

ALINE DE ANDRADE CARVALHO

**DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E
SUA ASSOCIAÇÃO COM O INFILTRADO INFLAMATÓRIO NEUTROFÍLICO**

TERESINA/PI

2011

ALINE DE ANDRADE CARVALHO

**DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E
SUA ASSOCIAÇÃO COM O INFILTRADO INFLAMATÓRIO NEUTROFÍLICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

TERESINA/PI

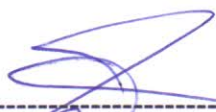
2011

**DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E
SUA ASSOCIAÇÃO COM O INFILTRADO INFLAMATÓRIO NEUTROFÍLICO**

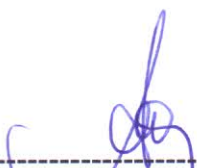
ALINE DE ANDRADE CARVALHO

Dissertação Aprovado em: 23.09.2011

Banca Examinadora:



**Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa– DCCV/CCA/UFPI
(Presidente)**



**Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta (Titular) / UEMA
(Examinadora Externa)**



**Profa. Dra. Maria das Graças Prianti / DCCV-CCA-UFPI
(Examinadora Interna)**

TERESINA - PI

2011

"Deus nos concede a cada dia uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela corre por nossa conta."

Chico Xavier

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista
através de apoio, carinho e ensinamento.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por todas as graças concebidas.

Ao meu orientador, Francisco Assis Lima Costa, que contribuiu diariamente para realização deste trabalho, a quem eu tenho muito respeito e admiração.

A prof^a, Alcina Vieira, pela sua participação na banca e contribuição ao enriquecimento da dissertação.

À prof^a, Maria das graças Prianti, por seu apoio, conselhos e carinho, que sempre foi uma pessoa muito querida.

Aos meus amigos de laboratório Prof^a Silvana, Georgia, Larissa, Karina, Ângela, Lucilene, Ciro, Francisco Leite, Lidiany, Luciano, Dayane, Raquel, pela amizade e carinho, e em especial aos meus amigos de coleta Flaviane, Nilton, Fernando, Kleverton, que foram essenciais para a execução desse projeto. A vocês minha eterna gratidão.

Aos amigos, Caliandra, Paulo Alex, Ricardo, Gustavo, por todos os momentos difíceis e felizes que passamos juntos.

Aos técnicos do laboratório de Histopatologia do CCA, Eduardo Brás e Manuel de Jesus, pela confecção das lâminas para análise.

À Gerência de Zoonoses de Teresina/PI e ao Hospital Veterinário Universitário (UFPI), pela colaboração e dedicação dos funcionários no fornecimento de animais para a realização da pesquisa.

Aos cães sacrificados para a realização do meu experimento.

Aos professores da Pós- graduação em ciência animal (UFPI), pelo incentivo.

Aos funcionários da Pós-graduação, Luiz e Vicente, sempre prestativos.

A FAPEPI pela assistência financeira através da bolsa estudo

Aos meus sogros: Valdir e Mercês, cunhadas: Valdívnia e Vanessa, e sobrinhos: Valdir Neto e João Mateus, pelo incentivo e carinho.

Ao meu pai Luiz Sampaio por ser meu referencial de vida, por ter me ensinado a ser uma pessoa melhor e por não ter medido esforços pra me educar da melhor maneira possível.

À minha mãe Adelaide Andrade por todo o amor dedicado a mim, por sempre está comigo nas horas difíceis e por ser meu porto seguro.

Ao meu irmão André que apesar da distância sempre me incentivou.

À minha irmã Adeline por me ajudar com a dissertação, por acreditar em mim, por ser uma pessoa guerreira de personalidade forte de quem sinto um orgulho imenso de ter como irmã.

Ao meu marido Valdir Junior por sempre apoiar, compreender e incentivar meus objetivos. Pela paciência em todos os momentos e pelo seu amor que me deixa mais forte.

A minha filha Maria Eduarda por ser a razão do meu viver.

CARVALHO, Aline A.; PINHO, Flaviane A.; MAGALHÃES, Nilton A.; SILVA, Kleverton R.; COSTA, Francisco A. L. Diagnóstico parasitológico de leishmaniose visceral canina e sua associação com o infiltrado neutrofílico [Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis and its association with neutrophilic infiltrate] *Veterinary parasitology*.

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) do ponto de vista epidemiológico é mais importante que a doença no homem, pois além de ter uma prevalência maior, o cão apresenta elevado potencial de transmissão (MARZOCHI et al, 1985), tornado-o a principal fonte de infecção para os vetores (RAMIRO et al., 2005). O objetivo deste trabalho foi avaliar o diagnóstico parasitológico em diferentes amostras de material da pele e linfonodo poplíteo na presença de infiltrado inflamatório neutrofílico, como parâmetro de definição de risco potencial do cão na transmissão da LV. Foram analisados 69 animais, distribuídos em 3 (três) grupos: polissintomáticos (PS); oligossintomáticos (OS) e controles (C). A análise parasitológica revelou que 65,1% (41/63) foram positivos no linfonodo e 39,7% (25/63) foram positivos na pele. Verificou-se que a probabilidade de encontrar amastigotas em biópsia de pele foi significativamente maior que no imprint de linfa ($p = 0,04$, teste χ^2) e esfregaço sanguíneo ($p = 0,00$, teste χ^2) de pele. A carga parasitária era significativamente maior nos animais polissintomáticos do que nos oligossintomáticos e controles. Exame citológico realizado para quantificar a presença de neutrófilos revelou um maior número de neutrófilos nos animais polissintomáticos, do que nos animais oligossintomáticos ($P=0,00$, teste de Mann Whitney) (Fig.7). Verificou-se, ainda, que o número de parasitos na pele era maior quando havia presença de neutrófilos no linfonodo ($p = 0,03$, $r = 0,5$, teste Regressão Linear). Assim, observou-se que o exame parasitológico de pele e linfonodo poplíteo fornecem informações seguras da infecção e pode indicar o risco epidemiológico potencial de um cão em transmitir o parasito ao vetor.

Palavras-chave: linfonodo, pele, neutrófilo, carga parasitária, Leishmania

CARVALHO, Aline A.; PINHO, Flaviane A.; MAGALHÃES, Nilton A.; SILVA, Kleverton R.; COSTA, Francisco A. L. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis and its association with neutrophilic infiltrate [Diagnóstico parasitológico de leishmaniose visceral canina e sua associação com o infiltrado neutrofílico] *Veterinary parasitology*.

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) from the epidemiological point of view is more important than disease in humans, because the dog has a high potential for transmission (Marzochi et al, 1985), making it the main source of infection for the vectors (Ramiro et al., 2005). The objective of this study was to evaluate the parasitological diagnosis in different samples of material from skin and popliteal lymph node in the presence of neutrophilic inflammatory infiltrate, as a parameter to assess the potential of the dog in the VL transmission. We analyzed 69 animals, divided into 3 (three) groups: polysymptomatic (PS), oligosymptomatics (OS) and controls (C). The parasitological analysis revealed that 65.1% (41/63) were lymph node positive and 39.7% (25/63) were positive on the skin. It was observed that the probability of finding amastigotes in skin biopsy was significantly greater than in imprint of lymph ($p = 0.04$, χ^2 test) and blood smear of skin ($p = 0.00$, χ^2 test). The parasite load was significantly higher in animals polysymptomatic than in oligosymptomatic and controls. Cytological analyses to quantify the presence of neutrophils revealed a greater number of neutrophils in polysymptomatic than in oligosymptomatic animals ($P = 0.00$, Mann Whitney). Observed also that the number of parasites in the skin was higher when there was presence of neutrophils in the lymph node ($p = 0.03$, $r = 0.5$, Regression testing). It was found that the parasitological examination of skin and popliteal lymph node provide reliable information and can indicate the epidemiological risk of a dog to transmit the parasite to the vector.

Keywords: lymph nodes, skin, neutrophil, parasite load, Leishmania

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL-----	11
2. CAPÍTULO I: Diagnóstico parasitológico de leishmaniose visceral canina e sua associação com o infiltrado neutrofílico -----	21
ABSTRACT-----	21
INTRODUÇÃO-----	22
MATERIAL E MÉTODOS-----	25
RESULTADOS-----	28
DISCUSSÃO-----	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	37
FIGURAS-----	43
3. CONCLUSÕES-----	65
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL-----	66
5. APÊNDICE I-----	75

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença zoonótica que tem grande importância em saúde pública, por acometer crianças, mas, também, adultos de áreas rurais e da periferia dos grandes centros urbanos que não contam com infra-estrutura econômico-social adequada (BRASIL, 2006).

Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez na Grécia em 1835 quando então era denominada de “ponos.” Anos mais tarde, em 1869, foi relatada na Índia, recebendo o nome de “Kala-jwar” devido ao discreto aumento da pigmentação da pele durante a evolução da doença (LEITE, 1958). Atualmente é uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (OMS), com elevada prevalência nas Américas Central e do Sul e com descrição de alguns casos nos Estados Unidos da América (WHO, 2011). É, ainda, prevalente no Oriente Médio, Ásia e África, (ROSE et al., 2004).

A LV é considerada uma das doenças mais negligenciadas do mundo, com 80% dos casos ocorrendo em populações de baixa renda, com deficiência em saneamento básico, educação, moradia e alimentação. Estima-se que dois milhões de pessoas vivam em áreas de risco, com o surgimento de cerca de 500.000 casos novos e mais de 50.000 mortes anuais (WHO, 2011). No Brasil a LV constitui um sério problema de saúde pública, sendo registrada, anualmente, em torno de 3.156 casos, dos quais cerca de 10% não sobrevivem (OLIVEIRA et al., 2006; SABROZA., 2006). Nos últimos dez anos a média anual de incidência foi de dois casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2006).

Devido à ampla distribuição geográfica no Brasil, a LV se apresenta com aspectos sociais, geográficos e climáticos diferenciados. Os dados epidemiológicos dos últimos anos revelam uma periurbanização e urbanização da leishmaniose visceral, provocado por transformações ambientais devido ao intenso processo migratório, por razões econômicas ou sociais, levando a redução do espaço ecológico da doença e facilitando, dessa forma, a ocorrência de epidemias (BRASIL, 2006).

Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados no Brasil era na região Nordeste. Com o passar dos anos e a expansão da doença para outras regiões, esse perfil vem se modificando. Atualmente a região Nordeste apresenta 77% dos totais de casos notificados, destacando os estados do Piauí, Maranhão, Ceará e Bahia, seguidos pela região sudeste, norte e centro-oeste (OLIVEIRA et al., 2006).

No estado do Piauí, no período de 1999 a 2009 foram notificados 2.498 casos de LV, sendo que 54,8% foram confirmados na capital Teresina. Os dados revelam que a leishmaniose visceral tem característica de uma doença cíclica, com surtos repetidos a cada dez anos. A periodicidade desta enfermidade tem sido explicada pela freqüente ocorrência cíclica de calamidades naturais como secas (bastante freqüentes) e inundações. Essas oscilações climáticas determinam a migração populacional causando uma queda nas condições socioeconômicas das populações afetadas. Atualmente, a incidência da LV no Piauí é de 8,93 casos/100.000 habitantes (DRUMOND; COSTA, 2011).

A enfermidade é causada por protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), pertencendo ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAISON; SHAW, 1987), formado por três espécies: *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAVERAN; MESNIL, 1903), presente na Índia e regiões da África; *Leishmania (Leishmania) infantum* (NICOLE, 1908), encontrada nos continentes Africano, Asiático e Europeu e a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA; CHAGAS, 1937) agente etiológico da zoonose no novo mundo.

Os agentes etiológicos da LV são parasitas intracelulares obrigatórios do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) constituído pelo baço, fígado, linfonodo e medula óssea (BRASIL, 2006); entretanto no curso da infecção outros órgãos podem ser afetados (CIMERMAN, 1999), destacando-se a pele do cão, ponto inicial de infecção, que apresenta alto parasitismo nos animais com manifestações clínicas da doença (VERÇOSA et al., 2008).

A transmissão da leishmaniose visceral se dá pela picada de fêmeas de flebotomíneos pertencentes à Ordem díptera da família Psychodidae, sendo consideradas como os hospedeiros intermediários (REY, 1991). A *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil, mas dependendo da área geográfica mais de uma espécie de flebotomíneo pode está envolvida (MONTEIRO et al., 2005; BRASIL, 2006) como a *L. cruzi* no estado do Mato Grosso do Sul (SANTOS et al, 1998).

Desde 1908 quando a LV foi relatada pela primeira vez na Tunísia em canídeos domésticos, e no Brasil quando foi observado intenso parasitismo cutâneo em cães e raposas do estado do Ceará, o cão tem sido considerado o mais importante reservatório peridoméstico no ciclo urbano da doença (RAMIRO et al., 2003; SILVA et al., 2005).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) do ponto de vista epidemiológico é mais importante que a doença no homem, pois além de ter uma prevalência maior, o cão apresenta elevado potencial de transmissão (MARZOCHI et al, 1985), tornado-o a principal fonte de infecção para os vetores (RAMIRO et al., 2005).

A doença no cão geralmente precede a doença no homem. Apesar desta associação, estudos demonstram que a eutanásia de cães soropositivos em áreas de incidência de LV humana não tem sido suficientes para reduzir a doença em níveis epidemiológicos aceitáveis (BADARÓ et al, 1996; BRAGA et al, 1998; OLIVEIRA et al, 2005; SILVA et al , 2005). Entre os anos de 1999 a 2009 a prevalência de LV canina em Teresina, capital do estado do Piauí, foi de 19,27 casos/mil cães e apesar da eutanásia dos cães soropositivos, a incidência da doença em 2008 e 2009 foi maior que nos anos anteriores (SESAPI, 2009).

A transmissão da doença acontece durante o repasto sanguíneo do vetor sobre o hospedeiro infectado que ingere as formas amastigotas de *Leishmania*, a maioria dentro de macrófagos. No tubo digestivo anterior ocorre o rompimento dessas células liberando os protozoários. As formas amastigotas começam a se reproduzir por divisão binária e se diferenciam em promastigotas, caracterizadas principalmente pela formação do flagelo, sendo conhecidas também como formas flageladas. Essas promastigotas continuam o processo de multiplicação e se transformam em paramastigotas, as quais irão migrar para o esôfago e a faringe do vetor, aderindo-se a esses órgãos por meio do flagelo. Em seguida as paramastigotas começam a se diferenciar em promastigotas metacíclicas tornando-se infectantes (MARZOCHI et al, 1981,). O ciclo do parasito dentro do inseto se completa em aproximadamente 72 horas (BRASIL, 2006)

As fêmeas infectadas ao realizarem um novo repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado sadio, liberam as formas infectantes juntamente com sua saliva. Na derme do hospedeiro elas são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) e no interior dos macrófagos, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, quando ocorre a sua liberação e são fagocitadas novamente por outros macrófagos num processo contínuo, ocorrendo assim a disseminação hematogênica e/ou linfática para outros tecidos ricos em células do SFM, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2006; DIAS et al., 1999).

Alguns autores defendem a hipótese de outras formas de transmissão entre a população canina, principalmente por meio da transfusão de sangue contaminado, ingestão de artrópodes infectados e transmissão venérea; porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão para humanos ou na manutenção da enzootia (COUTINHO et al., 2005; BRASIL, 2006; de FREITAS et al., 2006; COUTINHO; LINARDI, 2007; SILVA et al., 2009).

O padrão de resposta imune na LV canina ainda não está totalmente estabelecido. Estudos demonstram que a resolução espontânea da infecção em cães assintomáticos ou com sinais leves da doença, geralmente está relacionada a uma produção das citocinas IL-2, IL-12, IFN γ , TNF α , caracterizando uma resposta do tipo Th1, mediada por células CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$. As citocinas IL-2, IFN γ e TNF α e células CD8 $^{+}$ exercem uma proteção imunológica ao cão com a ativação de macrófagos capazes de matar as amastigotas intracelulares pela produção de L-arginina e óxido nítrico. Por outro lado, a infecção exacerbada está ligada a produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, envolvendo uma resposta Th2, com expansão e proliferação de linfócitos B (BARBIERI, 2006). A IL-10 pode promover um aumento da resposta Th2, bloqueando a proliferação de células Th1 (VARELLA; FORTE, 2001). A IL-4 induz a produção de linfócitos B, desenvolvendo uma resposta do tipo Th2 com o aumento dos níveis séricos de imunoglobulinas IgE e IgG1 (VARELLA; FORTE, 2001). Essas imunoglobulinas podem estar fortemente associadas a um quadro clínico grave de LV canina (QUINNELL et al., 2001).

Os cães sintomáticos geralmente apresentam altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, enquanto que os resistentes à infecção apresentam baixos níveis ou ausência de anticorpos (BOCETA et al., 2000; SOLANO-GALLEGO et al., 2001). A imunoglobulina IgG2 parece estar associada a infecção assintomática (DEPLAZES et al., 1995). Muitos aspectos da patogênese da LV canina são atribuídos aos anticorpos produzidos de forma exacerbada, os quais formam imunocomplexos que são depositados no tecido de diversos órgãos causando lesões inflamatórias (SANTOS et al., 2004).

A LV canina é uma doença sistêmica severa, cuja sintomatologia vai depender do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal e da cepa do parasito inoculada. O cão infectado pode apresentar um quadro clínico com características que vão desde o aparente estado sadio a um severo estágio final (BRASIL, 2006; NEVES et al, 2005).

Em áreas endêmicas o cão é considerado o principal elo na manutenção do ciclo da *Leishmania*, por ser susceptível a infecção, desenvolvendo uma sintomatologia clássica da doença com intenso parasitismo cutâneo, sendo responsabilizado pela transmissão humana por se encontrar no peridomicílio e intradomicílio das residências (BRASIL, 2006). Existe também uma população canina que é considerada resistente a infecção, por não desenvolver sinais clínicos, e sua importância como transmissor potencial da doença carece de avaliações mais consistentes. Para alguns autores, parte dos animais infectados, mesmo na ausência de manifestações clínicas, apresentam parasitismo cutâneo, sendo potencialmente infectantes para o vetor (TRAVI et al., 2001; MORENO; ALVAR, 2002; LARANJEIRA, 2008; REIS et al., 2009). Em contrapartida, outros estudos demonstram que a carga parasitária está correlacionada com o estado clínico. Os cães assintomáticos demonstram baixo parasitismo em órgãos do SFM, e mesmo, ausência de parasitas na pele (SOLANO-GALENO et al., 2001, VERÇOSA et al., 2008). Portanto, animais que apresentam manifestações clínicas têm maior probabilidade de infectar vetores que cães sem manifestações clínicas da doença (VERÇOSA et al., 2008). As manifestações clínicas da LVC podem ser classificadas em três diferentes grupos: cães assintomáticos, constituído por animais sorológica e parasitologicamente positivos, mas que não apresentam nenhum sinal clínico sugestivo da enfermidade; cães oligossintomáticos, aqueles que são sorológica e parasitologicamente positivos e apresentam no máximo três sinais clínicos da doença, e cães sintomáticos ou polissintomáticos, aqueles sorológica e parasitologicamente positivos que possuem mais de três sinais clínicos característicos da doença (MACIANTE et al, 1988).

A LVC possui uma gama de manifestações clínicas podendo assemelhar-se a outras enfermidades infecto-contagiosas (BRASIL, 2006). Os sinais clínicos comumente evidenciados em cães de Teresina-PI, são onicogribose, lesões de pele, conjuntivite e linfadenopatia local ou generalizada (VERÇOSA et al., 2008).

Como a LV canina tem uma variação muito grande de manifestações clínicas, torna-se difícil apenas a utilização do diagnóstico clínico, sendo necessária a realização de outros métodos laboratoriais para a confirmação da infecção. Atualmente os métodos de diagnósticos mais utilizados são os sorológicos, os métodos de imunodiagnóstico, os métodos moleculares de detecção do DNA dos parasitas e a pesquisa direta do protozoário (GONTIJO; MELO, 2004).

