (Alencar, 1959). Também foram observadas, população reduzida de linfócitos e proliferação de macrófagos nas áreas paracorticais e cordões medulares, hiperplasia folicular e plasmocitose intensa (Keenan et al., 1984a; Corbett, et al., 1992).

A esplenomegalia muitas vezes não está presente, ou pode ser discreta, moderada ou intensa (Alencar, 1959). Outra alteração frequentemente encontrada é periesplenite. Este órgão apresenta uma diminuição de linfócitos na bainha linfóide periarteriolar e proliferação de macrófagos nesta região; hiperplasia folicular e aumento da polpa vermelha com agregados de macrófagos e plasmócitos (Keenan et al., 1984a; Badaró e Duarte, 1996; Tafuri et al., 2001).

Na medula óssea, há maior celularidade decorrente da proliferação de macrófagos que podem, ou não, conter parasitas (Keenan et al., 1984a). A hipoplasia medular, pode também ser observada, principalmente de células brancas associada à identificação de macrófagos parasitados (Tafuri et al., 2001).

O fígado, geralmente, encontra-se aumentado de volume, apresentando um infiltrado plasmolinfocitário e hiperplasia das células de Kupffer (Keenan et al., 1984b), porém é raro o achado do parasita. Geralmente, também ocorre uma hepatite difusa, acompanhada de reação inflamatória exsudativa, com infiltrado linfoplasmocitário nos espaços portais (Badaró e Duarte, 1996; Tafuri et al., 2001).

Apesar da grande diversidade de sinais clínicos da LVC e do quadro histopatológico, existem animais aparentemente saudáveis e também aqueles que exibem sintomatologia característica de estágios finais da doença. A doença canina pode permanecer clinicamente inaparente por longos períodos (Longstaffe et al., 1983).

#### **1.4 PATOGENIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Pouco se sabe sobre a patogenia da leishmaniose em cães infectados naturalmente (Solano-Gallego et al., 2004), pois a maior parte dos estudos advém da infecção experimental em roedores por *Leishmania major*. Estes estudos analisam a relação entre a sobrevivência, multiplicação, disseminação, desenvolvimento das lesões e aspectos da imunidade humoral e celular (Belkaid et al., 2001; Kamhawi et al., 2000; Nicolas et al., 2000).

Uma vez que promastigotas metacíclicas são inoculadas na pele do cão, através da picada do vetor (Killick-Kendrick e Killick-Kendrick, 1999), ocorrem as primeiras interações com o sistema imune da pele, seguida das transformações em formas amastigotas, as quais serão transportadas por macrófagos infectados até os linfonodos regionais (Baneth, 2005; Slappendel e Ferrer, 1998).

O resultado da infecção depende de vários fatores, sejam eles, relacionados ao vetor (número de picadas do vetor no hospedeiro, saliva injetada na derme do hospedeiro) e/ou a virulência do parasita e hospedeiro (genética, resposta celular e humoral, citocinas e doenças concomitantes) (Bañus et al., 2007; Baneth, 2005; Moreno e Alvar, 2002; Gradoni, 2002; Rutten, 2003; Quinnell et al., 2003; Sanchez-Robert et al., 2005).

O parasita, por sua vez, tem mecanismos de escape, que o torna capaz de sobreviver e se multiplicar dentro do macrófago, sua célula hospedeira, e a partir daí, dissemina-se causando doença no hospedeiro vertebrado (Bañus et al., 2007). Estes mecanismos não só diferem entre as espécies de *Leishmania*, mas



também entre cepas, explicando parcialmente o polimorfismo clínico da leishmaniose em humanos e animais (Baños et al., 2007; Baker et al., 1999; Sundar e Rai, 2002).

As características genéticas do hospedeiro vertebrado também influenciam a resistência ou suscetibilidade à infecção por *Leishmania* (Baneth, 2005; Bourdoiseau et al., 1997; Ferrer, 2002). Há especulação de que cães que nascem e crescem em áreas endêmicas, tornam-se mais resistentes à infecção e apresentam títulos menores de IgG, quando comparados aos cães de áreas não-endêmicas inseridos em áreas endêmicas ainda jovens (Quinnell et al., 2003).

### **1.5 RESPOSTA IMUNE NO CÃO COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Os parasitas do gênero *Leishmania* podem infectar diferentes tipos de células, incluindo as células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), células dendríticas, fibroblastos, macrófagos, células de Kupffer, células endoteliais, neutrófilos, eosinófilos, hepatócitos e até células neoplásicas (células do tumor venéreo transmissível). Estes parasitas invadem todos os tecidos e órgãos do corpo, incluindo também o sistema nervoso central (Levy, et al.; 2006; Hervás-Rodriguez et al.; 1996; Binhazim et al.; 1993; Tafuri et al.; 2001; González et al.; 1988; Saint-André Marchalet et al.; 1997; Viñuelas et al.; 2001). Mas são as células do SFM que contribuem para a longa sobrevivência do parasita, especialmente os macrófagos, que são fagócitos mononucleares (Baneth, 2005).

A suscetibilidade e resistência à leishmaniose visceral dependem da resposta imune apresentada pelo cão, após uma infecção natural. De acordo com Reis et al. (2010), vários fatores tais como: carga parasitária, imunidade celular, resposta imune-humoral e citocinas exercem grande importância em cada indivíduo e, um equilíbrio entre todos estes fatores resulta no surgimento de um espectro de formas clínicas, as quais vão desde cães resistentes assintomáticos até a doença severa em animais suscetíveis. Além disso, esses parâmetros

possuem um valor no progresso da infecção e a partir daí, deveriam ser levados em conta como marcadores de resistência e suscetibilidade à leishmaniose canina.

De acordo com Saldarriaga et al., (2006), em infecções naturais, a disseminação do parasita do local de inoculação não é conhecido; entretanto, em infecções experimentais em cães, através de inoculação intradérmica de formas promastigotas de *L. donovani*, foi possível observar que após 96 horas, os parasitas já podem ser encontrados em linfonodos e baço. Entretanto, devem-se levar em consideração as características genéticas e da imunidade do hospedeiro, que será crucial para a disseminação do parasita. Assim, em cães suscetíveis, o parasita poderá se disseminar em horas, enquanto que em cães resistentes, poderá permanecer no ponto de inoculação, assim como em linfonodos regionais (Ferrer, 2002).

A resistência à infecção por *Leishmania* tem sido associada à estimulação de células T auxiliares 1 (Th1), enquanto que a suscetibilidade tem sido relacionada à ativação de células T auxiliares 2 (Th2) (Liew e O'Donnell, 1993). Numa população de cães infectados por *Leishmania*, de 10 a 50% dos animais, mostram-se resistentes à infecção, ou seja, não desenvolvem a doença ou a mesma se resolve espontaneamente (Slappendel e Greene, 1990; Lanotte et al., 1979; Abranches et al., 1991; Cabral et al., 1992; Martinez-Moreno et al., 1995). A resistência à infecção por *Leishmania* está associada à ativação de células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, as quais são responsáveis pelo controle do desenvolvimento da sintomatologia clínica (Pinelli et al., 1994; Pinelli et al., 1995). O principal mecanismo efetor na proteção da resposta imune de cães infectados com *L. (L.) infantum*, é a ativação dos macrófagos por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que atua na eliminação das formas amastigotas intracelulares, através da produção de óxido nítrico (NO) (Vouldoukis et al., 1996).

De acordo com Reis et al., (2010), um aumento nos níveis dos parâmetros, tais como uma proliferação de células polimorfonucleares (PMN) após a estimulação antigênica, proliferação de células CD4+, CD8+ e células B,

expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , ou o teste intradérmico positivo (DTH) estão correlacionados à resistência. Segundo Manna et al.(2008) o aumento dos níveis de IFN- $\gamma$ , podem contribuir para a cura de casos clínicos de LVC. Entretanto, alguns estudos demonstram que não há diferença na expressão de IFN- $\gamma$  entre cães assintomáticos e sintomáticos (Quinnell et al., 2001; Correa et al., 2007; Lage et al., 2007).No entanto, altas concentrações de IFN- $\gamma$ , podem estar associadas ao aumento da carga parasitária e a manifestação clínica em cães suscetíveis (Sanchez-Robert et al., 2008; Travi et al., 2009).

A ausência de uma adequada resposta de células T para controlar o parasita, leva ao surgimento de sintomas clínicos, aumento no título de anticorpos específicos anti-*Leishmania* e uma alta carga parasitária na pele, medula óssea, baço, fígado e linfonodos (Reis et al., 2006; Giunchetti et al., 2006; Giunchetti et al., 2008; Guerra et al., 2009; Reis et al., 2009).

Reis et al. 2009 sugere que a resposta imune na LVC é compartimentalizada, em cada órgão ou tecido pode ocorrer peculiaridades na relação hospedeiro-parasita. Cães sintomáticos apresentam infiltrado inflamatório dérmico com alta carga parasitária (Giunchetti et al., 2006) e uma resposta imune celular mista na pele (Menezes-Souza et al., 2011) Alta carga parasitária foi descrita em linfonodo cervical e pré-escapular, juntamente com alta expressão de IL-10 e TGF- $\beta$  (Alves et al., 2009). Obaço de cães infectados por *L. infantum* é caracterizado por infiltrado de células mononucleares na polpa vermelha e a substituição de linfócitos por macrófagos na polpa branca (Alexandre-Pires et al., 2006). Há um acúmulo predominante de IL-10 nos animais que apresentam alto parasitismo (Lage et al., 2007), enquanto que o compartimento hepático apresenta alto parasitismo e intensa alteração inflamatória (Reis et al., 2009). Análises de linfócitos circulantes em cães sintomáticos, demonstraram baixos níveis de células T CD4+ e CD8+, somados a uma diminuição de células B CD21+ e monócitos CD14+, similarmente, em medular óssea se relata baixa frequência dos diferentes tipos celulares em cães com altos níveis de parasitismo (Reis et al., 2006a).

Por outro lado, animais que permanecem assintomáticos apresentam um baixo parasitismo em tecidos e podem desenvolver um teste intradérmico positivo frente ao antígeno de *Leishmania*, assim como apresentar ensaio de linfoproliferação positivo após estímulo com antígeno parasitário, ambos associados ao desenvolvimento de uma imunidade celular específica ao parasito. A expressão de IFN- $\gamma$  por células T específicas contra *Leishmania* está associada à resistência à doença. Estudos em cães estabeleceram o papel predominante de IFN- $\gamma$  na ativação de macrófagos que em sinergismo com TNF- $\alpha$ , leva a atividade leishmanicida e controle da disseminação do parasito (Chamizo et al., 2005; Manna et al., 2006; Carrillo et al., 2007). Utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, para avaliação da expressão de IFN- $\gamma$  em sangue periférico de cães assintomáticos, foi demonstrado que altos níveis desta citocina estão presentes na ausência de sintomatologia clínica (Manna et al., 2006). Corroborando com estes dados, ensaios *in vitro* empregando células mononucleares de sangue periférico de cães assintomáticos experimentalmente infectados, demonstraram alta expressão de IFN- $\gamma$  após a estimulação com antígenos do parasita (Carrillo et al., 2007). Já em cães suscetíveis, as formas amastigotas disseminam por todo o organismo mostrando uma proliferação em órgãos ricos em tecido linforeticular (Ferrer, 1992).

Os níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania*, detectadas em cães sintomáticos, são maiores do que os detectados em cães assintomáticos, e uma significativa correlação foi encontrada entre os níveis de imunoglobulinas, status clínico e a densidade parasitária nos tecidos (Reis et al., 2006b). A produção excessiva de imunoglobulinas, principalmente IgG, não é protetora contra a doença, mas prejudicial, porque leva à formação de imunocomplexos, anticorpos e crioglobulinas que são responsáveis por parte das alterações clínicas e histopatológicas da doença (Slappendel e Greene, 1990; Martinez-Moreno et al., 1995). As diferentes lesões viscerais e a circulação de imunocomplexos, que podem se depositar em vários órgãos e tecidos, são os dois principais mecanismos fisiopatológicos da LVC (Ferrer, 1992).

## 1.6 PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O óxido nítrico (NO) é um produto da ativação de macrófagos por citocinas, componentes microbiais ou ambos, o qual é gerado a partir do aminoácido L-arginina, através da atividade da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS ou NOS2) e, funciona como uma molécula tumoricida e antimicrobica *in vitro* e *in vivo* (Nathan, 1992).

A eliminação de microorganismos intracelulares ocorre através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A enzima iNOS utiliza L-arginina como um substrato, convertendo-a em L-citrulina e óxido nítrico (NO), o qual, este último, é rapidamente oxidado a nitrito ou nitrato (Marletta, 1988). A indução da enzima iNOS é regulada por citocinas do tipo Th1, tais como: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e também por endotoxina bacteriana, LPS (Li e Poulos, 2005).

A produção de NO e a atividade leishmanicida desta molécula foram demonstradas em experimentos *in vitro* utilizando macrófagos de cães após a incubação com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 (Liew et al., 1997; Pinelli et al., 2000). Outros pesquisadores demonstraram também a importância do NO como molécula microbica, usando um inibidor específico da enzima iNOS, a aminoguanidina (Rodrigues et al., 2007).

Estudos *in vivo*, reafirmam que a ativação de uma resposta imune efetiva com produção de NO pela enzima iNOS podeter um papel importante no controle da infecção por *Leishmania* em cães, uma vez que a alta expressão de iNOS foi correlacionada com uma carga parasitária baixa nos tecidos (Zafra et al., 2008). Adicionalmente, experimentos *in vitro* mostraram que macrófagos de cães infectados com *L. infantum* e ativados com r-IFN- $\gamma$ , produzem um aumento na expressão de iNOS e controle do número de parasitas em seu citoplasma quando comparado a expressão de iNOS obtida de macrófagos infectados e não ativados (Sistoet al., 2001).

Por outro lado, Santos et al. (2008) trabalhando com cortes histológicos de tecido esplênico de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi*,

mostraram que a expressão de iNOS foi maior nos cães sintomáticos acompanhada da maior carga parasitária. Recentemente, foi relatado que formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* isolado de cães e seres humanos são resistentes a ação de NO (Santos et al., 2012), os autores mostraram uma associação direta entre a produção de NO com alta de sobrevivência de parasitas dentro dos macrófagos pela da carga parasitária, independente da ativação dos macrófagos pelo IFN- $\gamma$ .

Em decorrência dos poucos e controversos estudos relativos ao papel do óxido nítrico na patogenia da leishmaniose visceral canina, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar a expressão da enzima iNOS em macrófagos de pele, linfonodo e baço de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi* correlacionando com o parasitismo tecidual.

## ***Objetivos***

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Caracterizar as alterações histopatológicas e correlacionar o grau de parasitismo com a expressão de iNOS em pele, linfonodo e baço de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- 1- Caracterizar as alterações histológicas em pele, linfonodo e baço de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.
- 2- Determinar a densidade parasitária em pele, linfonodo e baço de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.
- 3- Determinar a densidade de células expressando iNOS em pele, baço e linfonodo de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.
- 4- Correlacionar o parasitismo e a expressão de iNOS em pele, baço e linfonodo de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.



## ***Materiais e Métodos***

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA

O presente estudo foi aprovado por uma Comissão de ética em Experimentação Animal e Bem estar Animal, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, localizada na cidade de São Paulo (SP), Brazil, sob o protocolo nº 296/10 (Anexo A).

#### 3.2 POPULAÇÃO CANINA

Foram utilizados 34 cães, sendo 28 naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi* escolhidos aleatoriamente, e 6 cães oriundos de área não endêmica para *L. (L.) infantum chagasi* utilizados como controle negativo. Os animais eram de ambos os sexos, diferentes idades e raças.