O diagnóstico sorológico é atualmente utilizado nos inquéritos para distinguir cães infectados dos não infectados. O Ministério da Saúde do Brasil recomenda a utilização do teste ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) para triagem inicial e a reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) para confirmação dos casos positivos (GRANDONI, 2002; BRASIL, 2006;). No RIFI, o cão é considerado soro reagente pelo Ministério da Saúde, quando apresenta um título igual ou superior a 1:40. Em áreas endêmicas, deve-se ter cuidado na interpretação de resultados com baixas titulações pela possibilidade de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, originando resultados falso-positivos (MANCIANTI, et al., 2002; ALVAR et al., 2004; BRASIL, 2006). Essas incertezas acabam por gerar dúvidas de quantos animais sadios são eutanasiados por falha no diagnóstico (ALVES; BEVILACQUA, 2004). Quanto a sensibilidade o RIFI apresenta grandes variações, revelando percentuais muito baixos de até 21,6% (SILVA et al., 2001) ou percentuais muito altos de até 100% (CIARAMELLA et al., 2007). Um estudo feito por Maia et al.(2007) com cães assintomáticos e sintomáticos de uma área endêmica, demonstrou uma sensibilidade de 85,5% e especificidade de 94,7%. O ELISA consiste na reação de anticorpos presente no soro com antígenos de *Leishmania* que pode ser obtido de diversas formas: por meio de cultivo do parasita, como antígenos purificados, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos (MAIA ; CAMPINO, 2008;). Variações nas espécies de leishmânias utilizadas como antígenos influenciam significativamente o resultado do teste. O uso de antígenos preparados com *L. amazonensis* e *L. brasiliensis* em vez de *L. chagasi*, resultam em uma diminuição dos níveis de anticorpos detectados no ELISA em soro de animais infectados (BALEEIRO et al., 2006).

Outros testes sorológicos também são aplicados na LV canina como o dot-ELISA, o Western Blotting, o Ensaio de Imunodifusão, o teste de imunocromatografia rápida e o Teste de Aglutinação Direta (DAT). Este último teste baseia-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro com a utilização de antígeno estável e liofilizado, o que o torna muito adequado para uso em campo uma vez que permanece estável em altas temperaturas (MEREDITH et al., 1995; SCHALLING et al., 2002a). Sua sensibilidade varia de 70,6% (MOHEBALI et al., 2004) a 100% (SILVA et al., 2006) e a especificidade varia de 84,9% (MOHEBALLI et al., 2004) a 100% (NEOGY et al., 1992; SCHALLING et al., 2002b).

Atualmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo empregada mundialmente. Trata-se de uma técnica molecular que visa à amplificação de fragmentos de DNA do cinetoplasto (KDNA) de *Leishmania*. Uma das vantagens da técnica na detecção do parasita é a variedade de amostras que podem ser utilizadas, como sangue, pele, medula óssea, linfonodo, baço, fígado, entre outros. Sua sensibilidade e especificidade vai depender de fatores como a escolha dos primers, o método de extração, o protocolo adotado e o tipo de material biológico a ser utilizado na reação. Mesmo com todas essas variáveis, estudos apontam que a sensibilidade do teste é alta, ficando entre 89 e 100% (ASHFORD et al., 1995; BERRAHAL et al., 1996; SILVA et al., 2001; SOLANO-GALENO et al., 2001). Contudo, seu custo ainda é muito elevado, pelos equipamentos sofisticados que são utilizados, e há necessidade de pessoal com alta qualificação, o que constitui fator limitante em seu uso em inquéritos epidemiológicos.

Apesar da disponibilidade dos diferentes métodos de diagnóstico, a leishmaniose visceral canina continua necessitando de uma ferramenta diagnóstica que seja confiável, fácil e rápida de realizar. Os testes sorológicos que atualmente são utilizados na triagem da LV canina, não têm alcançado bons resultados em áreas endêmicas, gerando a necessidade do aprimoramento de técnicas diagnósticas, principalmente no que concerne a especificidade do teste utilizado para a detecção do reservatório animal (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Por outro lado, os testes parasitológicos, possuem alta especificidade, são considerados o padrão ouro para o diagnóstico e podem ser utilizados como ferramenta em áreas endêmicas para identificação de casos caninos. A confirmação parasitológica pela cultura de fragmentos de pele intacta mostra resultados positivos em dois municípios do Rio de Janeiro (MADEIRA et al. 2004; MADEIRA et al., 2006). Estudos demonstram que fragmentos de pele podem ser utilizados para confirmação parasitológica da LV canina, utilizando-se de intervenções leves e de fácil aplicabilidade (FIGUEIREDO et al., 2010).

A pele é um órgão importante no processo de determinação da infecção por albergar o parasito (FONDEVILA et al, 1997). Desse modo, é um órgão de eleição para a detecção do parasito por métodos parasitológicos.

De um modo em geral, a confirmação da infecção é feita pela análise parasitológica em amostras de pele, linfonodo e medula óssea (WILLENSE, 1995) por

análise citológica. Esse método apresenta 100% de especificidade, mas a sensibilidade é baixa (ALVAR et al, 2004), contudo depende de alguns fatores como o grau de parasitemia na amostra, do material biológico coletado e da experiência do profissional que faz a leitura da lâmina (NOLI; AUXILIA, 2005; MAIA; CAMPINO, 2008). De acordo com Ferrer, (1999) e Alvar et al, (2004) essa técnica apresenta uma melhor sensibilidade quando realizada com amostras de linfonodo e medula óssea com 30- 50% e 60-75% de positividade, respectivamente.

A análise histopatológica em tecidos corados por Hematoxilina-Eosina (H-E), também tem sido usada para detectar formas amastigotas do parasita, apesar de apresentar baixa sensibilidade (XAVIER et al, 2006), mas, à semelhança da técnica citológica, a sensibilidade pode aumentar se as amostras forem bem analisadas por um profissional experiente (MAIA; CAMPINO, 2008).

Assim, considerando a alta especificidade da técnica parasitológica, esta pode ser aplicada seguramente em área endêmica como método auxiliar de diagnóstico, que pode contribuir para a identificação rápida e segura de animais infectados, eliminando a possibilidade de diagnósticos falsos positivos ou falsos negativos e possibilitando a retirada dos animais da área endêmica, reduzindo, desse modo, o ciclo da infecção.

Exames citológicos e histopatológicos de órgãos como pele e linfonodo revelam que animais soropositivos para leishmaniose e com sinais clínicos da doença apresentam frequentemente um infiltrado inflamatório mononuclear composto principalmente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos e também pela presença de células polimorfonucleares caracterizadas como neutrófilos e eosinófilos (MYLONAKIS et al., 2005; VERÇOSA et al, 2008;).

O neutrófilo desempenha um papel importante na fagocitose e morte de microorganismos invasores por meio da geração e liberação de enzimas líticas por seus grânulos e produção de óxido nítrico. Além disso, são importantes constituintes da resposta inflamatória e descobriu-se que contribuem no recrutamento e ativação de células apresentadoras de antígeno por meio da liberação de citocinas e quimiocinas (CASSATELLA,1999; NATHAN, 2006).

A atividade dos neutrófilos na infecção por *Leishmania* tem sido estudada principalmente usando modelos murinos com a forma cutânea da doença. Nesses animais é observado que neutrófilos parecem exercer uma função protetora matando os parasitas na fase aguda, ou seja, nas primeiras semanas de infecção, mas não em

infecções crônicas (CHEN et al., 2005; LIMA et al., 1998; RIBEIRO-GOMES et al., 2004;). Em camundongos BALB/c depois de inoculação cutânea de *L. chagasi* é observado no primeiro dia de infecção a presença de neutrófilos albergando o parasita, seguido por macrófagos, porém ocorre um predomínio de neutrófilos parasitados durante as primeiras 24 horas de infecção (THALHOFER et al., 2011). Pesquisadores demonstram, também, que a depleção de neutrófilos e eosinófilos em camundongos BALB/c infectados por *L. major*, contribui para um aumento da carga parasitária (LIMA et al., 1998; CHEN et al., 2005), o que sugere um papel importante do neutrófilo na proteção precoce contra *Leishmania*. Experimentos *in vitro* com neutrófilos humanos infectados com *L. donovani*, demonstram que a morte do parasita intracelular é realizada pelo sistema halide-peroxidase-H₂O₂ (H₂O₂-peroxidase-halide system) (PEARSON; STEIGBIGEL, 1981).

Experimento com camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, em que foram usados depletors específicos de neutrófilos (anticorpo monoclonal NIMP-R14) durante as duas primeiras semanas de infecção, revela que a depleção de neutrófilos leva a um aumento significativo da quantidade de parasitas no baço e medula óssea dos animais, além de um retardamento na formação de granulomas no fígado com diminuição da síntese de óxido nítrico. Mostra ainda que a resposta imune contra o parasita, na ausência de neutrófilos, parece ter sido alterada, uma vez que os resultados revelam um aumento no soro e no baço de IL-10 e IL-4 e uma diminuição de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN, sugerindo que na ausência de neutrófilos o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 esteja prejudicada. Todos esses resultados indicam o envolvimento do neutrófilo na resistência a infecção contra *L. donovani* e no desenvolvimento de uma resposta imune subsequente (McFARLANE et al., 2008)

Outros estudos incriminam o neutrófilo como responsável por fornecer um mecanismo de entrada “silenciosa” da *Leishmania* (CHANG et al., 1993; CHARMOY et al., 2007). A fagocitose do parasita pelo neutrófilo leva a formação de um fagolisossomo que é responsável pela destruição do antígeno. Por outro lado, neutrófilos infectados com leishmânias parecem se comportar de duas formas: a) ocorre a destruição do parasito pelo neutrófilo quando após a fagocitose ocorre a formação do fagolisossoma (junção do fagossoma com o lisossoma), b) não ocorre a destruição do parasito, pela ausência de formação do fagolisossoma; nesse caso o parasito não é

destruído, caracterizando um mecanismo de escape à ação lítica do neutrófilo (GUEIRARD et al., 2008). Os autores ainda relatam que substâncias como os fosfoglicanos estão claramente envolvidos na habilidade do parasita em persistir nesses compartimentos, evitando assim sua degradação, além de suprimir o mecanismo de apoptose pelos neutrófilos, aumentando sua permanência dentro das células. Neste contexto, experimento com co-incubação de polimorfonuclear (PMN) com promastigotas de *L. major in vitro* leva a inibição de apoptose espontânea de neutrófilos, resultando em sobrevivência intracelular do parasito. Após a infecção, PMN eventualmente entram em apoptose. Fosfatidil serina é exposta na superfície dos PMN apoptóticos levando a seu reconhecimento e fagocitose por macrófagos e, desse modo, contribuindo para a manutenção da infecção (AGA et al., 2002).

O objetivo deste trabalho é avaliar o diagnóstico parasitológico de Leishmaniose visceral canina, na área endêmica de Teresina, por meio de exame parasitológico de diferentes amostras de material da pele e relacionar a presença de neutrófilos nesses órgãos com a carga parasitária, como parâmetro de definição de risco potencial do cão na transmissão da doença.

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: resumo, summary seguido de uma introdução englobando revisão de literatura e objetivos; um capítulo contendo artigo completo, intitulado “**Diagnóstico parasitológico de Leishmaniose Visceral Canina e sua associação com o infiltrado inflamatório neutrofilico**”, a ser encaminhado para publicação na revista *Veterinary Parasitology*, estruturados de acordo com as normas da revista e referências bibliográficas da introdução geral.

1 2. CAPÍTULO I

2 **Diagnóstico parasitológico de Leishmoniose Visceral Canina e sua associação com**
3 **o infiltrato inflamatório neutrofílico**

4

5 Aline de A. Carvalho^a, Flaviane A. Pinho^b, Kleverton R. Silva^c, Nilton A. Magalhães^a,
6 Francisco A. L. Costa^a

7 ^a Departamento de Clínica e Cirurgia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade
8 Federal do Piauí, 64049-550, Campus Socopo- S/N, Teresina, Piauí, Brasil

9 ^b Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470,
10 prédio II, 4^o andar, 05403-000, SP

11 ^cLaboratório de Imunoparasitologia (LIP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM
12 - FIOCRUZ - BA), Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710 - Salvador/BA.

13 Endereço para correspondência autor/professor: Francisco A. L. Costa. Universidade
14 Federal do Piauí. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Clínica e Cirurgia.
15 Setor de patologia Animal, 64049-550, Campus Socopo- S/N, Teresina, Piauí, Brasil.
16 Telefone: + 55 86 3215 5760, número do Fax: + 55 86 3215 5753, e-mail:
17 fassisle@gmail.com

18

19 **Abstract**

20 Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) from the epidemiological point of view is more
21 important than disease in humans, because the dog has a high potential for transmission
22 (Marzochi et al, 1985), making it the main source of infection for the vectors (Ramiro et
23 al., 2005). The objective of this study was to evaluate the parasitological diagnosis in
24 different samples of material from skin and popliteal lymph node in the presence of
25 neutrophilic inflammatory infiltrate, as a parameter to assess the potential of the dog in

1 the VL transmission. We analyzed 69 animals, divided into 3 (three) groups:
2 polysymptomatic (PS), oligosymptomatics (OS) and controls (C). The parasitological
3 analysis revealed that 65.1% (41/63) were lymph node positive and 39.7% (25/63) were
4 positive on the skin. It was observed that the probability of finding amastigotes in skin
5 biopsy was significantly greater than in imprint of lymph ($p = 0.04$, χ^2 test) and blood
6 smear of skin ($p = 0.00$, χ^2 test). The parasite load was significantly higher in animals
7 polysymptomatic than in oligosymptomatic and controls. Cytological analyses to
8 quantify the presence of neutrophils revealed a greater number of neutrophils in
9 polysymptomatic than in oligosymptomatic animals ($P = 0.00$, Mann Whitney).
10 Observed also that the number of parasites in the skin was higher when there was
11 presence of neutrophils in the lymph node ($p = 0.03$, $r = 0.5$, Regression testing). It was
12 found that the parasitological examination of skin and popliteal lymph node provide
13 reliable information and can indicate the epidemiological risk of a dog to transmit the
14 parasite to the vector.

15

16 Keywords: lymph nodes, skin, neutrophil, parasite load, Leishmania

17

18 **Introdução**

19

20 A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) do ponto de vista epidemiológico é
21 mais importante que a doença no homem, pois além de ter uma prevalência maior, o cão
22 apresenta elevado potencial de transmissão (Marzochi et al, 1985), tornando-o a
23 principal fonte de infecção para os vetores (Ramiro et al., 2005).

1 Cães infectados apresentam parasitismo cutâneo, sendo potencialmente
2 infectantes para o vetor (Travi et al., 2001; Moreno; Alvar, 2002; Laranjeira, 2008; Reis
3 et al., 2009). Mas, a carga parasitária parece estar correlacionada ao estado clínico. Os
4 cães assintomáticos demonstram baixo parasitismo em órgãos do SFM, e mesmo,
5 ausência de parasitas na pele (Solano-Galeno et al., 2001, Verçosa et al., 2008).
6 Portanto, animais que apresentam manifestações clínicas têm maior probabilidade de
7 infectar vetores que cães sem manifestações clínicas da doença (Verçosa et al., 2008).

8 O programa de controle da LVC no Brasil determina a aplicação do diagnóstico
9 sorológico nos inquéritos epidemiológicos para distinguir cães infectados dos não
10 infectados: o teste ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) para triagem inicial e
11 a reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) para confirmação dos casos positivos
12 (Grandoni, 2002; Brasil, 2006), mas a sensibilidade e especificidade desses métodos
13 oscilam bastante, levando a erros de diagnóstico com muitos resultados falso positivos e
14 falso negativos (Maia; Campino, 2008).

15 Por outro lado, os testes parasitológicos, possuem alta especificidade, são
16 considerados o padrão ouro para o diagnóstico e podem ser utilizados em áreas
17 endêmicas para identificação de casos caninos. Estudos demonstram que fragmentos de
18 pele podem ser utilizados para confirmação parasitológica da LV canina, utilizando-se
19 de intervenções leves e de fácil aplicabilidade (Figueiredo et al., 2010).

20 Assim, considerando a alta especificidade da técnica parasitológica, esta pode
21 ser aplicada seguramente em área endêmica como método auxiliar de diagnóstico, que
22 pode contribuir para a identificação rápida e segura de animais infectados, eliminando a
23 possibilidade de diagnósticos falsos positivos ou falsos negativos e possibilitando a
24 retirada dos animais da área endêmica, reduzindo, desse modo, o ciclo da infecção.

1 Exames citológicos e histopatológicos de órgãos como pele e linfonodo revelam
2 que animais soropositivos para leishmaniose e com sinais clínicos da doença
3 apresentam freqüentemente um infiltrado inflamatório mononuclear composto
4 principalmente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos e também pela presença de
5 células polimorfonucleares caracterizadas como neutrófilos e eosinófilos (Mylonakis et
6 al., 2005; Verçosa et al, 2008;).

7 A atividade dos neutrófilos na infecção por *Leishmania* apresenta resultados
8 controversos. Os estudos demonstram que neutrófilos podem matar parasitas na fase
9 aguda, por meio do sistema halide-peroxidase-H₂O₂ (H₂O₂-peroxidase-halide system)
10 (Pearso; Steigbigel, 1981), mas não em infecções crônicas (Chen et al., 2005; Lima et
11 al.,1998; Ribeiro-Gomes et al., 2004). A depleção de neutrófilos e eosinófilos em
12 camundongos BALB/c infectados por *L.major*, contribui para um aumento da carga
13 parasitária (Lima et al.,1998; Chen et al., 2005; McFarlane et al., 2008).

14 Por outro lado outros estudos apontam o neutrófilo como responsável por
15 fornecer um mecanismo de entrada “silenciosa” da *Leishmania* (Chang et al., 1993;
16 Charmoy et al., 2007). Quando ocorre fagocitose do neutrófilo sem formação do
17 fagolissossoma, o parasito não é destruído, caracterizando um mecanismo de escape à
18 ação lítica do neutrófilo. Fosfoglicanos estão envolvidos na habilidade do parasita em
19 persistir nesses compartimentos, além de suprimir o mecanismo de apoptose dos
20 neutrófilos parasitados, aumentando sua permanência dentro das células (Gueirard et al.,
21 2008). Neste contexto, experimento com co-incubação de polimorfonuclear (PMN) com
22 promastigotas de *L. major in vitro* leva a inibição de apoptose espontânea de
23 neutrófilos, resultando em sobrevivência intracelular do parasito contribuindo para a
24 manutenção da infecção (Aga et al., 2002).

1 O objetivo deste trabalho é avaliar o diagnóstico de Leishmaniose visceral
2 canina, na área endêmica de Teresina, por meio de exame parasitológico de diferentes
3 amostras de material da pele e relacionar a presença de neutrófilos nesses órgãos com a
4 carga parasitária, como parâmetro de definição de risco potencial do cão na transmissão
5 da doença.

6

7 **Material e métodos**

8

9 Animais e diagnóstico de leishmaniose visceral

10 Para o diagnóstico sorológico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC), foram
11 colhidos 10ml de sangue da veia jugular em tubos a vácuo sem anticoagulante. O soro
12 obtido foi utilizado para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* pelas técnicas de
13 Imunofluorescência Indireta (IFI, Biomanguinhos, Fiocruz) e pelo Ensaio
14 Imunoenzimático Indireto ELISA (Biomanguinhos, Fiocruz), realizados no laboratório
15 de Leishmaniose da GEZOON em Teresina-PI. A confirmação diagnóstica foi feita por
16 meio de exame parasitológico de pele, linfonodo poplíteo e medula óssea esternal,
17 sendo o animal considerado positivo quando foi encontrado amastigota de leishmânia
18 em pelo menos um dos órgãos analisados.

19 Posteriormente ao resultado do diagnóstico parasitológico, os animais foram
20 examinados quanto aos seus parâmetros clínicos conforme ficha de avaliação (apêndice
21 I) e classificados em 3 (três) grupos: grupo dos polissintomáticos (PS) constituído por
22 32 cães positivos, com mais de 3 (três) sinais clínicos de LV; grupo dos
23 oligossintomáticos (OS) constituído por 31 cães positivos, com até 3(três) sinais
24 clínicos da doença, e o grupo controle (C) constituído por seis cães que apresentaram
25 resultados negativos para LV e sem manifestações clínicas.