A população de cães naturalmente infectados foi oriunda do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba (SP), no período de 2005 a 2006. Estes animais foram examinados clinicamente e divididos em 2 grupos, de acordo com os achados clínicos e exames laboratoriais, em sintomáticos e assintomáticos. No grupo dos animais sintomáticos foram incluídos 18 cães que apresentavam achados clínicos sugestivos de leishmaniose visceral, tais como: perda de peso, onicogribose, lesões de pele, linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia. O grupo dos animais assintomáticos foi composto de 10 cães, sem achados clínicos aparentes de LVC (Feitosa et al., 2000), e 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). Após a anamnese, os animais foram anestesiados com tiopental sódico 25mg/kg e, foi coletado sangue total

através de punção cardíaca. Seguiu-se a eutanásia com injeção endovenosa de solução 19% de cloreto de potássio. Fragmentos de pele do pavilhão auricular, linfonodo poplíteo e baço foram colhidos para o estudo histopatológico e imunoistoquímico. Um grupo controle composto por 6 cães oriundos de área não endêmica para leishmaniose visceral e negativos no exame parasitológico e sorológico também foi incluído neste estudo.

### **3.3 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Todos os cães foram submetidos ao diagnóstico sorológico, para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp, utilizando-se o teste imunoenzimático (ELISA) e empregando como antígeno um extrato bruto de formas promastigotas de *L.(L.) infantum chagasi* e um conjugado fosfatase alcalina anti-IgG canino, conforme previamente descrito (Colombo et al., 2011). Os animais foram considerados positivos, quando apresentaram sorologicamente, uma densidade óptica (DO) com títulos superiores à DO média acrescido de três desvios padrões obtidos do teste diagnóstico, proveniente de soro de cães sadios e não infectados. Foi realizada punção aspirativa de linfonodo poplíteo de todos os animais. Os esfregaços foram corados com Panótico rápido (Laborclin<sup>®</sup>, Pinhais, Brasil) e as lâminas foram observadas em microscopia de luz em imersão para pesquisa de formas amastigotas do parasita.

### **3.4 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA PELE, LINFONODO E BAÇO**

As amostras de pele, linfonodo e baço foram processadas pelas técnicas usuais, para a obtenção de cortes corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE), para exame histológico destes órgãos por microscopia óptica, com o intuito de verificar a presença do parasita, assim como as características do processo

inflamatório. Para o estudo histopatológico, foi realizada análise comparativa semiquantitativa dos cortes corados pela HE, atribuindo-se cruzes, de acordo com a intensidade dos diferentes processos caracterizados, onde: (-) negativo, (+) discreto, (++) moderado e (+++) intenso.

### **3.5 IMUNOISTOQUÍMICA EM TECIDO PARAFINADO PARA DETECÇÃO DE PARASITAS EM FRAGMENTOS DE PELE, LINFONODO E BAÇO DE CÃO.**

As reações de imunistoquímica (IHQ) para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* em pele, linfonodo e baço de cão foram feitas, de acordo com Moreira et al., (2007), utilizando-se como anticorpo primário soro total de camundongo infectado cronicamente com *Leishmania*, e kit LSAB (DakoCytomation, USA). Para o controle da reação de IHQ em pele, baço e linfonodo de cães com parasitismo escasso a moderado por *Leishmania*, foram empregados como controles positivos e, a omissão do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo.

### **3.6 IMUNOISTOQUÍMICA EM TECIDO PARAFINADO PARA DETECÇÃO DE CÉLULAS iNOS+ EM FRAGMENTOS DE PELE, LINFONODO E BAÇO DE CÃO.**

Seguindo-se a desparafinização a frio, os cortes foram hidratados e a recuperação antigênica foi feita em banho-maria, à temperatura de 96°-99°C em solução de ácido cítrico 10 mM/pH 6,0. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio e, as ligações inespecíficas com solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil). Seguiu-se incubação com o anticorpo primário policlonal anti-NOS2 (Santa Cruz - 651), produzido em coelho, na diluição de 1/1000 em solução de albumina bovina a 1% em PBS em câmara úmida, "overnight" a 4°C. Para revelação da reação foi empregado o kit Novolink

(NOVOCASTRA RE7280-K, Leica, Nussloch, Alemanha) e o substrato cromogênico DAB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diaminobenzidina com peróxido de hidrogenio - DakoCytomation, K3468, Dako, Glostrup, Dinamarca). A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris e, seguiu-se à desidratação dos cortes e montagem das lâminas com bálsamo do Canadá e lamínula. Cortes histológicos de pele, baço e linfonodo de cães negativos, procedentes de área não endêmica para LVC, com diagnóstico sorológico e parasitológico negativos, foram empregados como controle.

### **3.7 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE PARASITOS E CÉLULAS iNOS<sup>+</sup>**

Para avaliação da densidade das formas amastigotas e de células expressando iNOS<sup>+</sup>, foi realizada análise quantitativa morfométrica. Para isso, 10 campos de cada corte histológico foram fotografados, em objetiva de 40X e, o número de formas amastigotas e de células iNOS<sup>+</sup> foram contadas, utilizando o programa Axiovision 4.0, em um computador acoplado a um fotomicroscópio Zeiss Axioskop 2 plus. Posteriormente, foi calculada a área da imagem (0,03536412 mm<sup>2</sup>) e, a média das formas amastigotas e de células iNOS<sup>+</sup> foi dividida pela área, para o cálculo da densidade.

### **3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise estatística foi utilizado o programa GRAPHPAD PRISMA 5.0 para Windows. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn foi utilizado para comparar os achado histológicos entre os grupos clínicos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi empregado para comparar a intensidade do parasitismo e das células iNOS<sup>+</sup> entre os grupos clínicos. O teste de Spearman foi empregado para avaliar a correlação entre o

parasitismo tecidual e o número de células iNOS<sup>+</sup>. As diferenças foram consideradas significativas, quando  $p < 0,05$ .

## ***Resultados***

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO, PARASITOLÓGICO E SOROLÓGICO

Neste estudo foram utilizados 34 cães, sendo 28 cães naturalmente infectados, que foram agrupados, de acordo com manifestações clínicas e avaliação de bioquímica sérica, em sintomáticos (n = 18) e assintomáticos (n = 10) e 6 cães oriundos de área não endêmica para *L. (L.) infantum chagasi* utilizados como controle negativo. Os animais do grupo sintomático apresentaram de três a seis achados clínicos, sendo que, os mais frequentemente observados foram: linfadenomegalia (15/18), esplenomegalia (15/18), perda de peso (14/18), lesões cutâneas (11/18), onicogribose (10/18) e hepatomegalia (10/18). Todos os animais do estudo, tanto do grupo sintomático como do grupo assintomático apresentaram diagnóstico parasitológico e sorológico positivos para leishmaniose. Os cães assintomáticos não apresentaram achados clínicos compatíveis com a doença; além de nenhuma outra alteração clínica ou laboratorial. Em relação à avaliação bioquímica, 73% dos cães sintomáticos apresentaram aumento dos valores séricos de creatinina (>1,4 mg/dL) e, 40% demonstraram hiperproteinemia (>9,0 g/dL); já os animais assintomáticos mostraram valores séricos de creatinina e proteína dentro dos parâmetros de normalidade.

Entre os animais utilizados neste estudo, 50% (14/28) eram fêmeas, nove sintomáticas e cinco assintomáticas; e 50% (14/28) eram machos, sendo nove sintomáticos e cinco assintomáticos.

### 4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA PELE, LINFONODO E BAÇO

As alterações histopatológicas de pele não mostraram diferença significativa entre os grupos clínicos, sintomáticos e assintomáticos ( $p>0,05$ ). De



maneira geral, as alterações se caracterizaram por um infiltrado inflamatório na derme, ao redor de anexos cutâneos, formado, principalmente, por células mononucleares, tais como: macrófagos, linfócitos e plasmócitos (Figura 1A e B). O infiltrado inflamatório variou de discreto a intenso, por vezes focal ou difuso, dependendo do parasitismo, que também variou de negativo a intenso. A intensidade do infiltrado inflamatório, assim como o parasitismo de pele está representada na Figura 1C. A presença de granulomas epitelióides com células gigantes foi evidenciada na pele de alguns animais. A presença de formas amastigotas de *Leishmania* foi confirmada em 59% dos cães do grupo sintomático e, somente em 36% dos cães do grupo assintomático, nos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina.

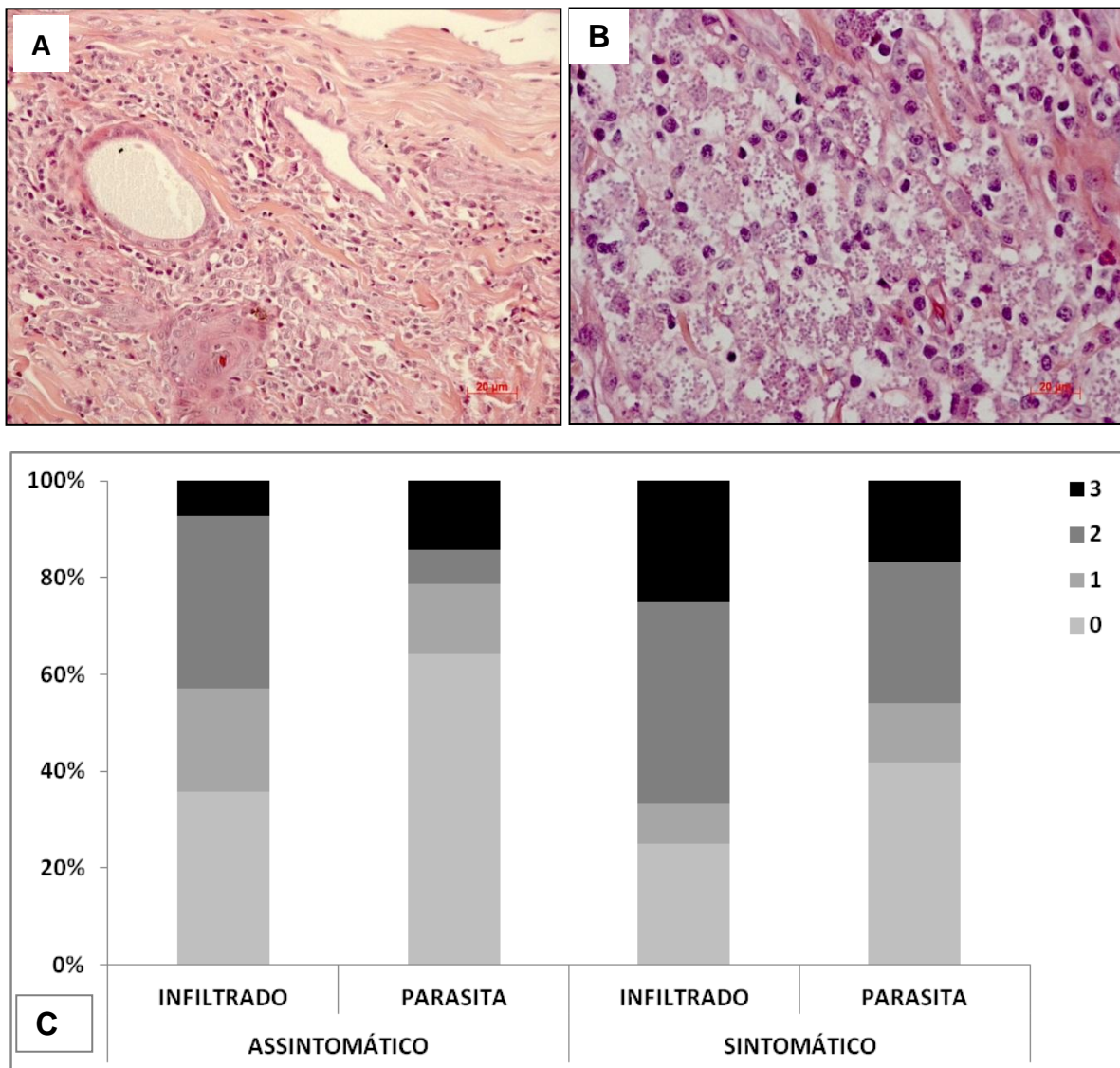


Figura 1 – Corte histológico da pele de cão com leishmaniose visceral mostrando infiltrado inflamatório mononuclear perianexal na derme (A) e o intenso parasitismo em meio ao infiltrado linfohistioplasmocitário (B) (HE). A Figura 1C mostra o percentual da intensidade do processo inflamatório e do parasitismo na derme, onde 0 (-) representa negativo, 1 (+) discreto, 2 (++) moderado e 3 (+++) intenso

Em relação às alterações histológicas observadas no linfonodo poplíteo, observaram-se hiperplasia e hipertrófia da área cortical e para-cortical dos linfonodos com evidente ativação folicular na cortical, que variou de discreta (+), moderada (++) a intensa (+++) (Figura 2A). Hiperplasia e hipertrofia de macrófagos na região medular estavam presentes, variando de discreta (+), moderada (++) a intensa (+++); caracterizando em muitos casos, uma linfadenite granulomatosa (Figura 2B). Evidente plasmocitose também foi observada. A presença de formas amastigotas foi observada em 63% dos animais sintomáticos e, em 40% dos animais assintomáticos, nos cortes corados pela hematoxilina-eosina. A análise semi-quantitativa das alterações histopatológicas da cortical, paracortical e medular, assim como o parasitismo do linfonodo poplíteo não mostrou diferença significativa entre os grupos sintomáticos e assintomáticos ( $p > 0,05$ ) (Figura 2C).