1 Colheita do material

2 Concluído o exame clínico, os animais foram sedados com acepromazina
3 (0,3ml/10kg) por via intramuscular e, em seguida, anestesiados com tiopental sódico
4 (25mg/Kg) por via intravenosa. Após a anestesia, foi feita a tricotomia da pele
5 (superfície dorsal e ventral) da orelha direita e esquerda e região ungueal anterior e
6 posterior dos antímeros direito e esquerdo. Em seguida foi realizada a desinfecção com
7 álcool 70% das áreas tricotomizadas e realizada leve escarificação. Da linfa obtida foi
8 realizado *imprint* em lâminas histológicas. As regiões escarificadas da pele foram
9 limpas com solução de cloreto de sódio a 0,9% e álcool 70% onde foi feita uma pequena
10 incisão de aproximadamente 2mm para a coleta de sangue. Uma gota de sangue
11 periférico das diferentes regiões da pele foi utilizada para preparar esfregaço sanguíneo
12 em lâminas histológicas.

13 Após os procedimentos iniciais de coleta, sob efeito de anestesia profunda os
14 animais foram eutanasiados com injeção intravenosa de 10ml de solução de cloreto de
15 potássio a 10%. Em seguida foram colhidos fragmentos para *imprint* de tecido da pele,
16 das regiões da orelha (esquerda e direita), ungueal anterior e posterior (direita e
17 esquerda) e linfonodo poplíteo. Os fragmentos eram de aproximadamente 1 cm de
18 comprimento por 1 cm de largura para a pele e de 0,5 cm de espessura para linfonodo
19 poplíteo. Esse material foi fixado em formol a 10% tamponado com fosfato a 0,01M pH
20 7,4 (formol tamponado) para análise histopatológica.

21 Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo de
22 experimentação utilizado seguiu os critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética em
23 Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (protocolo n. 026/2010).

24 Análise citológica

1 As lâminas com esfregaço de sangue e *imprints* de linfa, pele das regiões da
2 orelha e regiões ungueal anterior e posterior dos antímeros direito e esquerdo e o
3 *imprint* de linfonodo poplíteo, foram fixadas com álcool metílico e coradas com Giemsa
4 (Mikel, 1994). Em seguida, foram analisadas em microscópio de luz com objetiva de
5 100x para identificação de amastigotas. Foi realizada em 10 animais do grupo PS, 10 do
6 grupo OS e seis do grupo C, a contagem de amastigotas e neutrófilos em 25 campos
7 aleatórios em *imprint* de linfonodo e pele de orelha (direita e esquerda) para
8 determinação da carga parasitária e quantificação do número de neutrófilos presente nos
9 órgãos analisadas.

10 Análise histopatológica

11 Tecidos de pele e linfonodo, de aproximadamente 0,5 cm de espessura, foram
12 retirados dos mesmos animais, para contagem de amastigotas e neutrófilos. Esses
13 tecidos foram conservados em formal tamponado, processados em histotécnico,
14 incluídos em parafina, cortados a 5 μ m, montados em lâminas histológicas e coradas
15 com hematoxilina-eosina (Luna, 1968). Em seguida, foram avaliados semi-
16 quantitativamente para caracterizar a extensão, natureza, localização, distribuição e
17 intensidade da lesão numa escala de 0 a 5 onde 0 = normal, 1 = mínimo, 2 = médio, 3 =
18 moderado, 4 = moderadamente severo e 5 = severo.

19 Análise estatística

20 Os resultados quantitativos e semi-quantitativos foram analisados no programa
21 estatístico Sigma Stat: a) Teste qui-quadrado (χ^2) para comparação dos resultados dos
22 exames parasitológicos de esfregaço de sangue e *imprint* de linfa e pele de orelha das
23 regiões ungueais anterior e posterior (direito e esquerdo); b) método de Kruskal-Wallis
24 para análise de variância. Havendo diferença significativa, aplicou-se o teste de Dunn
25 para comparação múltipla de grupos; c) teste U de Mann-Whitney para comparação

1 entre dois grupos; d) teste de correlação linear para avaliação da relação entre carga
2 parasitária e o infiltrado de neutrófilos nos órgãos analisados. Adotou-se o nível de
3 significância de $p < 0,05$.

4

5 **Resultado**

6 O estudo foi realizado com 69 cães adultos, machos e fêmeas, provenientes da
7 Gerência de Zoonoses (GEZOON) e do Hospital Veterinário Universitário (HUV) da
8 Universidade Federal do Piauí, de uma população de cães infectada da área endêmica de
9 Teresina, com prevalência estimada de 19,27 casos/mil cães, no período de 1999 a 2009
10 (GEZOON).

11 Do total de 69 cães provenientes da GEZOON e HUV do município de Teresina-
12 PI, 63 animais foram soropositivos e seis animais foram negativos. Todos os animais
13 positivos e negativos na sorologia foram submetidos a exame parasitológico, para
14 confirmação do diagnóstico. De acordo com a avaliação clínica, os 69 animais foram
15 classificados em três grupos: 1) polissintomáticos (PS), com 32 cães com mais de três
16 sinais clínicos de LV, 2) Oligossintomáticos (OS), com 31 cães com até três sinais
17 clínicos e 3) controles (C), constituído por seis cães, negativos para LV.

18 A análise parasitológica (Tab. 1) em todos os cães sorologicamente positivos
19 revelou que em 65,1% (41/63) foram encontrados parasitos no linfonodo e 39,7%
20 (25/63) foram positivos na pele, sendo que todos os animais positivos na pele também
21 eram positivos no linfonodo. Dos 65,1% dos animais positivos no exame parasitológico,
22 quando foram utilizadas diferentes amostras de material da pele (linfa, sangue e tecido),
23 17,5% (11/63) foram positivos no *imprint* de linfa (Fig.1) (oito do grupo PS e três do
24 grupo OS); 9,5% (6/63) foram positivos no esfregaço sanguíneo (Fig. 2) (todos do
25 grupo PS) e 34,9% (22/63) foram positivos em biópsia de pele (Fig. 3) (17 do grupo PS

1 e cinco do grupo OS). Dos animais polissintomáticos, três foram positivos na linfa, no
2 esfregaço sanguíneo e na biópsia de pele. Nesses animais foram encontradas
3 leishmânias com maior frequência na orelha e com menor frequência na região ungueal.
4 Verificou-se que a probabilidade de encontrar amastigotas em biópsia de pele foi
5 significativamente maior que no imprint de linfa ($p = 0,04$, teste χ^2) e esfregaço
6 sanguíneo ($p = 0,00$, teste χ^2), porém não houve diferença ($p = 0,29$, teste χ^2) em
7 detectar amastigotas em *imprint* de linfa e esfregaço sanguíneo.

8 A análise da carga parasitária realizada em 20 animais infectados e 6 (seis)
9 controles, revelou que a mesma era significativamente maior nos animais
10 polissintomáticos do que nos oligossintomáticos e controles, tanto na pele ($p = 0,00$,
11 teste Kruskal Wallis e Student Newman Keuls) (Fig.4), quanto no linfonodo (Fig. 5) (p
12 $= 0,00$, teste de Kruskal Wallis e método de Dunn).

13 Ao comparar a carga parasitária nos dois órgãos analisados verificou-se que
14 havia maior número de amastigotas na pele do que no linfonodo, contudo a diferença
15 não era significante.

16 Em pele da orelha e linfonodo poplíteo foi realizado exame citológico específico
17 para quantificar a presença de neutrófilos, além da carga parasitária já abordada em
18 parágrafo anterior. Na pele da orelha dos animais infectados observou-se um maior
19 número de neutrófilos que nos animais controles ($P=0,00$, teste de Mann-Whitney) (Fig.
20 6). A análise comparativa entre os animais infectados revelou um número
21 significativamente maior de neutrófilos nos animais polissintomáticos, do que nos
22 animais oligossintomáticos ($P=0,00$, teste de Kruskal Wallis e Student Newman Keuls)
23 (Fig.7). Verificou-se, ainda, que havia correlação entre a carga parasitária e a presença
24 de neutrófilos ($p = 0,00$, $r = 0,6$, análise de Regressão Linear), nos animais infectados
25 (Fig. 8). A análise realizada por grupos de animais infectados revelou que havia

1 correlação da carga parasitária e neutrófilos entre os animais polissintomáticos ($p =$
2 $0,01$, $r = 0,7$, teste Regressão Linear) (Fig. 9), mas essa correlação não existia entre os
3 animais oligossintomáticos. No linfonodo, à semelhança do que foi observado na pele,
4 observou-se que a presença de neutrófilos era maior nos animais infectados do que nos
5 controles ($P = 0,00$, teste de Mann-Whitney) (Fig.10); essa diferença era marcante,
6 também, entre os animais polissintomáticos e oligossintomáticos ($P = 9.37E-011$, teste
7 de Kruskal Wallis e Student-Newman Keuls) (Fig. 11). A carga parasitária no linfonodo
8 estava correlacionada à presença de neutrófilos entre os animais infectados ($p = 0,00$, r
9 $= 0,6$, teste Regressão Linear) (Fig. 12).

10 A análise comparativa da carga parasitária em pele e neutrófilos em linfonodo,
11 dos animais infectados, revelou que o número de parasitos na pele era maior quando
12 havia presença de neutrófilos no linfonodo ($p = 0,03$, $r = 0,5$, teste Regressão Linear)
13 (Fig.13).

14 Os achados clínicos encontrados em 20 animais infectados foram: linfadenopatia
15 (70%), onicogribose (70%), conjuntivite (50%), descamação furfurácea da pele (30%),
16 alopecia (30%), emagrecimento (30%), ulceração da pele (20%), mucosas pálidas
17 (20%), edema de membros (15%), despigmentação do focinho (10%) e epistaxe (5%).
18 Verificou-se que quanto maior a carga parasitária no linfonodo, mais sinais clínicos os
19 animais apresentavam ($p = 0,00$ $r = 0,7$, regressão linear) (Fig. 14).

20 Na análise histopatológica da pele da orelha de 10 animais infectados
21 polissintomáticos foi observado um infiltrado inflamatório subepidérmico e perianexial
22 difuso e focal, constituído por células mononucleares (macrófagos e linfócitos), com
23 presença de neutrófilos (Fig. 15.) variando de intensidade média a severa e em alguns
24 casos, em menor intensidade, em permeio ao infiltrado principal havia eosinófilos,
25 plasmócitos e fibroblastos. Em três animais o infiltrado inflamatório era severo

1 atingindo a derme com acúmulos focais granulomatosos de células mononucleares (Fig.
2 16). Nos animais oligossintomáticos foi observado infiltrado inflamatório
3 subepidérmico e perianexial, constituído, também, por células mononucleares
4 (macrófagos, linfócitos) e raros eosinófilos em intensidade variando de mínima a média
5 (Fig. 17). Em apenas um animal foi observado presença de neutrófilos de localização
6 subepidérmica, perianexial e perivascular, de intensidade média. Desse modo,
7 constatou-se que o infiltrado inflamatório era mais intenso nos animais
8 polissintomáticos do que nos oligossintomáticos. A análise semi-quantitativa revelou
9 que os animais polissintomáticos tinham maior quantidade de neutrófilos que os animais
10 oligossintomáticos ($P = 0,00$, teste de Kruskal Wallis e método de Dunn) (Fig. 18). Em
11 linfonodo poplíteo observou-se, nos animais polissintomáticos, infiltrado inflamatório
12 na capsula (Fig. 19) constituído por células mononucleares (linfócitos e macrófagos) e
13 neutrófilos, de intensidade média a severa e fibroblastos, eosinófilos e plasmócitos em
14 menor proporção. Cinco animais deste grupo apresentaram depleção de folículos e
15 células da região paracortical (Fig. 20) e neutrófilos estavam presentes em todos os
16 animais, distribuídos na cápsula e regiões cortical, medular e seios medulares. Foi
17 evidenciado em dois cães macrófagos monomórficos com o citoplasma repleto de
18 leishmânias (fig. 21) e presença de megacariócitos. Havia também em menor frequência
19 hiperplasia de folículos, cordões esplênicos e granulomas na região medular. Nos
20 animais oligossintomáticos, o infiltrado inflamatório era da mesma natureza que os
21 polissintomáticos, mas infiltrado neutrofilico foi observado em cinco animais, sendo
22 três de intensidade média e dois de intensidade mínima. A análise semi-quantitativa
23 revelou que os animais polissintomáticos apresentaram uma maior intensidade de
24 neutrófilos no linfonodo quando comparado aos oligossintomáticos e cães controle (P
25 $=0,00$, teste de Kruskal Wallis e método de Dunn) (Fig.22)

1

2 **Discussão**

3

4 O diagnóstico de leishmaniose visceral canina continua a ser um desafio em áreas
5 endêmicas. Diante da complexidade do problema não podemos ter como referência
6 apenas um método, mas há necessidade de utilização dos métodos mais específicos e
7 sensíveis, de baixo custo, fáceis de realizar e que possam proporcionar uma resposta
8 rápida e segura e que, mesmo sem constituir o método principal, possam auxiliar na
9 identificação de cães seguramente infectados. Os vários métodos disponíveis e
10 recomendados oficialmente pelos órgãos de saúde (Brasil, 2006) apresentam limitações
11 pelas grandes oscilações de sensibilidade e especificidade, observadas nas diferentes
12 regiões onde estão sendo empregados. O diagnóstico padrão ouro para a identificação
13 de animais infectados é o parasitológico, pois ao permitir a visualização de formas
14 amastigotas do parasito em órgãos infectados como medula óssea, baço, linfonodo e
15 pele (Maia; Campino, 2008), definem com segurança que o animal está infectado. Em
16 virtude da alta especificidade (100%), esse diagnóstico vem sendo utilizados em cães
17 para comprovação da infecção (Barrouin-Melo et al., 2004; Silva et al., 2007).

18 No presente estudo, procedeu-se ao exame parasitológico de cães com a
19 utilização de diferentes amostras de material da pele e linfonodo poplíteo. Observou-se
20 um maior número de animais positivos no linfonodo poplíteo (65,1%) que na pele
21 (39,7%), muito embora em outros estudos a maior frequência de animais positivos tenha
22 sido observada na pele (Silva et al., 2007; Pinho, 2010). Essas diferenças podem estar
23 sendo influenciada pelo *status* clínico do animal, pois é bem conhecido que os animais
24 polissintomáticos apresentam maior parasitismo na pele (Queiroz et al., 2010), assim
25 como pela habilidade do técnico responsável pela análise das lâminas (Maia; Campino,

1 2008). A comparação do exame parasitológico em pele da orelha e da região ungueal
2 demonstrou uma maior frequência de amastigotas na orelha, conforme tem sido
3 encontrado em outro estudo (Pinho, 2010).

4 A análise de diferentes amostras de material da pele (linfa, sangue e tecido)
5 revelou que a maior probabilidade em encontrar amastigotas é em tecido (biópsia de
6 pele) quando comparado à linfa e esfregaço sanguíneo, o que sugere que o vetor se
7 infecta diretamente dos parasitas presentes na pele, muito embora uma parcela, menos
8 expressiva, chegue pelo fluxo linfático e sanguíneo, contribuindo para a manutenção do
9 parasitismo na pele por essas vias, como tem sido descrito (Dias et al., 1999). Apesar de
10 menos expressivo, esse fluxo parece importante para aumentar o poder de transmissão
11 do parasito para o vetor, considerando que os animais polissintomáticos, que têm maior
12 capacidade de transmissão, apresentavam carga parasitária maior no linfonodo que os
13 cães oligossintomáticos. Desse modo, confirmou-se que cães infectados albergam
14 considerável quantidade de parasitas na pele, possibilitando a utilização desse órgão
15 para a realização do diagnóstico parasitológico, o que é corroborado em outros estudos
16 (Queiroz et al., 2011). Não foram encontrados dados na literatura que comparassem a
17 presença do parasita na linfa e sangue periférico da pele. Os resultados deste estudo
18 demonstraram que não há diferença na detecção de amastigotas na linfa e em esfregaço
19 de sangue da pele, sendo inferior à detecção por meio de biópsia da pele. Em virtude
20 desse resultado a biópsia de pele torna-se a melhor escolha diagnóstica.

21 Como já estabelecido, os animais polissintomáticos apresentaram maior
22 parasitismo (Xavier et al., 2006), o que foi constatado, também, neste estudo, pois a
23 carga parasitária tanto na pele quanto no linfonodo era significativamente maior nos
24 animais polissintomáticos do que nos oligossintomáticos. Este fato é relevante, tendo
25 em vista que mesmo diante da dificuldade do diagnóstico clínico de LV em área

1 endêmica, pois as alterações se confundem com as de outras doenças (Brasil, 2006), e
2 mesmo com a baixa sensibilidade e especificidade do RIFI, o exame parasitológico de
3 pele e linfonodo poplíteo, realizado em animais com mais de 4 (quatro) manifestações
4 clínicas compatíveis com LV, que aumenta a probabilidade dos mesmos estarem
5 infectados (Verçosa et al., 2008), mesmo sem a triagem inicial pela RIFI, podem retirar
6 da área endêmica um grande número de animais, com a certeza de que os mesmos
7 albergam o parasito na pele e/linfonodo e, portanto, representam risco epidemiológico
8 de transmissão da doença.

9 A comparação entre o parasitismo em linfonodo poplíteo e os sinais clínicos
10 apresentados pelos cães, revelou uma correlação positiva, o que reflete o estado de
11 progressão da doença e o aumento do risco de transmissão da infecção. Essa relação,
12 também, tem sido observada entre o parasitismo da pele e a gravidade das
13 manifestações clínicas (Queiroz et al., 2011), muito embora outros estudos não
14 demonstraram essa correlação (Lima et al., 2004; Giunchetti et al., 2008).

15 Em estudos prévios realizados por nosso grupo verificou-se que em cães com
16 manifestações clínicas de LV, quando poucas amastigotas foram observadas na pele, o
17 infiltrado inflamatório era constituído principalmente por linfócitos e macrófagos, mas
18 quando muitos parasitos estavam presentes, o infiltrado era, também, constituído por
19 linfócitos e macrófagos, bem como por uma grande quantidade de neutrófilos (Verçosa
20 et al., 2008). No presente estudo procuramos estabelecer uma relação entre a presença
21 de neutrófilos no infiltrado inflamatório e a carga parasitária, tanto na pele quanto no
22 linfonodo.

23 As análises citológica e histológica de pele e linfonodo demonstraram em
24 animais polissintomáticos a presença de infiltrado inflamatório de maior intensidade,
25 constituído por células mononucleares (linfócitos e macrófagos) e por neutrófilos. Essa

1 diferença, em relação a neutrófilos, ficou evidente na análise quantitativa e semi-
2 quantitativa que revelou maior presença de neutrófilos no infiltrado inflamatório de pele
3 e linfonodo dos animais polissintomáticos comparados aos oligossintomáticos e
4 controles. Na leishmaniose visceral a atuação dos neutrófilos na imunopatogênese da
5 doença ainda não está bem estabelecida (McFarlane et al., 2008). Sabe-se que
6 neutrófilos tem capacidade de fagocitar *Leishmania* dependente ou independentemente
7 da ativação do complemento, mas com capacidade limitada (Laufs et al., 2002). Em
8 alguns estudos o neutrófilo parece ter papel protetor contra a infecção (Lima et al.,
9 1998; Rousseau et al., 2001; Ribeiro-Gomes et al., 2004; Chen et al., 2005), em outros
10 parece ter efeito estimulador da infecção (Peruhype-Magalhães et al., 2005; Peters et al.,
11 2008; Gueirard et al., 2008; Peters; Sacks, 2009). Neste estudo observou-se correlação
12 positiva entre a carga parasitária e a presença de neutrófilos em pele e linfonodo
13 poplíteo. Constatou-se que quanto maior a presença de neutrófilos no linfonodo, maior
14 era a presença de leishmânia na pele. Essa correlação era mais evidente nos animais
15 polissintomáticos do que nos oligossintomáticos. Estes resultados sugerem que a
16 presença de neutrófilos está contribuindo para a progressão da infecção. Neste sentido,
17 cabe destacar que neutrófilos infectados com leishmânias são inábeis em destruir
18 leishmânias quando não há formação de um fagolisossoma. Substâncias como os
19 fosfoglicanos nesses compartimentos evitam sua degradação, além de suprimir o
20 mecanismo de apoptose pelos neutrófilos, aumentando sua permanência dentro das
21 células (Gueirard et al., 2008), o que tem sido evidenciado, também, em modelos
22 experimentais (Aga et al., 2002). Cabe ressaltar que esses resultados diferentes na
23 resposta de neutrófilos na modulação da infecção leishmaniótica, se deve,
24 provavelmente, a diferentes modelos de estudo de infecção experimental e a

1 características próprias de cada espécie. Nas condições de infecção natural do cão, como
2 demonstrado neste estudo, neutrófilos estão associados à progressão da infecção.