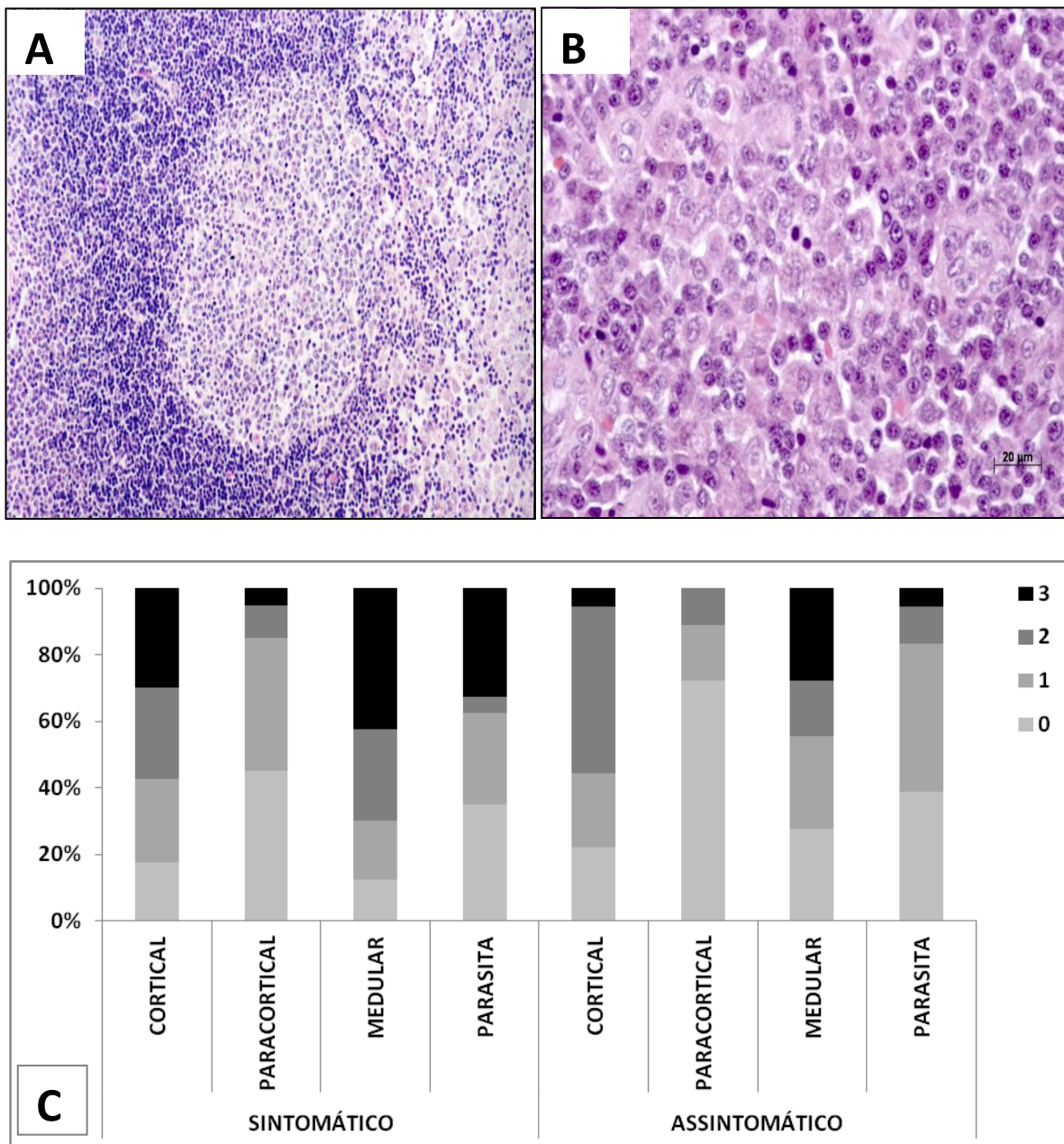


Figura 2 - Corte histológico do linfonodo de cão com leishmaniose visceral mostrando ativação folicular na região cortical (A) e hiperplasia e hipertrofia de macrófagos na área medular (B) (HE). A Figura 2C mostra o percentual da intensidade da hiperplasia/hipertrofia da cortical, paracortical, medular e a intensidade do parasitismo no linfonodo poplíteo, onde 0 (-) representa negativo, 1 (+) discreto, 2 (++) moderado e 3 (+++) intenso

A polpa branca do baço mostrava-se hiperplasiada e hipertrofiada com a presença de ativação, variando de discreta, moderada à intensa; porém em alguns animais sintomáticos estava presente uma hipoplasia e até uma atrofia da polpa branca (Figura 3A). As alterações histológicas da polpa vermelha caracterizaram-se por hipertrofia e hiperplasia de macrófagos, em caráter moderado a intenso. A presença de esboço granulomatoso, assim como granulomas epitelióides bem formados com células gigantes, foi evidente na maioria dos casos (Figura 3B). A presença de formas amastigotas foi observada em 72% dos animais sintomáticos e em 60% dos assintomáticos. A análise semi-quantitativa das alterações histopatológicas da polpa branca e polpa vermelha do baço, e parasitismo tecidual não mostrou diferença significativa entre os grupos sintomáticos e assintomáticos ( $p>0,05$ ) e está representada na Figura 3C.



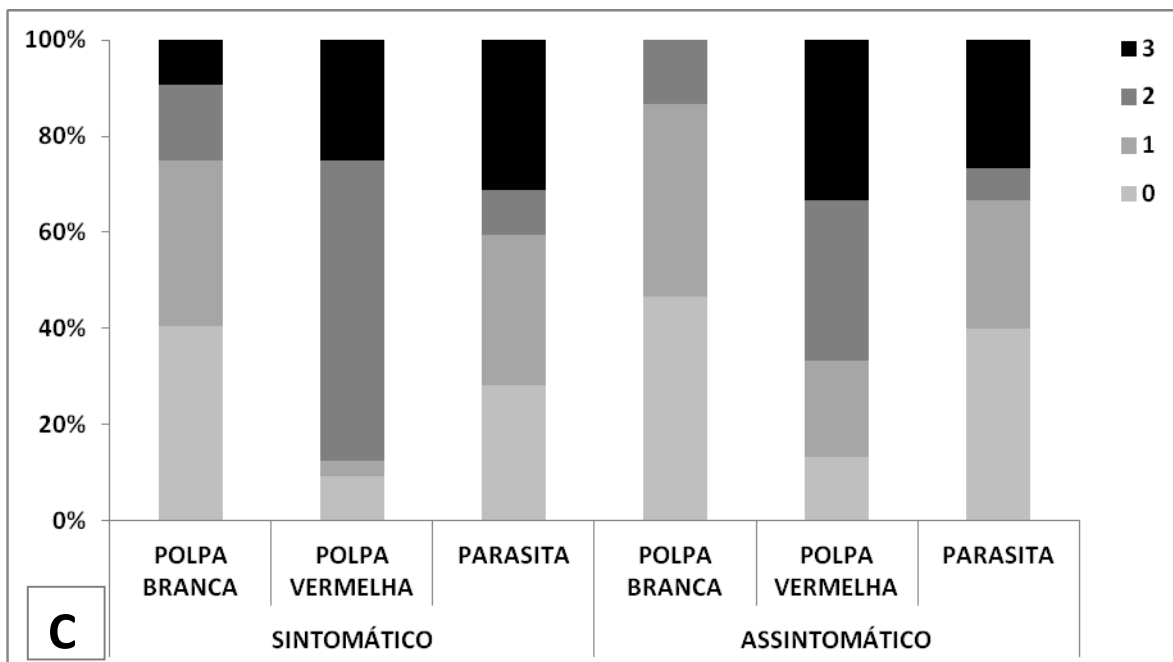
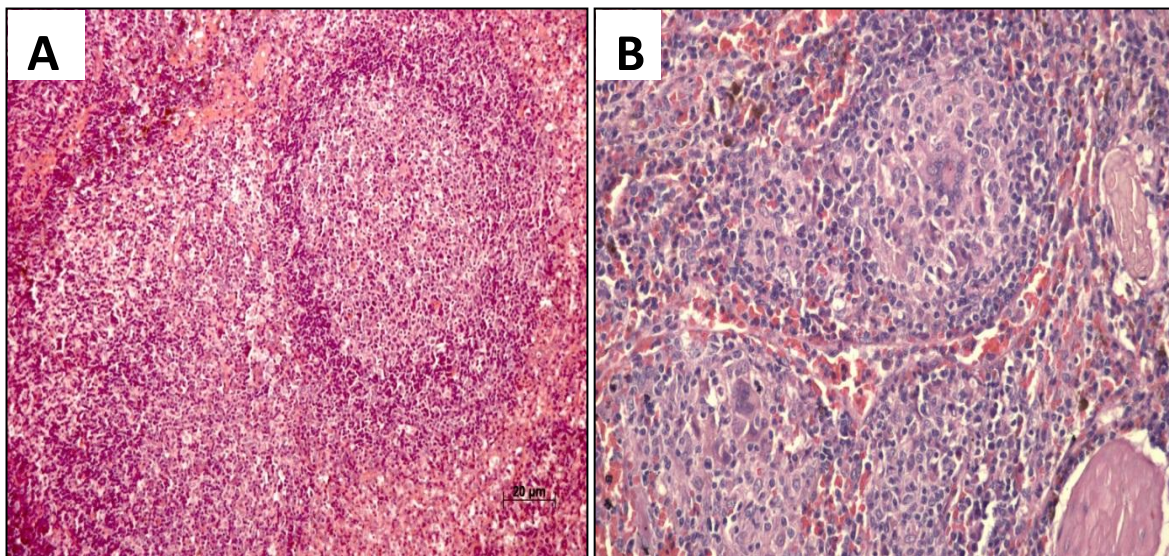
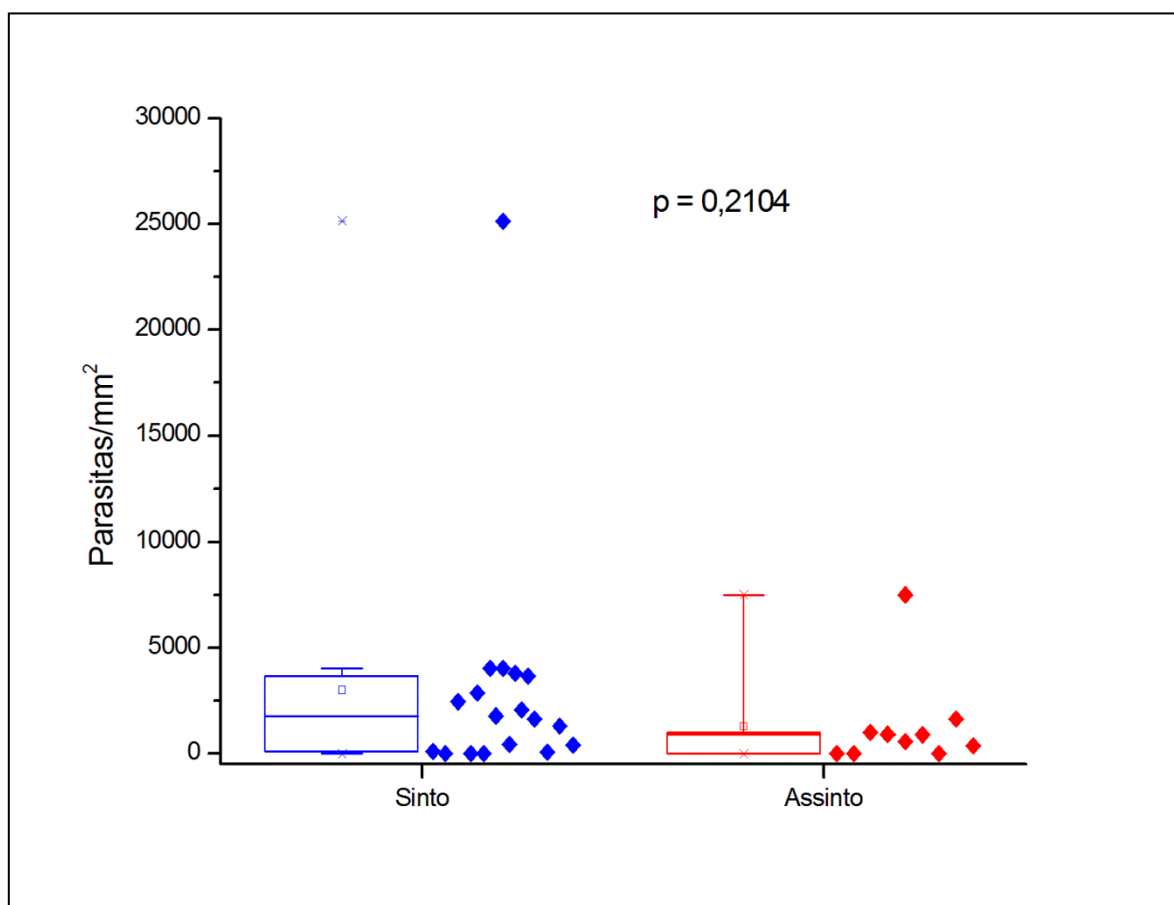


Figura 3 –Corte histológico do baço de cão com leishmaniose visceral mostrando hiperplasia folicular na polpa branca (A) e hiperplasia e granulomas epitelióides com a presença de células gigantes na polpa vermelha (B) (HE). A Figura 2C mostra o percentual da intensidade da hiperplasia/hipertrofia da polpa branca e da polpa vermelha e a intensidade do parasitismo no baço, onde 0 (-) representa negativo, 1 (+) discreto, 2 (++) moderado e 3 (+++) intenso

#### 4.3 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTAS

O número de formas amastigotas/mm<sup>2</sup> (média ± desvio padrão) na pele de pavilhão auricular dos animais sintomáticos (2982±1351 amastigotas/mm<sup>2</sup>), embora com média maior, aproximadamente o dobro, não apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparado aos animais assintomáticos (1282±710 amastigotas/mm<sup>2</sup>) ( $p=0,2104$ ) (Gráfico 1 e Figura 4).

Gráfico 1 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, do número de formas amastigotas detectadas pela técnica de imunistoquímica na pele de pavilhão auricular de cães com leishmaniose visceral assintomáticos e sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP)



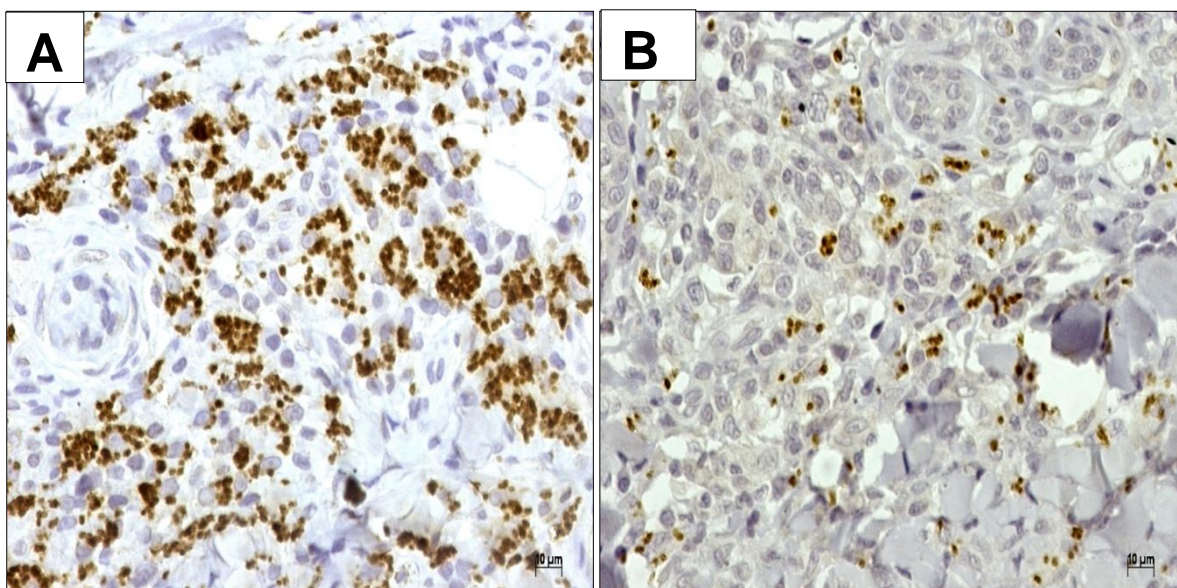
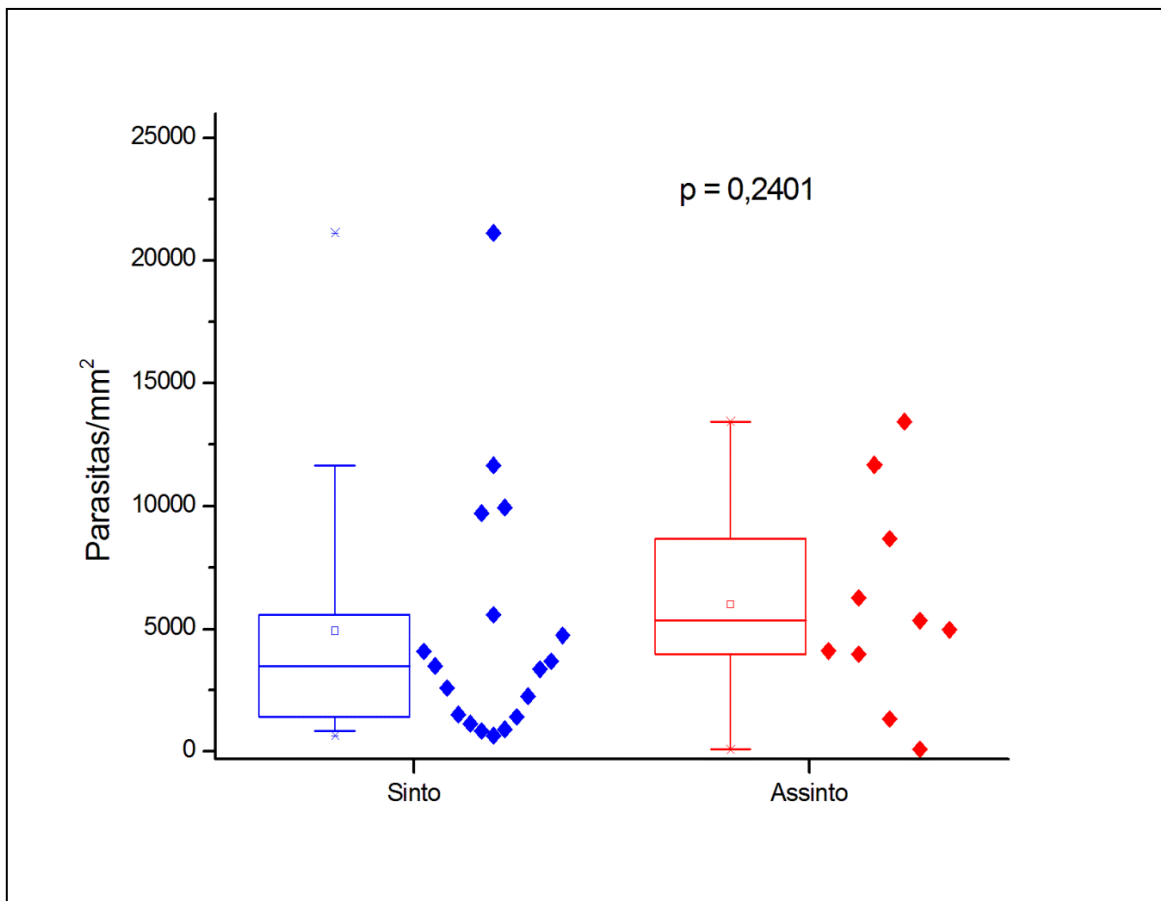


Figura 4 – Fotomicrografia demonstrativa da presença de formas amastigotas do parasita detectadas pela técnica de imunohistoquímica na pele de cão sintomático (A) e assintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP)

No linfonodo poplíteo foi observada a presença de formas amastigotas do parasita em todos os animais, tanto do grupo sintomático como do grupo assintomático. Porém, também não foi observada diferença significativa entre os grupos clínicos ( $p=0,2401$ ); o número de formas amastigotas/ $\text{mm}^2$  no corte histológico do linfonodo dos cães sintomáticos foi de  $4933 \pm 1232$  amastigota/ $\text{mm}^2$  e dos cães assintomáticos foi de  $5987 \pm 1336$  amastigota/ $\text{mm}^2$  (Gráfico 2 e Figura 5).



Gráfico 2 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, de parasitas detectados pela técnica de imunoistoquímica no linfonodo poplíteo de cães com leishmaniose visceral assintomáticos e sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP)



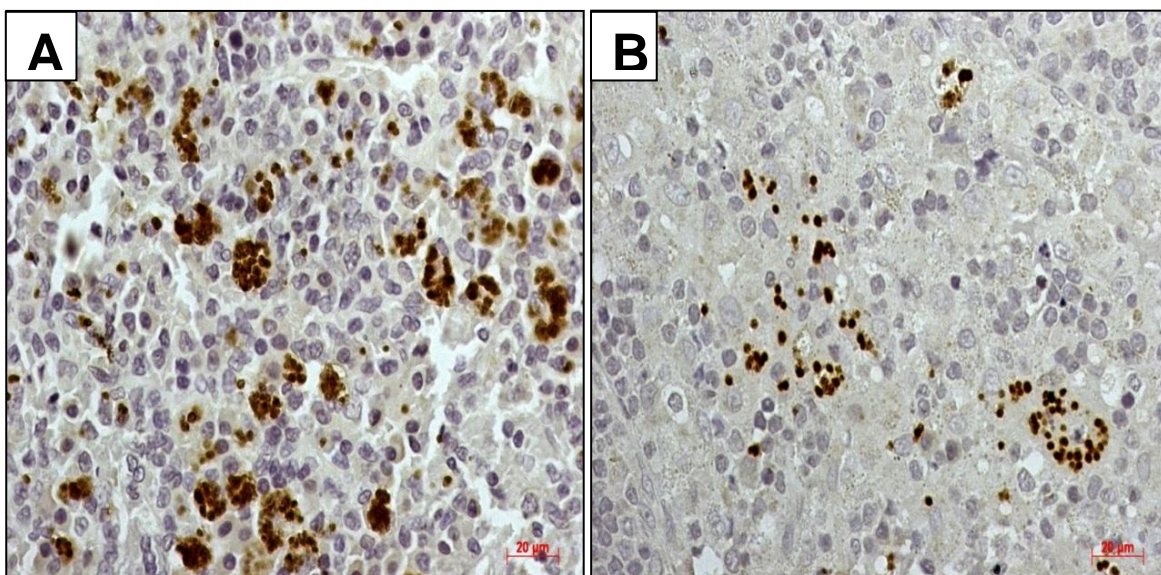
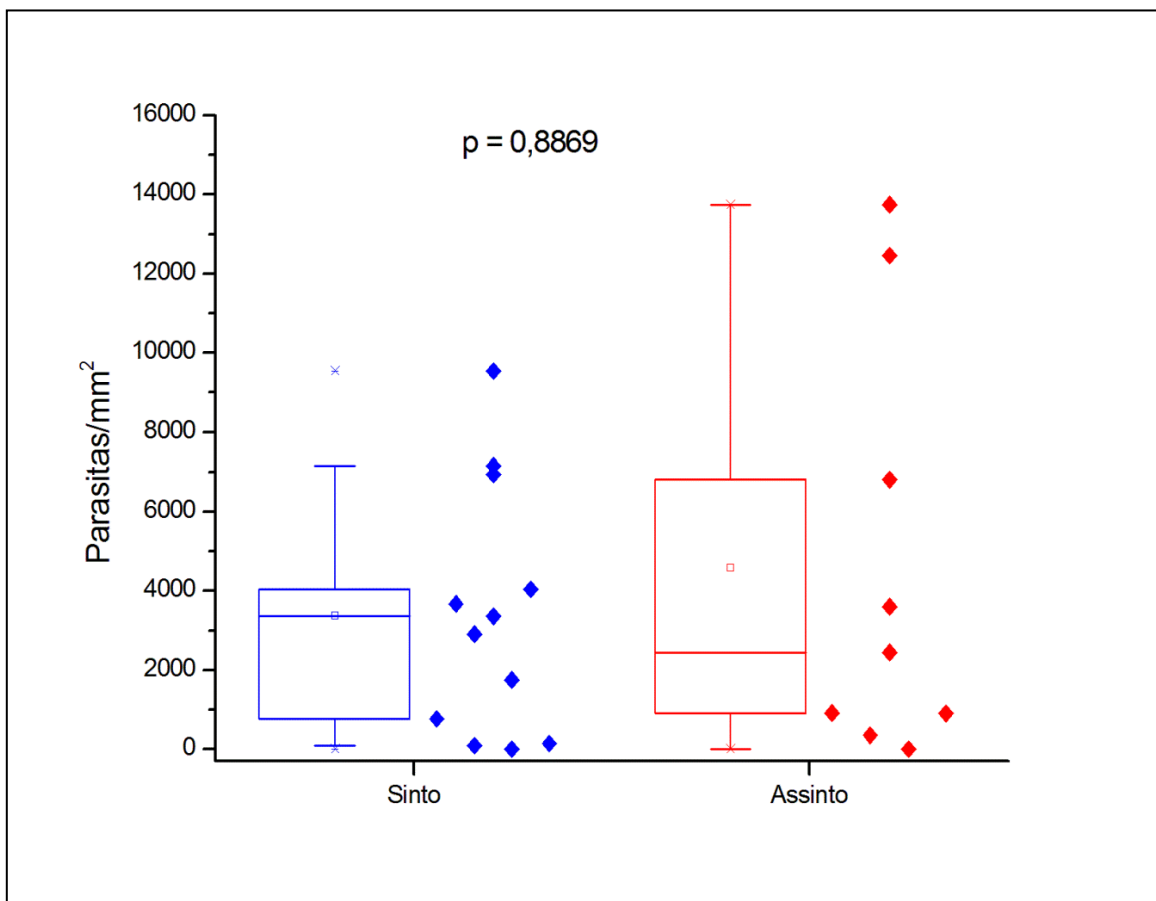


Figura 5 – Fotomicrografia demonstrativa da presença de formas amastigotas do parasita detectadas pela técnica de imunohistoquímica no linfonodo de cão sintomático (A) e assintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP)

No baço, observamos a presença de formas amastigotas em 11/12 cães sintomáticos e em 8/9 assintomáticos. Não houve diferença significativa ( $p=0,8869$ ) entre o número de formas amastigotas dos animais sintomáticos ( $3364\pm 904$  amastigota/ $\text{mm}^2$ ) e os assintomáticos ( $4581\pm 1758$  amastigota/ $\text{mm}^2$ ) (Gráfico 3 e Figura 6)

Gráfico 3 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo, de parasitas detectados pela técnica de imunistoquímica no baço de cães com leishmaniose visceral assintomáticos e sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP)



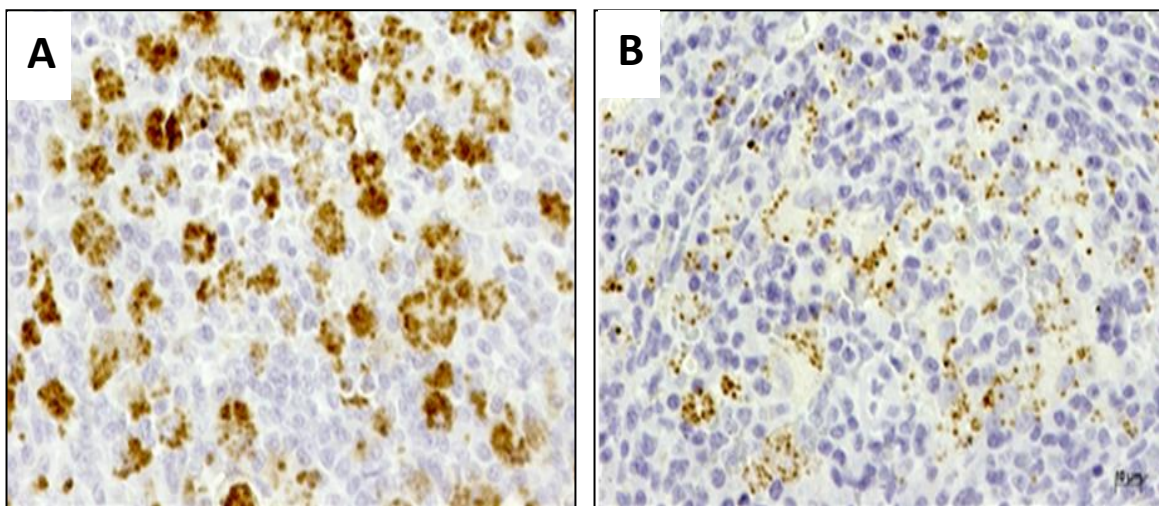
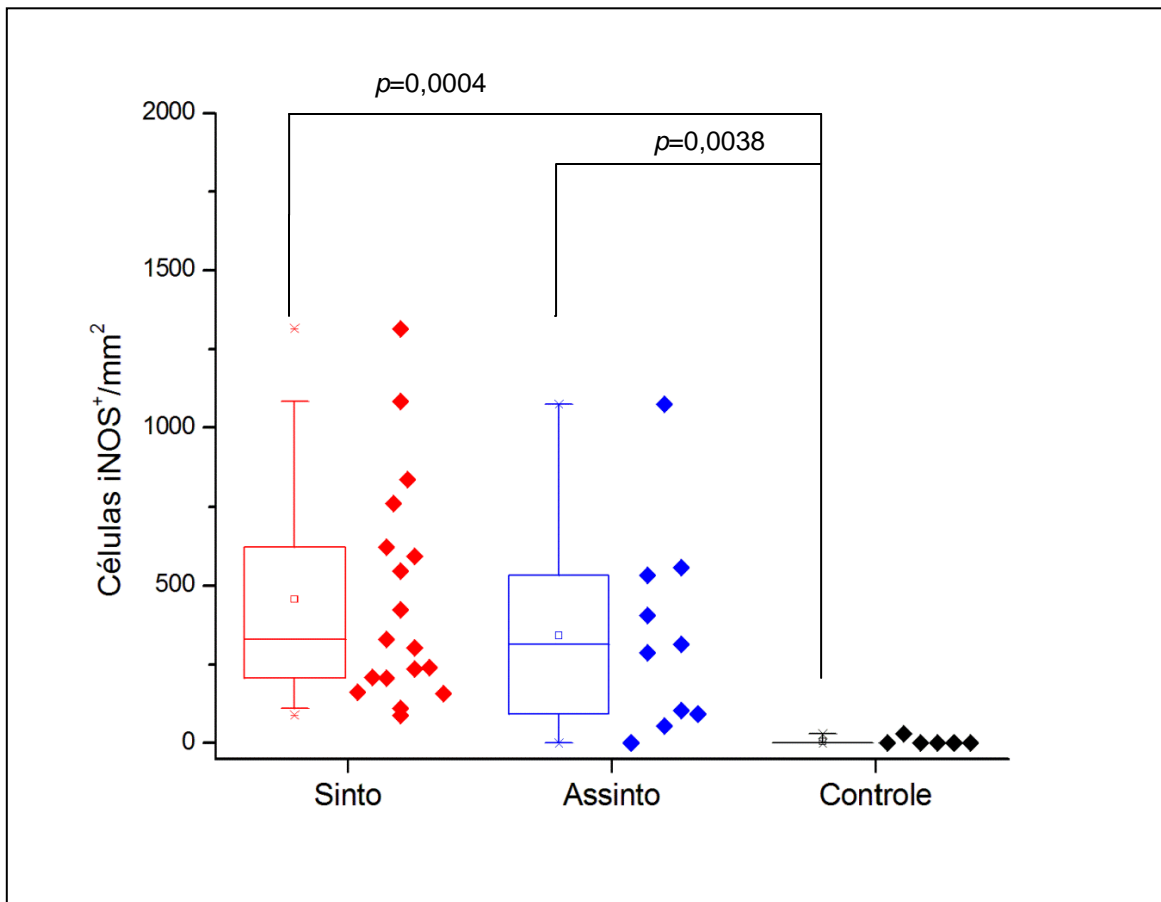


Figura 6 – Fotomicrografia demonstrativa da presença de formas amastigotas do parasita detectadas pela técnica de imunohistoquímica no baço de cão sintomático (A) e assintomático (B) com leishmaniose visceral, oriundos do município de Araçatuba (SP)

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS iNOS<sup>+</sup> EM PELE, LINFONODO E BAÇO

A média da densidade de células iNOS<sup>+</sup> em cortes histológicos de pele foi semelhante ( $p=0,3026$ ) entre o grupo sintomático ( $457 \pm 83$  células iNOS<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>) e o grupo assintomático ( $342 \pm 103$  células iNOS<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>). Os animais controle, oriundos de área não endêmica para LV e com diagnóstico parasitológico e sorológico negativos para LV, mostraram uma expressão menor ( $0,17 \pm 0,17$  células iNOS<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>) de iNOS<sup>+</sup> na pele do que os animais com leishmaniose, tanto do grupo sintomático ( $p=0,0004$ ) como o do grupo assintomático ( $p=0,0038$ ) (Gráfico 4 e Figura 7).