3 Tomando por base a carga parasitária e as características do infiltrado
4 inflamatório, na presença de neutrófilos, podemos especular que a análise de um
5 esfregaço de linfonodo pode nos indicar o risco epidemiológico potencial de um cão em
6 transmitir o parasito ao vetor, tendo em vista que na presença de poucos neutrófilos no
7 esfregaço a carga parasitária é baixa na pele. Ao contrário, na presença de muitos
8 neutrófilos no esfregaço de linfonodo, a carga parasitária é alta na pele.

9

10 **Agradecimentos**

11 Agradecemos a FAPEPI/CAPES pelo apoio financeiro dispensado a essa pesquisa.

12

13 **Referências**

14

15 Aga, E.; Katschinski, D. M.; Zandbergen, G.; Laufs, L.; Hansen, L.; Müller, K.;
16 Solbach, W.; Laskay, T. 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil
17 granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. J Immunol., 169, 898-905.

18 Barrouin-Melo, S. M.; Laranjeira, D. F., Trigo, J., Aguiar, P. H. P., Santos, W. L. C.,
19 Pontes-de-Carvalho, L. 2004. Comparison between splenic and lymph node aspirations
20 as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection
21 in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz, 99, 195-197.

22 Brasil-Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
23 Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.
24 Brasília: Editora do ministério da Saúde, 2006.

- 1 Chang, H. R., C. Vesin, G. E. Grau, P.; Pointaire, D.; Arsenijevic, M.; Strath, J. C.;
- 2 Pechere P. F., 1993. Respective role of polymorphonuclear leukocytes and their
- 3 integrins (CD-11/18) in the local or systemic toxicity of [lipopolysaccharide]. J.
- 4 Leukoc. Biol, 53,636–639.
- 5 Charmoy, M.; Megnekou, R.; Allenbach,C.; Zweifel, C.; Perez, C.; Monnat, K.;
- 6 Breton,M.; Ronet,C.; Launois,P.; Tacchini-Cottier, F., 2007. *Leishmania major* induces
- 7 distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. J.
- 8 Leukoc. Biol, 82, 288–299.
- 9 Chen, L., Zhang, Z. H.; Watanabe, T.; Yamashita, T.; Kobayakama, T.; Kaneko, A.;
- 10 Fujiwara, H.; Sendo. F. 2005. The involvement of neutrophils in the resistance to
- 11 *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. Parasitol. Int, 54,
- 12 109–118.
- 13 Dias, D. V.; Da Costa, C. A.; Toledo, V. P. C. P.; Bampirra, E.; Genaro, O.; Michalick,
- 14 M. S. M.; Costa, R. T.; Mayrink, W.; Oréface, F. 1999. Canine visceral leishmaniasis –
- 15 parasitological and histological study in canine eyes – Part 1. Rev. Bras. Oftalmol. 58,
- 16 331–337.
- 17 Figueiredo, F. B.; Madeira, M. F.; Nascimento, L. D.; Abrantes, T. R.; Mouta-Confort,
- 18 E.; Passos, S. R. L.; Schubach, T. M. P. 2010, Canine visceral leishmaniasis: Study of
- 19 methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. Rev Inst Med Trop Sao
- 20 Paulo, 52,193-196.
- 21 Giunchetti, R. C.; Martins-Filho, O. A.; Carneiro, C. M.; Mayrink, W.; Marques, M. J.;
- 22 Tafuri, W. L.; Corrêia-Oliveira, R.; Reis, A. B. 2008. Histopathology, parasite density

- 1 and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. Vet
2 Immunol Immunopathol, 121, 23-33.
- 3 Gueirard, P.; Laplante, A.; Rondeau, C.; Milon, G.; Desjardins, M. 2008. Trafficking of
4 *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables
5 the subsequent transfer of parasite to macrophages. Cell Microbiol, 10, 100-111.
- 6 Gueirard, P.; Laplante, A.; Rondeau, G.; Milon, G.; Desjardins, M. 2008. Trafficking
7 of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables
8 the subsequent transfer of parasites to macrophages. Cell Microbiol, 10, 100-111.
- 9 Laranjeira, D. L. Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente
10 infectados com *Leishmania (L) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade do
11 vetor. 2008 79f. Tese de Doutorado Patologia Experimental e Comparada- Faculdade de
12 Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008
- 13 Laufs, H.; Müller, K.; Fleischer, J.; Reiling, N.; Jahnke, N.; Jensenius, J. C.; Solbach,
14 W.; Laskay, T. 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil
15 granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. Infect Immun, 70,
16 826-835.
- 17 Lima W.G., Michalick M.S.M., Melo M.N., Tafuri W.L. & Tafuri W.L., 2004. Canine
18 visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. Acta Tropica, 92, 43-
19 53.
- 20 Lima, G. M.; Vallochi, A. L.; Silva, U. R.; Bevilacqua, E. M.; Kiffer, M. M.;
21 Abrahamsohn, I. A. 1998. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance
22 to cutaneous Leishmaniasis. Immunol. Lett, 64,145–151.

- 1 Luna, G.L., 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute
2 of pathology. New York McGraw Hill, 285p.
- 3 Maia, C; Campino, L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune
4 response to infection. *Vet Parasitol*, 158, 274-287.
- 5 Marzochi, M.C; Coutinho, S. G.; Sabrosa, P.L. 1985. Leishmaniose visceral canina no
6 Rio de Janeiro – Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 1, 432-446.
- 7 McFarlane, E.; Perez, C.; Charmoy, M.; Allenbach, C.; Carter, K. C.; Alexander, J.;
8 Tacchini-Cottier, F., 2008. Neutrophils contribute to development of a protective
9 immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect*
10 *Immun*, 76, 532-541.
- 11 Mikel, U.V., 1994. Advanced laboratory methods in histology and pathology. American
12 Registry of Pathology. Washington DC.
- 13 Moreno, J.; Alvar, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental
14 model. *Trends Parasitol*, v.18, p.399-405, 2002
- 15 Mylonakis, M. E.; Papaioannou, N.; Saridomichelatis, M. N.; Koutinas, A. F.; Billinis,
16 C.; Kontos, V. I., 2005. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with
17 *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol*, 34, 243-247.
- 18 Pearson, R. D.; Steigbigel, R. T. 1981. Phagocytosis and killing of the protozoan
19 *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol*, 127,
20 1438–1443.
- 21 Peruhype-Magalhães, V.; Martins-Filho, O. A.; Prataz, A.; Silvaz, L. A.; Rabello, A.;
22 Teixeira- Carvalho, A.; Figueiredo, R. M.; Guimarães-Carvalho, S. F.; Ferrariyy, T. C.

- 1 A.; Correa-Oliveira, R. 2005. Immune response in human visceral leishmaniasis:
2 analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease
3 outcome. *Journal of Immunology* 62, 487-495
- 4 Peters, N. C., Egen, J. G.; Secundino, N.; Debrabant, A.; Kimblin, N.; Kamhawi, S.;
5 Lawyer, P.; Fay, M. P.; Germain, R. N.; Sacks, D. L. 2008. In vivo imaging reveals an
6 essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321,
7 970-974.
- 8 Peters, N. C.; D. L. Sacks. 2009. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment
9 on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.*, 11:1290-1296.
- 10 Pinho, F. A. Quantificação de mRNA de IGF-I em pele, fígado, baço e linfonodo
11 poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, 2010.
12 Dissertação (Mestrado em ciência animal)- Centro de Ciências Agrárias, Curso de
13 medicina veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.
- 14 Queiroz, N. M. G. P.; Assis, J; Oliveira, T. M. F. S.; Machado, R. S.; Nunes, C. M.;
15 Starke-Buzetti, W. A. 2010. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas
16 técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e
17 ELISA-teste. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*, 1, 34-40.
- 18 Queiroz, N. M. G. P.; Silveira, R. C. V.; Noronha Jr., A. C. F.; Oliveira, T.M.F.S.;
19 Machado, R. Z.; Starke-Buzetti, W. A. 2011. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in
20 canine skin. *Vet Parasitol*, 178, 1-8.
- 21 Reis, A. B. et al. 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine
22 visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 87-95,

- 1 Ribeiro-Gomes, F. L.; Otero, A. C.; Gomes, N. A.; Moniz-de-Souza, M. C.; Rose, E.K.;
2 Curtis, J.; Baldwin, T.; Mathis, A.; Kumar, B.; Sakathianandeswaren, A.; Spurck, T.;
3 Low Choy, J.; Handman, E. 2004. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos isolation and
4 characterization of the causative organism. *Int J Parasitol*,34, 655-664.
- 5 Rousseau, D.; Demartino, S.; Ferrua, B.; Michiels, J. F.; Anjuère, F.; Fragaki, K.;
6 Fichoux, Y. L.; Kubar, J. 2001. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils
7 in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiology* , 1, 1-17.
- 8 Silva, A. K.; Bonello, F. L.; Baratelli, S. C.; Pinheiro, A.; Santana, E. A.; Silva, F. P.;
9 Abdelnour, A. 2007. Avaliação parasitológica em amostras obtidas de linfonodos e
10 medula óssea de cães sorologicamente positivos para leishmaniose. *Ciê. Agr. Saúde*, 7-
11 12.
- 12 Solano-Galeno, L.; Rieira, C.; Roura, X.; Iniestra, L.; Gallego, M.; Valladares, J. E.;
13 Fisa, R.; Castillejo, S.; Alberola, J.; Ferrer, L. Arboix, M.; Portus, M. 2001.
14 leishmaniasis infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody response in healthy and
15 ill dogs from endemic áreas. Evolution in the course of infection and after treatment.
16 *Vet Parasitol*,96,265-276.
- 17 Travi, B. L. et al. 2001. Canine visceral leishmaniasis in colombia: relationship between
18 clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *The American Society of*
19 *Tropical Medicine and Hygiene*, 64,119-124.
- 20 Verçosa, B. L. A.; Lemos, C. M.; Mendonça, I. L.; Silva, S. M. M. S.; Carvalho, S. M.;
21 Goto, H.; Costa, F. A. L., 2008, Transmission potencial, skin inflammatory response and
22 parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC*
23 *vet Res*,4, 1-7.