Gráfico 4 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunohistoquímica na pele de cães controle e com leishmaniose visceral assintomáticos ou sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP)



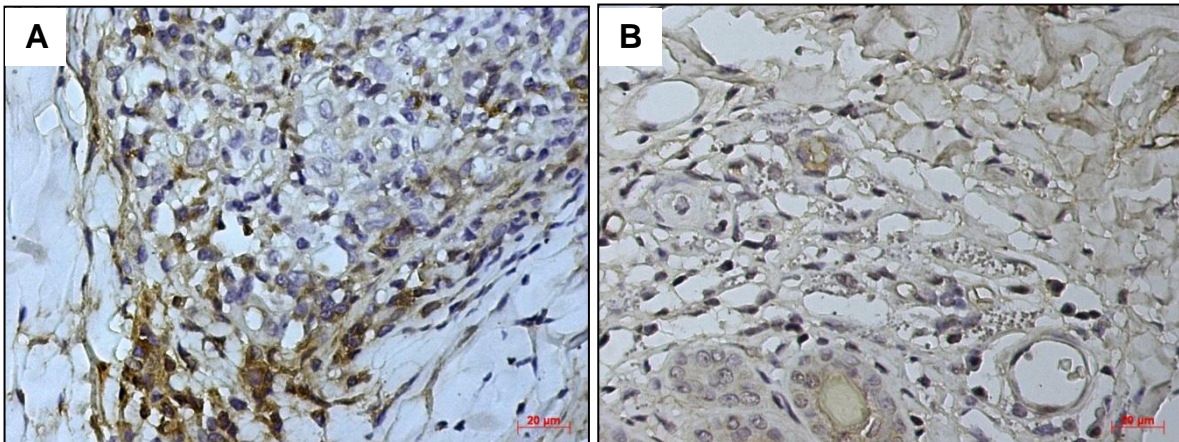
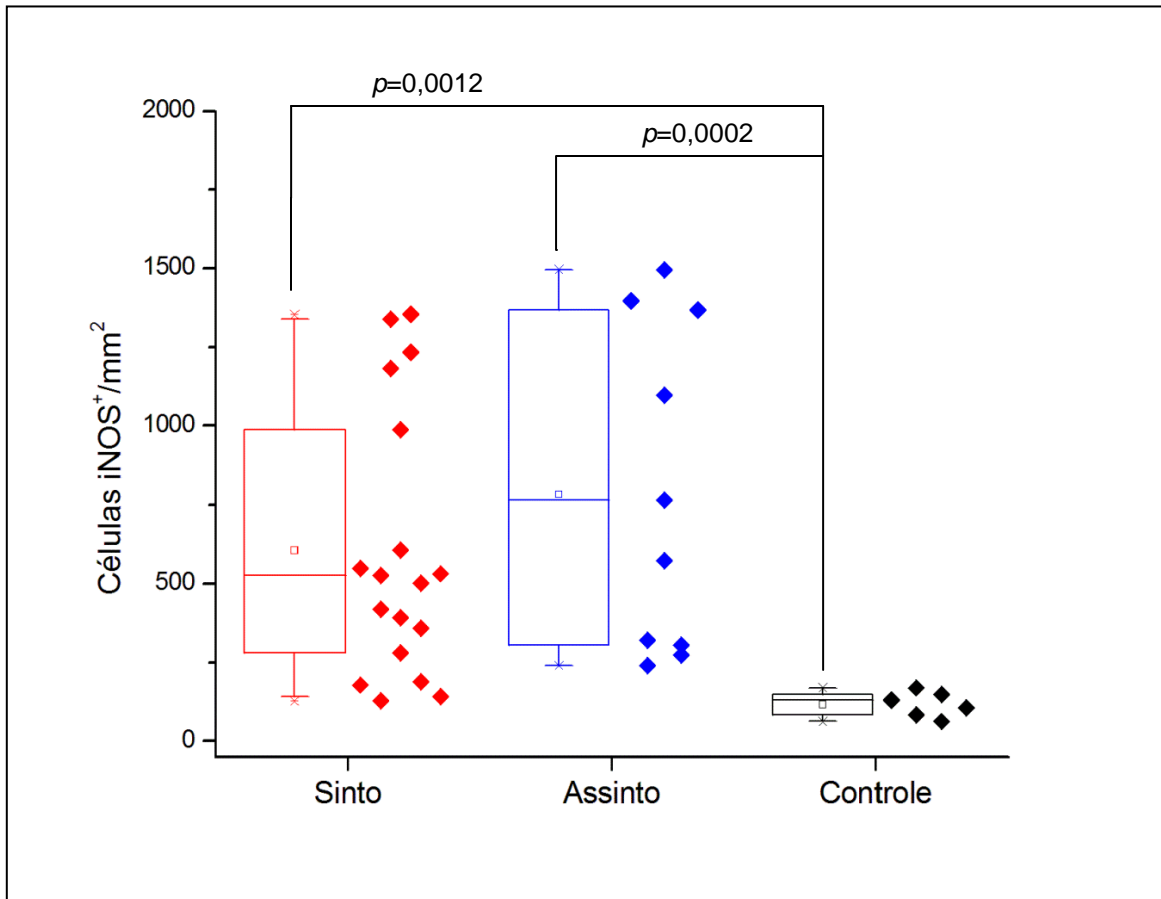


Figura 7 - Fotomicrografia demonstrativa da presença do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunohistoquímica na pele de cães com leishmaniose visceral assintomático (A) ou sintomático (B) oriundos do município de Araçatuba (SP)

No linfonodo, também não houve diferença significativa entre a média de células iNOS<sup>+</sup> nos cortes histológicos de cães sintomáticos ( $605 \pm 100$  células iNOS<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>) e assintomáticos ( $784 \pm 162$  células iNOS<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>) ( $p=0,3257$ ). Porém, houve diferença significativa entre os cães sintomáticos e controle ( $4,11 \pm 0,583$  células iNOS<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>) ( $p=0,0012$ ), assim como entre cães assintomáticos e o controle ( $p=0,0002$ ) (Gráfico 5 e Figura 8).



Gráfico 5 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunistoquímica no linfonodo de cães controle e com leishmaniose visceral assintomáticos e sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP)



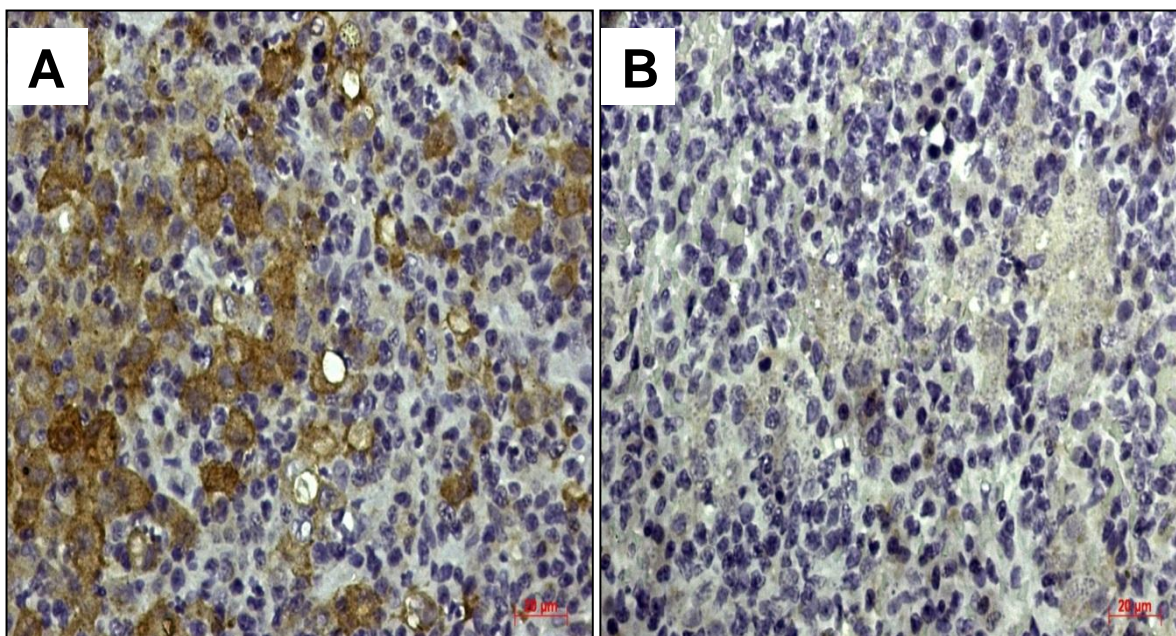
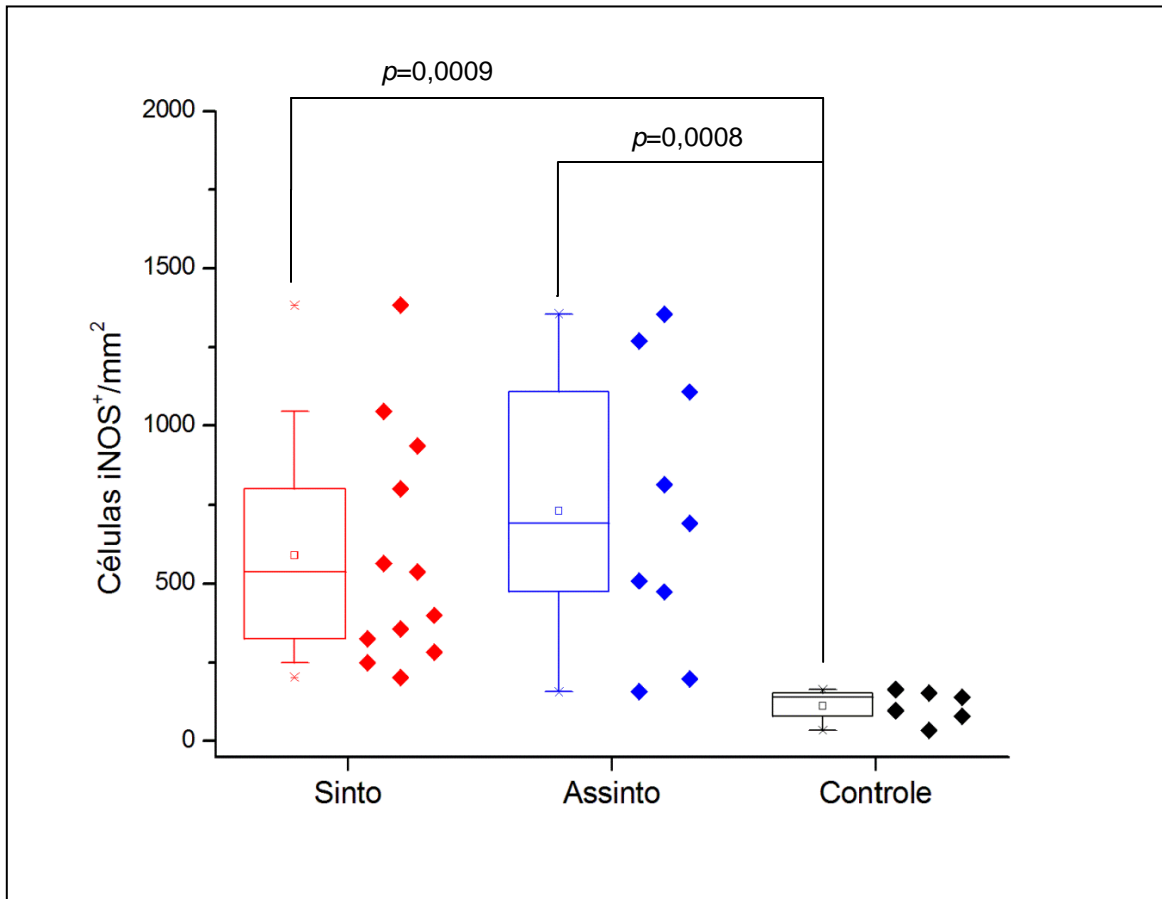


Figura 8 - Fotomicrografia demonstrativa da presença do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunohistoquímica no linfonodo de cães com leishmaniose visceral assintomático (A) ou sintomático (B) oriundos do município de Araçatuba (SP)

No baço, a média da densidade de células expressando iNOS<sup>+</sup> foi também semelhante ( $p=0,5940$ ) entre os grupos sintomático ( $590\pm 107$  células iNOS<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>) e assintomático ( $730\pm 147$  células iNOS<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>). Houve diferença significativa entre o grupo sintomático e o controle ( $3,917\pm 0,7221$  células iNOS<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>) ( $p=0,0009$ ) e, também entre o grupo assintomático e o controle ( $p=0,0008$ ) (Gráfico 6 e Figura 9).



Gráfico 6 – Representação gráfica em dot plot e box plot mostrando a média, mediana e percentis, máximo e mínimo do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunistoquímica no baço de cães controle e com leishmaniose visceral assintomáticos e sintomáticos oriundos do município de Araçatuba (SP)



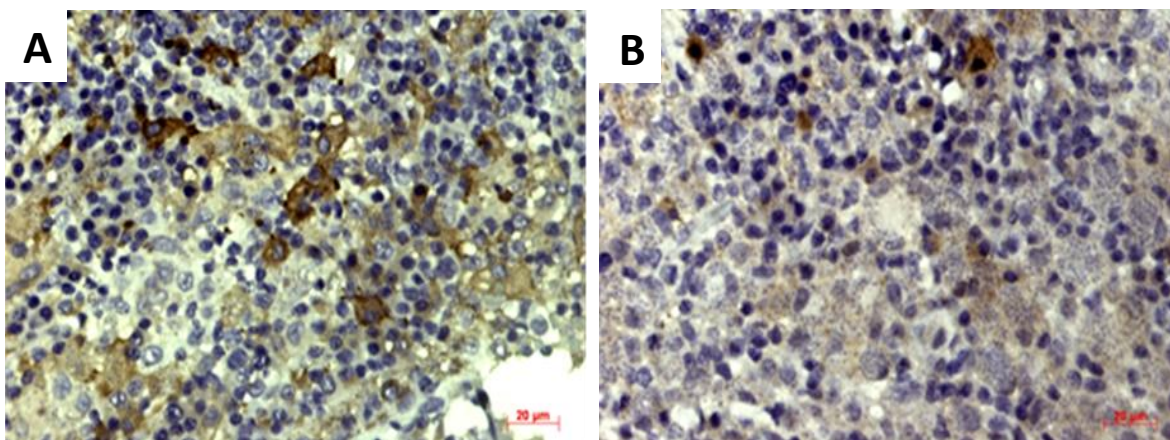
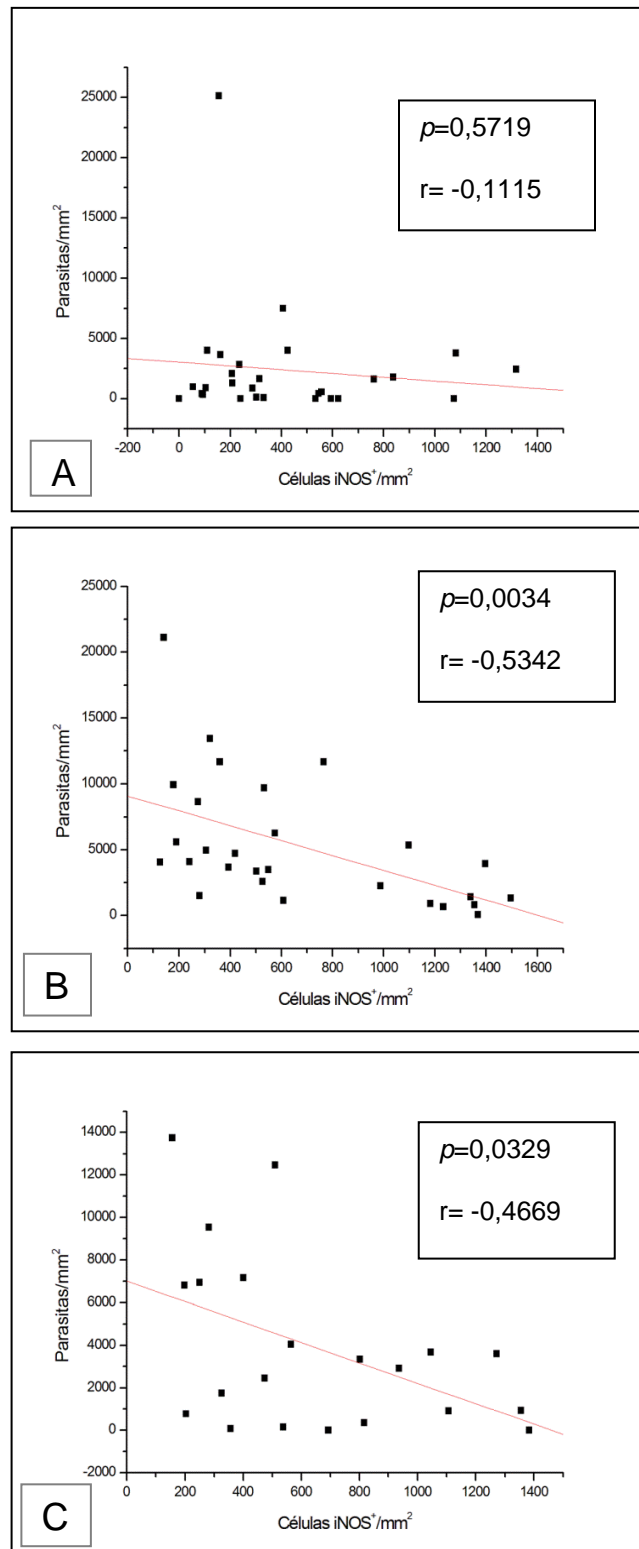


Figura 9 - Fotomicrografia demonstrativa da presença do marcador iNOS+ detectado pela técnica de imunohistoquímica no baço de cães com leishmaniose visceral assintomático (A) ou sintomático (B) oriundos do município de Araçatuba (SP)

#### 4.5 CORRELAÇÃO ENTRE PARASITISMO TECIDUAL E EXPRESSÃO DE CÉLULAS iNOS+ EM FRAGMENTOS DE PELE, LINFONODO E BAÇO

Os testes de correlação foram feitos, considerando-se o grupo de animais infectados como um todo, isto é cães sintomáticos e assintomáticos. Em relação à pele, observou-se uma correlação fraca e não significativa entre a densidade de parasitas no tegumento e a densidade de células expressando iNOS<sup>+</sup> ( $r = -0,1115$ ;  $p = 0,5719$ ) pelo teste de Spearman (Gráfico 7A). Já quando se analisou a correlação entre o parasitismo de linfonodo e a expressão de células iNOS<sup>+</sup> neste órgão, observou-se uma correlação negativa moderada e significativa ( $r = -0,5342$ ;  $p = 0,0034$ ) (Gráfico 7B), assim como no baço ( $r = -0,4669$ ;  $p = 0,0329$ ) (Gráfico 7C).

Gráfico 7 – Representação gráfica de correlação entre a densidade de parasitas e a densidade de células iNOS<sup>+</sup> na pele (A), no linfonodo (B) e no baço (C) de cães assintomáticos e sintomáticos com leishmaniose visceral oriundos do município de Araçatuba (SP)



## ***Discussão***

---

## 5. DISCUSSÃO

Do ponto de vista epidemiológico, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é considerada mais importante que a doença humana, devido a três fatores principais: a alta prevalência da doença, o fato de que animais assintomáticos e sintomáticos mantêm-se como fonte de infecção para o inseto vetor e, principalmente, porque a infecção canina pode preceder aos casos humanos (Moreno e Alvar, 2002). A disseminação de formas promastigotas de *Leishmania* inoculadas através da pele do cão, para órgãos linfóides, ocorre em poucas horas após inoculação intradérmica (Saldarriaga et al., 2006). Entretanto, características genéticas e da imunidade do hospedeiro devem ser consideradas na disseminação do parasita. Em cães suscetíveis, o parasita poderá se disseminar em horas, enquanto que em cães resistentes, poderá permanecer no ponto de inoculação e linfonodos regionais (Ferrer, 2002). A resistência à infecção por *Leishmania* está associada à ativação de células Th1, produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, as quais são responsáveis pelo controle da infecção (Pinelliet al., 1994). O principal mecanismo efetor na proteção da resposta imune de cães infectados por *L.(L.) infantum* é ativação dos macrófagos por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , com consequente produção de óxido nítrico (NO), que é tóxico para as formas amastigotas intracelulares (Vouldoukiset al., 1996). Neste contexto, o presente estudo objetivou-se a avaliar as alterações histológicas de pele, baço e linfonodo de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi*, com e sem sintomatologia aparente da doença, assim como determinar o grau do parasitismo, correlacionando com o número de macrófagos expressando iNOS<sup>+</sup> nestes tecidos.

A LVC é uma doença multissistêmica, de curso crônico, podendo apresentar-se com um número variável de manifestações clínicas (Baneth et al., 2008). A doença, geralmente, inicia-se com uma lesão primária na pele, não ulcerante, que eventualmente pode não ser detectada. As lesões de pele comumente são constituídas de áreas alopecias, com zonas de descamação, principalmente em regiões de articulações e dobras de pele. De acordo com Poci

(1998), quando há úlceras, normalmente estas são detectadas na pele do focinho, orelhas e mucosas, oral e nasal. Michalik e Ribeiro(1997) citado por Poci (1998) verificaram que após um período médio de três a cinco meses de incubação, os parasitas já podem ser encontrados no fígado, baço, medula óssea e linfonodos; locais onde os macrófagos abrigam grande número de formas amastigotas, o que resulta em uma sobrecarga nos órgãos e um déficit ao funcionamento dos mesmos. Dentro deste contexto, no presente estudo foi demonstrado que os principais achados clínicos observados no grupo de cães sintomáticos, com diagnóstico laboratorial positivo para leishmaniose foram: linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, perda de peso, lesões cutâneas e onicogribose; achados estes que vêm ao encontro com os já descritos por outros autores (Feitosa et al. 2000, Lima et al. 2004, Baneth et al. 2008). No entanto, ainda dentro do grupo de animais com diagnóstico laboratorial positivo para leishmaniose, estavam presentes animais que não apresentaram sinais clínicos compatíveis com a infecção, e desta forma foram considerados assintomáticos. É importante salientar que, estes animais apresentavam valor sérico de proteína menor que 8,5 mg/dL e, creatinina dentro dos limites normais (IRIS, 2006), não caracterizando a alteração renal, que é comum na leishmaniose visceral canina.

Em relação à avaliação das lesões histopatológicas em pele de pavilhão auricular dos cães de ambos os grupos clínicos, observamos, de maneira geral, que os animais apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear perianexial na derme e, variável parasitismo em meio ao infiltrado linfohistioplasmocitário, achados estes já relatados por Adler e Theodor, (1931); Cunha, (1938); Tafuri et al., (2001). A presença de formas amastigotas do parasita foi confirmada nos cortes histológicos corados pelo HE em 59% dos animais do grupo sintomático e em apenas 36% dos cães do grupo assintomático. Estes resultados mostram que o parasitismo cutâneo foi mais frequente nos animais que apresentavam sinais clínicos compatíveis com LVC, quando comparados aos animais que não apresentavam qualquer manifestação clínica da doença, como já descrito por Santos et al.(2004). No entanto, deve-se considerar que a amostra coletada dos

animais foi obtida de um único local do tegumento e sem lesão macroscópica aparente, fato este, que poderia, eventualmente, não caracterizar o padrão histológico de outras regiões do tegumento. Guarga et al (2000), mostrou através do xenodiagnóstico, que cães assintomáticos representam importantes fontes de infecção para o inseto vetor; baseado em dados que, sugerem que os parasitas apresentam larga distribuição na pele de cães infectados; apesar de cães permanecerem assintomáticos por longos períodos de infecção.

Embora a pele seja considerada essencial para a transmissão de *Leishmania*, uma vez que o inseto inocula parasitas no hospedeiro vertebrado, além de constituir a primeira barreira do sistema imunológico, nosso estudo não mostrou diferença significativa ( $p=0,2104$ ) no número de formas amastigotas/mm<sup>2</sup> no tegumento entre animais sintomáticos e assintomáticos; o que vem ao encontro aos achados por outros autores (Madeira et al., 2004; Lima et al., 2010; Reis et al., 2006b). Por outro lado, Solano-Gallego et al. (2004), não detectou parasitas ou lesões em focinho de cão assintomático, mas somente o DNA destes. Este achado em nosso estudo, provavelmente reflete a grande heterogeneidade dos resultados obtidos entre os animais dos diferentes grupos clínicos, que mostraram uma grande dispersão dos dados. É importante salientar que trabalhamos com animais naturalmente infectados e, portanto não temos a informação do período de incubação da infecção, podendo ter no *pool* de cães deste estudo, animais recém-infectados, em período pré-patente da doença, assim como, animais já enfermos.

Relatos prévios demonstram que, cães com doença plenamente manifesta, mostram um grande número de parasitas na pele, que se correlacionam com a severidade das lesões histopatológicas (Santos et al., 2004; Giunchetti et al., 2006). Devem-se também levar em consideração que, tanto a espécie do parasita quanto a cepa (Herwaldt, 1999), assim como o *status* imunológico do hospedeiro (Postigo et al., 1997), estão entre os possíveis fatores responsáveis pela disseminação da *Leishmania* para diferentes tecidos ou órgãos. A disseminação de *Leishmania* para a pele de cães demonstrou ser um evento tardio no curso da

infecção, provavelmente, no momento de desequilíbrio da resposta imune celular, levando à manifestação dos sinais clínicos da enfermidade (Travi et al., 2001). Menezes-Souza et al., (2011), avaliaram a expressão de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e imunorreguladoras em pele sem lesões de cães assintomáticos, naturalmente infectados, e observaram uma resposta imune celular mista com característica tanto de Th1 como de Th2. Adicionalmente, baixa expressão FoxP3 também foi correlacionada com a ausência de manifestações clínicas. Os dados obtidos indicam que a infecção em animais assintomáticos ou em cães com baixo parasitismo de pele, uma mistura de resposta inflamatória e imune reguladora deve ser relevante para a manutenção do estado clínico e, também para a manutenção dos baixos níveis de replicação do parasita.

A análise histopatológica dos linfonodos dos cães infectados do nosso estudo, não mostrou diferença significativa entre os grupos clínicos e se caracterizou, de maneira geral, por hiperplasia e hipertrofia da região cortical e paracortical com ativação folicular evidente, além de hiperplasia e hipertrofia de macrófagos nos seios e cordões medulares, com a presença de reação granulomatosa em alguns casos; achados estes compatíveis com os já descritos na literatura por outros autores (Lima et al., 2004; Moreira et al., 2007). Animais sintomáticos com alto grau de parasitismo mostram por vezes hipotrofia folicular com heterogeneidade celular na região cortical, semelhante ao descrito na leishmaniose visceral experimental em hamster (Corbett et al., 1992). Em relação à carga parasitária no linfonodo poplíteo, os dados obtidos em nosso estudo diferem daqueles publicados por Alves et al. (2009), os quais observaram que, linfonodos de cães assintomáticos tiveram alta expressão de citocinas pró-inflamatórias e baixo número de parasitos, enquanto que linfonodos de cães sintomáticos expressaram mais citocinas anti-inflamatórias e alta carga parasitária. Nossos resultados mostraram semelhança no número de formas amastigotas/mm<sup>2</sup> no linfonodo poplíteo de cães sintomáticos e assintomáticos ( $p=0,2401$ ), corroborando com os resultados encontrados por Sanchez et al. (2004).



Em relação ao estudo histopatológico do baço, nossos resultados também não apontam para diferença significativa das lesões entre os grupos clínicos, sintomático e assintomático. De maneira geral, os cães infectados, apresentavam uma hiperplasia folicular na polpa branca que variou de discreta, moderada a intensa; porém em alguns animais, a hipoplasia e até atrofia desta área estavam presentes. As alterações histológicas da polpa vermelha caracterizaram-se por hipertrofia e hiperplasia de macrófagos em caráter moderado à intenso, com a presença de nódulos macrofágicos, esboço granulomatoso, assim como a presença de granulomas epitelióides bem formados com células gigantes. Estes achados vêm de encontro aos já descritos por Tafuri et al., (1996). Quanto ao número de formas amastigotas/mm<sup>2</sup> detectadas no baço, comparativamente entre os grupos clínicos, nosso estudo mostrou que não houve diferença significativa ( $p=0,8869$ ), o que difere dos resultados encontrados por Sanchez et al.,(2004), cujo parasitismo esplênico em cães sintomáticos foi duas vezes maior do que o parasitismo do baço dos animais assintomáticos.

Devemos ressaltar que, da mesma maneira que a pele, o baço e o linfonodo também mostraram uma grande dispersão dos resultados. Este achado pode ser decorrente do tempo de evolução da infecção ser diferentes nos animais e devido ao fato que alguns animais apresentaram achados clínicos severos da doença logo após a infecção; enquanto outros demoram meses para demonstrar manifestações clínicas da doença, dependendo das características genéticas e imunológicas individuais do hospedeiro canino. Enquanto que os animais suscetíveis mostram-se incapazes de desenvolver uma imunidade celular efetiva e mostram uma forte, mas não efetiva resposta humoral, os animais resistentes desenvolvem uma forte resposta imune celular do tipo Th1, com a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Barbieri, 2006; Baneth et al., 2008). Devemos salientar que os animais do grupo assintomático apresentaram um importante parasitismo de baço e linfonodo, o que pode estar refletindo características de animais suscetíveis em período pré-patente da doença.

Importante salientar que a presença, assim como o grau das alterações histológicas, tanto na pele quanto no linfonodo e baço, estiveram associadas diretamente ao parasitismo tecidual; portanto, quanto maior o parasitismo maior eram as lesões teciduais observadas.

Já no que se relaciona ao número de macrófagos expressando o marcador iNOS<sup>+</sup> na pele dos animais infectados, tanto os sintomáticos ( $p=0,0004$ ) como os assintomáticos ( $p=0,0038$ ), observou-se um aumento em relação aos animais controle, não infectados, mostrando que a infecção por *Leishmania* leva a uma ativação celular dos macrófagos com consequente produção de NO, como relatado na literatura (Sisto et al., 2001). Porém quando se compara o número de macrófagos positivos para iNOS de cães sintomáticos e assintomáticos, não se observa diferença significativa ( $p=0,3026$ ) entre os grupos clínicos. No linfonodo poplíteo, também não foi observado diferença significativa ( $p=0,3257$ ) entre a média de macrófagos iNOS<sup>+</sup> de cães sintomáticos e assintomáticos; porém, houve diferença significativa entre os cães sintomáticos e controle ( $p=0,0012$ ) e entre cães assintomáticos e o controle ( $p=0,0002$ ). O mesmo foi observado no tecido esplênico, a infecção por *Leishmania* levou a um aumento na expressão de células iNOS<sup>+</sup>, tanto no grupo sintomático ( $p=0,0009$ ) como no grupo assintomático ( $p=0,0008$ ) em relação ao controle, porém quando os grupos clínicos foram comparados entre si, não se observou diferença no número de macrófagos iNOS<sup>+</sup> ( $p=0,5940$ ). Estes achados vêm de encontro aos relatos de Panaro et al., (2008), que demonstraram que macrófagos derivados de PBMC infectados *in vitro* por *L. infantum*, produziam um aumento das concentrações de NO, quando comparados à macrófagos não infectados. Por outro lado, Dos Santos et al., (2011) observaram que animais sintomáticos e oligossintomáticos expressavam mais iNOS em macrófagos de baço, quando comparados à animais assintomáticos, mostrando que houve um aumento na expressão do iNOS associado à severidade da doença, sendo mais frequente nos animais com alto parasitismo.

Quando analisamos a correlação entre a densidade de células iNOS<sup>+</sup> e a densidade de parasitas nos diferentes tecidos, observamos uma correlação negativa, porém fraca e não significativa ( $r = -0,1115$ ;  $p = 0,5719$ ) na pele; ao passo que em vísceras esta correlação foi moderada e significativa, tanto em linfondo ( $r = -0,5342$ ;  $p = 0,0034$ ) como em baço ( $r = -0,4669$ ;  $p = 0,0329$ ). Estes dados apontam para um possível papel do NO no controle do número de formas amastigotas intracelulares em vísceras, uma vez que a avaliação da produção de óxido nítrico, através da expressão de iNOS<sup>+</sup>, tem sido reportado por vários autores como uma regra fundamental para na destruição de parasitas do gênero *Leishmania* *in vitro* (Bogdan et al., 2000; Gantt et al., 2001; Sisto et al., 2001). Cultura de macrófagos derivados de células mononucleares de sangue periférico de cão e, infectadas com *L. infantum*, após ativação pelo INF- $\gamma$  recombinante mostram aumento na produção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas (Sisto et al., 2001), que é capaz de induzir a apoptose de formas amastigotas intracelulares do parasita (Holzmuller et al., 2005; Holzmuller et al. 2006), sugerindo que o NO atua no controle da infecção de macrófagos caninos por *Leishmania*. Recentes estudos demonstraram que macrófagos caninos infectados por *L. infantum*, quando cocultivados com linfócitos autólogos periféricos oriundos de cães imunizados, apresentaram um efeito leishmanicida significativo, devido sua ativação pelo IFN- $\gamma$  com aumento na produção de NO (Holzmuller et al., 2005). A produção de NO e a atividade leishmanicida foram também detectadas em macrófagos canino infectados com *L. (L.) infantum* após incubação com IFN- $\gamma$  TFN- $\alpha$  e IL-2 (Pinelli et al., 2000); e também em macrófagos de cães imunizados com promastigotas mortas de *L. (L.) infantum* (Panaro et al., 2001).

Porém, é importante salientar que a produção de NO está relacionada com aspectos da imunidade celular e, conseqüentemente, com o estadiamento da infecção. Panaro et al. (2008) demonstraram que nos primeiros quatro meses da infecção, os níveis de NO no sobrenadante de macrófagos infectados por *Leishmania* foram maiores em cães sintomáticos do que em cães assintomáticos. Entretanto em uma segunda avaliação, oito meses após o primeiro diagnóstico, os

autores encontraram níveis maiores de NO nas culturas de macrófagos provenientes de cães assintomáticos quando comparado aos sintomáticos. Isto vem ao encontro do fato de não conhecermos com precisão o período de infecção dos cães utilizados do presente estudo, uma vez que, trabalhamos com cães oriundos do Centro de Controle de Zoonoses. Talvez esta seja uma possível explicação da fraca correlação encontrada neste estudo entre a densidade de células iNOS<sup>+</sup> e a densidade de parasitas na pele, uma vez que o envolvimento cutâneo na LVC tem dois momentos importantes, um logo após a transmissão e outro na doença plenamente manifesta, relacionada à supressão da resposta imune celular, quando observada a disseminação dos parasitas por todo o organismo, incluindo o tegumento.

Além disto, não se pode excluir o papel dos metabólitos derivados do oxigênio na destruição de formas amastigotas de *Leishmania* controlando o parasitismo intracelular, já descrito desde a década de 80 (Murray, 1982). Pearson e Sousa (1981) demonstraram que leucócitos polimorfonucleares podem fagocitar e eliminar formas promastigotas de *L. donovani* através de mecanismos oxidativos, uma vez que o protozoário estimula a produção de superóxidos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disto, Gantt et al. (2001) demonstraram que macrófagos murinos e humanos produzem o radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> durante a fagocitose de promastigotas de *Leishmania* e sugerem que ele aumenta a atividade leishmanicida do macrófago, uma vez que sua inibição levou a um aumento do número de parasitas intracelulares. Desta forma, ambos, radicais derivados tanto do oxigênio como do nitrato contribuem para a morte intracelular de parasitas do gênero *Leishmania*, e um aumento somente na expressão de iNOS pode não necessariamente estar associado à redução do parasitismo tecidual.

Sumarizando, nossos resultados mostraram alterações histopatológicas em pele, baço e linfonodo de cães com leishmaniose visceral de diferentes grupos clínicos, que variaram de intensidade com o grau do parasitismo tecidual; e que por sua vez, não mostraram diferenças em relação ao *status* clínico dos animais. A infecção por *Leishmania* levou a um aumento na expressão de iNOS nos

diferentes tecidos, a qual também não diferiu entre os animais sintomáticos e assintomáticos. A carga parasitária de baço e linfonodo mostrou-se inversamente proporcional a expressão de iNOS, sugerindo que o óxido nítrico tem um papel importante no controle do parasitismo em vísceras. Porém em pele, esta correlação apesar de presente, foi bem fraca e não significativa, apontando para uma possível resposta heterogênea no tegumento, tanto quanto à localização quanto ao período de evolução da doença.

***Conclusão***

---

## 6. CONCLUSÃO

- Os cães com leishmaniose visceral mostraram lesão de pele, que foi caracterizada por um infiltrado inflamatório crônico inespecífico na derme, formado principalmente por macrófagos infectados. A intensidade da lesão cutânea se correlacionou com o grau do parasitismo tecidual, os quais não mostraram diferenças entre animais sintomáticos e assintomáticos.
- As lesões dos órgãos linfoides foram caracterizadas por reatividade das áreas linfocitárias, hiperplasia e hipertrofia de macrófagos que continham formas amastigotas do parasita. A intensidade das lesões se correlacionou com o grau do parasitismo tecidual, os quais não mostraram diferenças entre animais sintomáticos e assintomáticos.
- A infecção por *Leishmania* levou a um aumento na expressão de iNOS em pele, baço e linfonodo dos cães, sendo de intensidade semelhante entre os animais sintomáticos e assintomáticos.
- A densidade de células iNOS+ mostrou correlação negativa com a densidade de parasitas em baço e linfonodo, mas não na pele de cães com leishmaniose visceral.

***Anexos***

---



## 7. ANEXOS

### 7.1 ANEXO A – Aprovação CEP-FMUSP




A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17.11.2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **296/10** intitulado: **"Leishmaniose Visceral Canina: caracterização das lesões histológicas em pele e linfonodo, e correlação do parasitismo tecidual com a expressão de iNOS."**, apresentado pelo **Departamento de Patologia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, ( Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).


**Pesquisador (a) Responsável: Marcia Dalastra Laurenti**

**Pesquisador (a) Executante: Françoise Pereira Sanches**

CEP-FMUSP, 17 de novembro de 2010.



**Dr. Eduardo Pompeu**  
Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais



**Prof. Dr. Eduardo Massad**  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa

## ***Referências Bibliográficas***

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches, P; Silva-Pereira, MCD; Conceição-Silva, F; Santos-Gomes, GM; Janz, JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *Journal of Parasitology*.1991; 77: 557-561.

Adler, S; Theodor, O. Skin infection in canine visceral leishmaniasis. *British Medical Journal*. 1931; 2: 117.

Alencar, JE. Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Fortaleza, Imp. Oficial. Tese da Faculdade Federal do Ceará, 1959.

Alexandre-Pires, G; Pais, D; Correia, M; Pina, JA. Leishmaniasis – a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microsc.Res. Tech*. 2006; 69: 227-235.

Alves, CF; Amorim, IFG; Moura, EP; Ribeiro, RR; Alves, CF; Michalick, MS; Kalapothakis, E; Bruna-Romero, O; Tafuri, WL; Teixeira, MM; Melo, MN.Expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ; IL-10 and TGF- $\beta$  in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009; 128: 349-358.

Atanaskova, E; Kocevski, Z; Nikolovski, G; Stedanovska, J. Case report of canine co-infection with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Mac. Vet. Rev*. 2011; 34: 19-24.

Baneth, G. Leishmaniasis. In: Greene, GE, ed. Infectious Diseases of the dog and cat. 3rd edn. Philadelphia, WB Saunders. 2005: 685-95.

Baneth, G; Koutinas, AF; Solano-Gallego, L; Bourdeau, P; Ferrer, L. Canine Leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*.2008; 24: 324-330.

Bañus, AL; Hide, M; Prugnolle, F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite generic update an advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*. 2007; 64: 1-109.

Badaró, R; Duarte, M.I.S. Leishmaniose Visceral (Calazar).In Veronesi, R.; Focaccia, R. Tratado de infectologia.São Paulo: Editora Ateneu. 1996: 1234-59.

Baker, R; Chiodini, P; Kaye, P. Leishmaniasis. In: James, DG; Zumla, A ed. *The Granulomatous Disorders*. Cambridge University Press. 1999: 212-34.

Barbieri, CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 2006; 28: 329-337.

Belkaid, Y; Hoffmann, KF; Mendez, S; Kamhawi, S; Udey, MC; Wynn, TA; Sacks, DL. The role of interleukin (IL) -10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. 2001; 194: 1497-1506.

Berrahal, F; Mary, C; Roze, M; Berenger, A; Escoffier, K; Lamouroux, D; Dunan, S. Canine leishmaniasis: Identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1996; 55: 273-277.

Binhazim, AA; Champman, WL; Shin, SS; Hanson, WL. Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania leishmania infantum* in hamsters and dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 1993; 54: 113-21.

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*. 1997; 9: 439-40.

Bogdan, C; Rollinghoff, M; Diefenbach, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12: 64-76.

Cabral, M; O'Grady, J; Alexander, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite immunol*. 1992; 14: 531-9.

Carrillo, E; Ahmed, S; Goldsmith-Pestana, K; Nieto, J; Osorio, Y; Travi, B; Moreno, J; McMahon-Pratt, D. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2007; 25 (8): 1534-1543.

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*. 1997; 141 (21): 539-543.

Chamizo, C; Moreno, J; Alvar, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005; 103:67-75.

Colombo, FA; Odorizzi, RM; Laurenti, MD; Galati, EA; Canavez, F; Pereira-Chiocola, VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol. Res.* 2011; 109: 267-274.

Correa, AP; Dossi, AC; De Oliveira Vasconcelos, R; Munari, DP; De Lima, VM. Evaluation of transformation growth factor beta 1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Parasitol.* 2007; 143: 267-274.

Corbett, CE; Paes, RA; Laurenti, MD; Andrade Junior, HF; Duarte, MI. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.* 1992; 73: 417-433.

Costa CA; Genaro, O; Lana, M; Magalhaes, PA; Dias, M; Michalick, SM; Melo, MN; Costa, RT; MagalhaesRocha, NM; Mayrink, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1991; 24: 21-5.

Costa, FA; Goto, h; Saldanha, LC; Silva, TC; Senhorini, IL; Guerra, JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology.* 2003; 40: 677-84.

Courtenay, O; Quinzel, RJ; Garcez, LM; Shaw, JJ; 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.* 2002; 186: 1314-20.

Cringoli, G; Rinaldi, L; Capuano, Baldi, L; Veneziano, V; Capelli, G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Veterinary Parasitology.* 2002; 106 (4): 307-13.

Cunha, AM; Chagas, E. Estudo sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1937; 32: 329-337.

Cunha, AM. Infecções experimentais na leishmaniose visceral americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1938; 33: 581-598.

Dantas-Torres, F; Lorusso, V; Testini, G; de Paiva-Cavalcanti, M; Figueredo, LA; Stanneck, D; Mencke, N; Brandão-Filho, SP; Alves, LC; Otranto, D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. 2010; *Parasitol Res*; 106 (4): 857-60.

Deane, LM.; Deane, MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral Ceará. *O Hospital*.1955; 47: 75-87.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 2004; 27: 305-318.

Dos Santos, FR; Vieira, PMA; Correa-Oliveira, R; Giunchetti, RC; Carneiro, CM; Reis, AB; Malaquias, LCC. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Parasitol Res*. 2011; 108: 1397-1403.

Dujardin, JC. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends in Parasitology*.2006; 22: 4-6.

Evans, TG; Vasconcelos, IAB; Lima, JW; Teixeira, JM; McAullife, IT; Lopes, UG; Pearson, RD; Vasconcelos, AW. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg*.1990: 42: 118-123.

Ferrer, L; Rabanal, RM; Domingo, M; Ramos, JA; Fondevila, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci*. 1988; 194-6.

Ferrer, L. Leishmaniasis. In: KIRK, RW; BONAGURA, JD.Kirk's current veterinary therapy. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. P. 266-270.

Ferrer, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: an update. Proceeding of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona-Spain. 1999: 6-10.

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

Ferrer, L. Simultaneous presentation of leishmaniasis and other infectious diseases: clinical approach and mechanisms. In: Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis. Naples, Italy, SCIVAC.2004; 37-38.

Feitosa, MM; Ikeda, FA; Luvizotto, MCR.; Perri, SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária*. 2000; 28: 36-44.

Gantt, KR; Goldman, TL; McCormick, ML; Miller, MA; Jeronimo, SM; Nascimento, ET; Britigan, BE; Wilson, ME. Oxidative responses of human and murine

macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Journal of Immunology*. 2001; 167: 893-901.

Gaskin, AA; Schantz, P; Jackson, J, Birkenheuer, A; Tomlinson, L; Gramiccia, M; Levy, M; Steurer, F; Kollmar, E; Hegarty, BC; AHN, A; Breitschwerdt, EB. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2002; 16 (1): 34-44.

Giunchetti, RC; Mayrink, W; Genaro, O; Carneiro, CM; Correa-Oliveira, R; Martins-Filho, OA; Marques, MJ; Tafuri, WL; Reis, Ab. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *Journal of Comparative Pathology*. 2006; 135: 100-7.

Giunchetti, R; Mayrink, W; Carneiro, CM; Corrêa-Oliveira, R; Martins-Filho, OA; Marques, MJ; Tafuri, WL; Reis, AB. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*. 2008; 84 (2): 269-277.

González, JL; Rollán, E; Novoa, C et al. Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. *Histology and Histopathology*. 1988; 3: 323-9.

Gradoni, L. Diagnosis of canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick, R ed. Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, Intervet International BV. 2002: 7-14.

Gradoni, L; Foglia Manzillo, V; Pagano, A; Piantedosi, D; De Luna, R; Gramiccia, M; Scalone, A; Di Muccio, T; Oliva, G. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*. 2005; 23 (45): 5245-51.

Guarga, JL; Lucientes, J; Garcia, MJ; Peribanez, MA; Alvar, J; Castillo, JA. 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*. 2000; 69: 249-253.

Guerra, L; Teixeira-Carvalho, A; Giunchetti, R; Martins-Filho, O; Reis, A; Corrêa-Oliveira, R. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*. 2009; 3: 611-622.

Hervás-Rodríguez, J; Mozos, E; Méndez, A; Pérez, J; Gómez-Villamandos, JC..Leishmania infection of canine skin fibroblasts *in vivo*.*Veterinary Pathology*.1996; 33: 469-73.

Herwaldt, BL. Leishmaniasis. *Lancet*.1999; 354: 1191-99.

Holzmueller, P; Cavaleyra, M; Moreaux, J; Kovacic, R; Vincendeau, P; Papierok, G; Lemesre, JL.. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide mediated amastigote apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.2005; 106: 247-57.

Holzmueller, P, Hide, M; Sereno, D, Lemesre, D. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on *in vitro* parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infection, Genetics and Evolution*.2006; 6: 187-197.

International Commission on Zoological Nomenclature.International Code of Zoological Nomenclature.The International Trust for Zoological Nomenclature, London. 1999: 1- 306.

IRIS, 2006. Disponível em: <<http://www.iris-kdney.com>> Acesso em: março 2013.

Kamhawi, S; Belkaid, Y; Modi, G; Rowton, E; Sacks, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sandflies. *Science*.2000; 290: 1351-54.

Keenan, CM, Hendricks, LD, Lightner, L., Webster, HK; Johnson, AJ.Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog. I. Infection, clinical disease and clinical pathology. *Vet. Pathol*. 1984a; 21: 74-9.

Keenan, CM, Hendricks, LD, Lightner, L, Johnson, AJ. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog. II. *Pathology. Vet. Pathol*. 1984b; 21: 80-6.

Killick-Kendrick, R; Killick-Kendrick, M.Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick, R. ed. *Canine Leishmaniasis: an update*. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum.Barcelona, Spain. Hoechst Roussel Vet. 1999: 26-31.

Koutinas, AF, Polizopoulou, ZS, Saridomichelakis MN; Argyriadis, D; Fytianon, A; Pleuraki, KG.Clinical consideration on canine leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J. Am Anim Hosp Assoc*. 1999; 35:376-383.



Lainson, R; Shaw, JJ. Ecology and epidemiology: new world. In: Peters, W.; Killick-Hendrick, R. (Ed.). *The leishmaniasis in biology and medicine.* London: *Academic Press* .1987;1: 291-363.

Lage, R; Oliveira, G; Busek, S; Guerra, LL; Giunchetti, RC; Corrêa-Oliveira, R; Reis, AB. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007; 153 (1-2): 135-145.

Lanotte , G; Rioux, JA; Pereires, J; Valhardt, V. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France 10 Les formes evolutives de la leishmaniose visceral canine. Elaboration d`une typologie bioclinique a finalite epidemiologique. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1979, 54: 277-95.

Laurenti, MD; Rossi, CN; Matta, VLR; Tomokane, TY; Corbett, CEP; Secundino, NFCS; Pimenta, PFP; Marcondes, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Veterinary Parasitology*. 2013; 13 (no prelo) . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>> Acesso em: março 2013.

Levy, E; Mylonakis, ME; Saridomichelakis, MN; Polizopoulou, ZS; Psychogios, V; Koutinas, AF.. Nasal and oral masses in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*. 2006; 35: 115-8.

Li , H; Poulos, TL. Structure-functions studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem*. 2005; 99: 293-305.

Liew , FY; O´Donell, CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitology*. 1993; 32: 161-259.

Liew FY;Wei XQ;Proudfoot L.Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections.*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997 Sep 29;352(1359):1311-5

Lima, WG; Michalick, LA; Campos, MB; Chagas, EJ; Laurenti, MD; Corbett, CEP; Lainson, R; Silveira, FT. 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*. 2010; 52: 259-265.

Lima, WG; Michalick, MMS; Melo, MN; Tafuri, WL; Tafuri, WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*.2004; 92: 43-53.

Longstaffe, JA; Jefferies, AR; Kelly, DF; Bedford, PGC; Herrtage, ME; Darke, PGG. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potential human health hazard. *Small Anim. Pract.* 1983; 24: 23-30.

Luvizotto, MCR; Biazzono, L; Eugenio, FR; Andrade, AL; Moreira, MAB. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba — SP. Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais. Anais, 2, 1999.

Madeira, MF; Schubach, AO; Schubach, TMP; Leal, CA; Marzochi, MCA. 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.* 2004; 8: 440-4.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saúde Pública.* 2008; 24(12): 2941-47.

Manna, L; Reale, S; Viola, E; Foglia Manzillo, V; Pavone, LM; Caracappa, S; Gravino, AE. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology.* 2006; 142: 271-80.

Manna, L; Reale, S; Vitale, F; Picillo, E; Pavone, LM; Gravino, AE. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal.* 2008; 177: 279-82.

Marletta, MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Tox.* 1988; 1: 249-257.

Martinez-Moreno, A; Moreno, T; Martinez-Moreno, FJ; Acosta, I; Hernandez, S. Humoral and cell-mediated immunity natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995; 48: 209-220.

Marzochi, MCA; Marzochi, KBF; Carvalho, RW. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitology Today.* 1994; 10: 34-37.

Mekuzas, Y; Gradoni, L; Oliva, G; Foglia, Manzillo, V; Banth, G. Ehrlichia canis and *Leishmania infantum* co-infection: a 3 year longitudinal study in naturally exposed dog. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 15 (Suppl 2): 30-31.

Menezes-Souza, D; Corrêa-Oliveira, R; Guerra-Sá, R; Giunchetti, RC; Teixeira-Carvalho, A; Martins-Filho, OA. Cytokine and transcription factor profiles in the skin

of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. *Vet Parasitol.* 2011; 177 (1-2): 39-49.

Miranda, S; Roura, X; Picado, A; Ferrer, L; Ramis, A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. *Research in Veterinary Science.* 2008; 85 (1): 35-8.

Moreira, EDJr; Mendes de Souza, VM; Sreenivasam, M; Nascimento, EG; Pontes de Carvalho, L. Assesment of an optimized dog-culling program in the dynamic of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol.* 2004; 122 (4): 245-52.

Moreira MA.; Luvizotto MC.; Garcia JF.; Corbett, CEP; Laurenti, MD. Comparasion of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet. Parasitol.* 2007; 145: 245-252.

Moreno, J; Alvar, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimmental model. *Trends in Parasitology.* 2002; 18: 399-405.

Mozos, E; Pérez, J, Day, MJ; Lucena, R; Ginel, PJ.. Leishmaniasis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology.* 1999; 120: 257-68.

Murray, HW. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis II oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Immunol.* 1982; 129: 351-7.

Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Lazaridis V, Leontides LS, Kostoulas P, Koutinas AF. A retrospective study of 61 cases of spontaneous canine epistaxis (1998 to 2001). *J Small Anim Pract.* 2008 Apr;49(4):191-6. Epub 2007 Sep 7.

Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6: 3051-3064.

Nicolas, L; Sidjanski, S; Colle, JH; Milton, G. *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study with laboratory mice. *Infection and Immunity.* 2000; 68: 6561-66.

Nunes, CM; Lima, VM; Paula, HB; Perri, SH; Andrade, AM; Dias, FE; Burattini, MN. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 2008; 153: 19-23.

Otranto, D. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol.* 2009; 25: 157-163.

Panaro, MA; Acquafredda A; Lisi S; Lofrumento DD; Mitolo V; Sisto M; Fasanella A; Trotta T; Bertani F; Consenti B; Brandonisio O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2001; 24: 187-195.

Panaro, MA; Brandonisio, O; de Caprariis, D; Carvalho, P; Cianciulli, A; Mitolo, V; Otranto, D. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role of nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? *Parasite Vectors.* 2008; 1:10.

Paranhos-Silva, M; Freitas, LAR; Santos, WC; Grimaldi Jr, G; Pontes-De-Carvalho, LC; Oliveira-Dos-Santos, AJ. Across-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 55: 39-44.

Pearson, RD; Steigbigel, RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Immunology.* 1981; 127: 1438-43.

Pearson, RD; Sousa, AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Disease.* 1996; 22: 1-13.

Pinelli, E; Killick-Kendrick, R; Wagenaar, J; Bernardina, W; Del Real, G; Ruitenber, EJ. Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immunity.* 1994; 62: 229-335.

Pinelli, E; Gonzalo, RM; Boog, CJ; Rutten, VP; Gebhard, D; del Real, G; Ruitenber, J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 1594-1600.

Pinelli, E; Gebhard, D; Mommaas, AM; van Hoeji, M; Langermans, JA; Ruitenber, EJ; Rutten, VP. Infection of a canine macrophages cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet. Parasitol.* 2000; 92: 181-9.

Pocai, EA; Frozza, L; Headley, SA; Graça, DL. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco anos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural.* 1998; 28: 501-5.

Postigo C; Llamas R; Zarco C; Rubio R; Pulido F; Costa JR; Iglesias L. 1997. Cutaneous lesions in patients with visceral leishmaniasis and HIV infections. *Journal of Infection*. 1997; 35: 265-8.

Queiroz, NM de; Da Silveira, RC; De Noronha JR, AC; Oliveira, TM; Machado, RZ; Starke-Buzetti, WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Veterinary Parasitology*. 2011; 178 (1-2): 1-8.

Quinnell RJ; Courtenay O; Davidson S, Garcez L; Lambson B; Ramos P; Shaw JJ; Shaw MA; Dye C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*. 2001; 122 (3): 253-61

Quinnell, RJ; Kennedy, LJ; Barnes, A. et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*. 2003; 52: 23-8.

Reis, AB; Teixeira-Carvalho, A; Giunchetti, RC; Guerra, LL; Carvalho, MG; Mayrink, W; Genaro, O; Correa-Oliveira, R; Martins-Filho, OA. 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*. 2006a; 146: 303-11.

Reis, AB; Teixeira-Carvalho, A; Vale, AM; Marques, MJ; Giunchetti, RC; Mayrink, W; Guerra, LL; Andrade, RA; Correa-Oliveira, R; Martins-Filho, OA. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks of clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2006b; 112: 102-116.

Reis, AB; Martins-Filho, OA; Teixeira-Carvalho, A; Giunchetti, RC; Carneiro, CM; Mayrink, W; Tafuri, WL; Corrêa-Oliveira, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009; 128: 87-95.

Reis, AB; Giunchetti, RC; Carrillo, E; Martins-Filho, OA; Moreno, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 2010; 26: 341-349.

Rodrigues, CA; Batista, LF; Teixeira, MC; Pereira, AM; Santos, PO; De Sa Oliveira, GG; De Freitas, LA; Veras, PS. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. *Vet. Parasitol.* 2007; 143: 197-205.

Rutten, VPMG. Immune responsiveness in canine leishmaniasis. In: Proceedings of the 19th ECVD-ESVD Annual Congress, Tenerife, Spain. 2003: 105-7.

Saint-André Marchal, I; Marchal, T; Moore, PF; Magnol, JP; Bourdoiseau, G. Infection of canine Langerhans cells and interdigitating dendritic cells by *Leishmania infantum* in spontaneous canine leishmaniasis. *Revue de Medecine Veterinaire*.1997; 148: 29-36.

Saldarriaga, OA; Travi, BL; Park, W; Perez, LE; Melby, PC. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine*. 2006; 24 (11): 1928-40.

Salomón, OD. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.2008; 103: 109-111.

Salomón, OD. *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2011; 106: 381-382.

Sanchez, MA; Diaz, NL; Zerpa, O; Negron, E; Convit, J; Tapia, FJ. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Hyg*. 2004; 70: 618-624.

Sanchez-Robert, E; Altet, L; Sanchez, A. et al. Polymorphism of Slc 11a1 (Nramp 1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *Journal of Heredity*.2005; 96: 755-8.

Sanchez-Robert E, Altet L, Alberola J, Rodriguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timon M, Sanchez A, Francino O. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008 Sep 15;125(1-2):168-75.

Santa Rosa, ICA; Oliveira, ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clínica Veterinária*. 1997; 11: 24-8.

Santos, WLC; Badaró, JDR; de Freitas, LAR. Associations between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*. 2004; 92: 89-94.

Santos, WLC; Jesus, EE; Paranhos-Silva, M; Pereira, AM; Santos, JC; Baleeiro, CO; Nascimento, EG; Moreira, ED; Oliveira, GGS; Pontes-de-Carvalho, LC. 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*. 2008; 123 (3-4): 251-9.

Santos, PL; Costa, RV; Braz, JM; Santos, LFVC; Batista, AC; Vasconcelos, CRO; Rangel, MR; Ribeiro de Jesus, A; Moura, TR; Leopoldo, PTG; Almeida, RP. *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. *Nitric Oxide*.2012; 27: 67-71.

Saridomichelakis, MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermat*. 2009; 20: 471-489.

Shaw JJ, Lainson R, Ryan L, Braga RR, McMahon-Pratt D, David JR. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis* *braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(1):69-72.

Shaw, JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of America Visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.2006; 101(5): 577-579.

Silveira, FT; Lainson, R; Corbett, CEP. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – a Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*. 2004; 99: 239-251.

Silveira, FT; Lainson, R; Corbett, CEP. Further observations on clinical histopathological and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*. 2005; 100: 525-534.

Sisto, M; Brandonisio, O; Panaro, MA; Acquafredda, A; Leogrande, D; Fasanella, A; Trotta T; Fumarola L; Mitolo V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comp. Immunol. Microbial. Infec. Dis*. 2001; 24: 247-254.

Slappendel, RJ.; Greene, CE. Leishmaniasis. In: Greene, CE. Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W.B.Saunders. 1990: 450-458.

Slappendel, RJ.; Ferrer, L. Leishmaniasis. In: Greene, CE. Infectious diseases of the dog and cat 2. Ed. Philadelphia: WB Saunders. 1998: 450-8.

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 dog. *Journal of Comparative Pathology*. 2004; 130: 7-12.

Solano-Gallego, L.; Koutinas, A; Miró, G; Cardoso, L; Pennisi, MG; Ferrer, L; Bourdeau, P; Oliva, G; Baneth, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2009; 165: 1-18.

Sundar; S; Rai, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002; 9: 951-8.

Tafuri, WL; Tafuri, WL; Barbosa, AJ; Michalick, MS; Genaro, O; França-Silva, JC; Mayrink, W; Nascimento, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1996; 38: 81-9.

Tafuri, WL.; De Oliveira, MR; Melo, MN.; Tafuri, WL. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol*. 2001; 96: 203-212.

Tomaz-Soccol, V; Castro, EA; Navarro, IT; de Farias, MR; de Souza, LM; Carvalho, Y; Bispo, S; Membrive, NA; Minozzo, JC; Truppel, J; Bueno, W; Luz, E. Allochthonous cases of canine visceral leishmaniasis in Paraná, Brazil: epidemiological implications. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2009; 18: 46-51.

Torres, CM. Alterações cutâneas do cão no ka-lazar sul-americano. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1941; 36: 37-67.

Travi, B; Osorio, E; Saldarriga, OA; Cadena, H; Tabares, CJ; Peniche, A; Lee, S; Melby, PC.. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand-fly derived *Leishmania chagasi* promastigotes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009; 81 (6): 994-1003.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 64(3-4):119-24.

Viñuelas, J; García-Alonso, M; Ferrando, L; Navarrete, I; Molano, I; Mirón, C; Carcelén, J; Alonso, C; Nieto, CG. Meningeal leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. 2001; 101: 23-7.



Vouldoukis, I; Drapier, JC; Nussler, AK; Tselentis, Y; Da Silva, OA; Gentilini, M; Mossalayi, DM; Monjour, L; Dugas, B. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996; 40: 253-6.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en>. Acesso em: janeiro 2008.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en>. Acesso em: fevereiro 2011.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. 2012. Disponível em: [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en). Acesso em: maio 2013.

Yamamoto, Y.; Nunes, VLB.; Junior, F.R.; Oshiro, ET.; Dorval, MEMC.; Estudo da eficiência das reações de imunofluorescência e de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leishmaníose visceral em cães. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo* . 1988; 25: 143-152.

Zafra, R; JABER, JR; Pérez-Écija, RA; Barragán, A; Martínez-Moreno, A; Pérez, J. High INOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008; 123:353-359.