- 1 Xavier, S. C.; Andrade, H. M.; Hadade Monte, S. J.; Chiarelli, I. M.; Lima, W. G.;
- 2 Michialick, M. S.; Tafuri, W. L.; Tafuri, W. L. 2006. Comparison of paraffin-embedded
- 3 skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of
- 4 *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR
- 5 methods. BMC Vet. Res. 2, 1-7p.

1 Figuras

2 **Fig. 1**

3 Figura 1: *Imprint* de linfa de orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania*
4 (*Leishmania*) *chagasi*. Presença de formas amastigotas de *Leishmania*. Coloração:
5 Giemsa. Aumento: 100x

6 **Fig. 2**

7 Figura 2: Esfregação de sangue de orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania*
8 (*Leishmania*) *chagasi*. Presença de formas amastigotas de *Leishmania*. Coloração:
9 Giemsa. Aumento: 100x

10 **Fig. 3**

11 Figura 3: *Imprint* de tecido de orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania*
12 (*Leishmania*) *chagasi*. Presença de formas amastigotas de *Leishmania*. Coloração:
13 Giemsa. Aumento: 100x

14 **Fig. 4**

15 Figura 4: NÃO TEM

16 **Fig. 5**

17 Figura 5: Análise quantitativa da carga parasitária em linfonodo poplíteo de cães
18 polissintomáticos e oligossintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania*
19 (*Leishmania*) *chagasi* e de cães contorles. *p= 0.000393 (teste de Kruskal Wallis e
20 método de Dunn).

21 **Fig. 6**

1 Figura 6: Análise quantitativa da presença de neutrófilos em pele de orelha de cães
2 naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e de cães contorles. *p=
3 0,00 (teste de Mann-Whitney).

4 **Fig. 7**

5 Figura 7: Análise quantitativa da presença de neutrófilos em pele de orelha de cães
6 polissintomáticos e oligossintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania*
7 (*Leishmania*) *chagasi* e de cães contorles. *p= 0,00 (teste de Kruskal Wallis e Student
8 Newman Keuls).

9 **Fig. 8**

10 Figura 8: correlação entre a carga parasitária e a presença de neutrófilos em pele de
11 orelha de 20 cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. p =
12 0,005 (Regressão Linear).

13 **Fig. 9**

14 Figura 9: correlação entre a carga parasitária e a presença de neutrófilos em pele de
15 orelha de 10 cães polissintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania*
16 (*Leishmania*) *chagasi*. p = 0,01 (Regressão Linear).

17 **Fig. 10**

18 Figura 10: Análise quantitativa da presença de neutrófilos em linfonodo poplíteo de
19 cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e de cães contorles.
20 *p= 0,00 (teste de Mann-Whitney)

21 **Fig. 11**

22 Figura 11: Análise quantitativa da presença de neutrófilos em linfonodo poplíteo de
23 cães polissintomáticos e oligossintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania*

1 (*Leishmania*) *chagasi* e de cães contorles. *p= 9.37E-011 (teste Kruskal Wallis e
2 método Student-Newman-Keuls)

3 **Fig. 12**

4 Figura 12: correlação entre a carga parasitária e a presença de neutrófilos em linfonodo
5 poplíteo de 20 cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. p =
6 0,0027 (Regressão Linear).

7 **Fig. 13**

8 Figura 13: correlação entre a carga parasitária de pele de orelha e a presença de
9 neutrófilos em linfonodo poplíteo de 20 cães naturalmente infectados por *Leishmania*
10 (*Leishmania*) *chagasi*. p = 0,0300 (Regressão Linear).

11 **Fig. 14**

12 Figura 14: correlação entre sinais clínicos e a carga parasitária em linfonodo poplíteo
13 de 20 cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. p = 0,00
14 (Regressão Linear).

15 **Fig. 15**

16 Figura 15: Pele de orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania* (*Leishmania*)
17 *chagasi*. Infiltrado inflamatório com presença de neutrófilos. Coloração H-E 40X

18 **Fig. 16**

19 Figura 16: Pele de orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania* (*Leishmania*)
20 *chagasi*. Granuloma. Coloração H-E 40X

21 **Fig. 17**

1 Figura 17: Pele de orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania)*
2 *chagasi*. Infiltrado inflamatório mononuclear, ausência de neutrófilos. Coloração H-E
3 20X

4 **Fig. 18**

5 Figura 18: Análise semi-quantitativa da intensidade da presença de neutrófilos em pele
6 de orelha (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) de cães
7 polissintomáticos e oligossintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania*
8 (*Leishmania chagasi*) e de cães controles não infectados. *p= 0,00109 (teste de Kruskal
9 Wallis e método de Dunn)

10 **Fig. 19**

11 Figura 19: Linfonodo de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania)*
12 *chagasi*. Infiltrado inflamatório na capsula constituído por células mononucleares
13 (linfócitos e macrófagos) e neutrófilos. Coloração H-E 10X

14 **Fig. 20**

15 Figura 20: Linfonodo de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania)*
16 *chagasi*. Depleção de células na região paracortical. Coloração H-E 20X

17 **Fig. 21**

18 Figura 21: Linfonodo de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania)*
19 *chagasi*. Presença de macrófagos monomórficos com o citoplasma repleto de
20 leishmânias. Coloração H-E 100X

21 **Fig. 22**

22 Figura 22: Análise semi-quantitativa da intensidade da presença de neutrófilos em
23 linfonodo poplíteo (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) de cães

- 1 polissintomáticos e oligossintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania*
- 2 (*Leishmania*) *chagasi* e de cães controles não infectados. *p= 0.000928 (teste de
- 3 Kruskal Wallis e método de Dunn)

Figura 1.

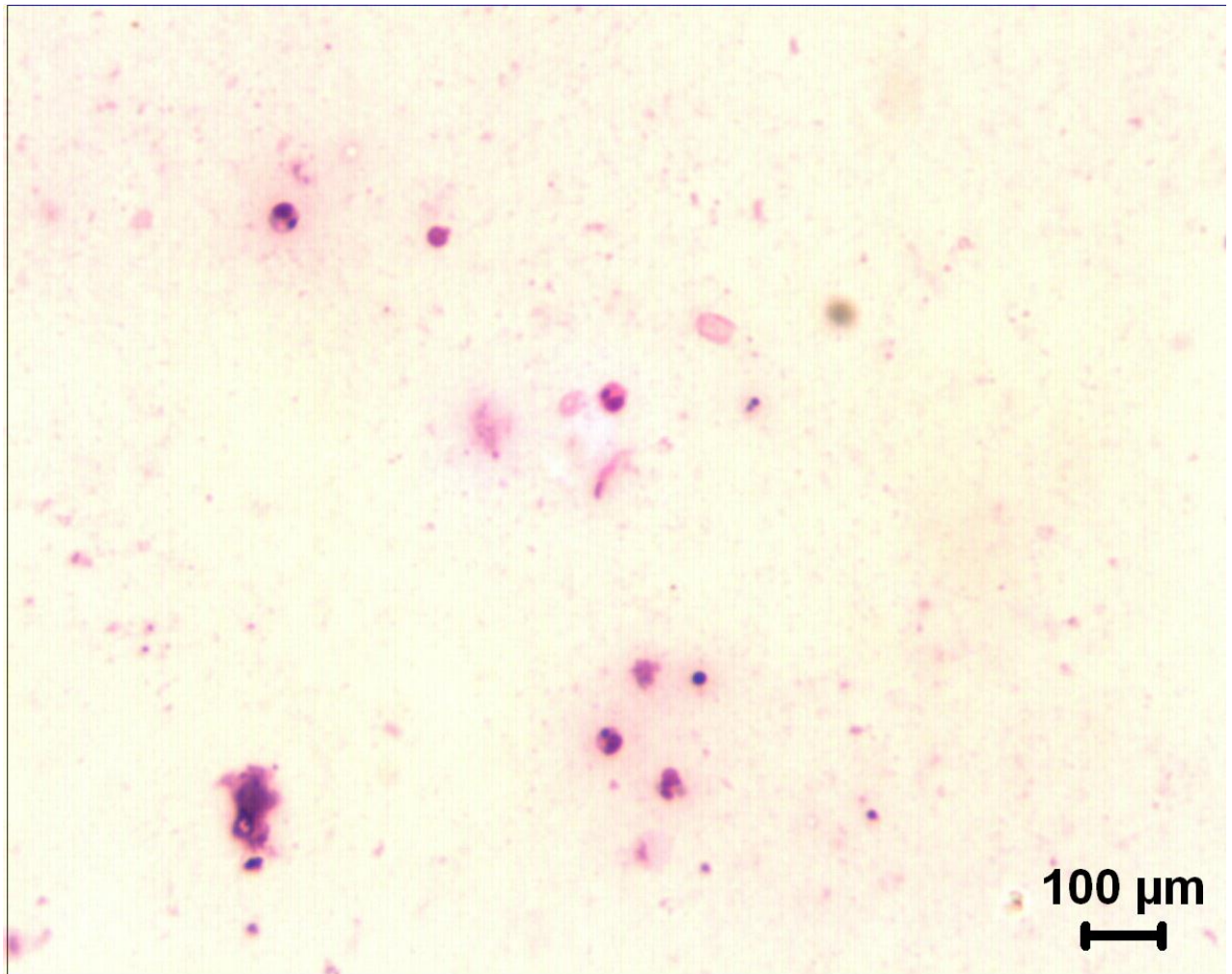


Figura 2.

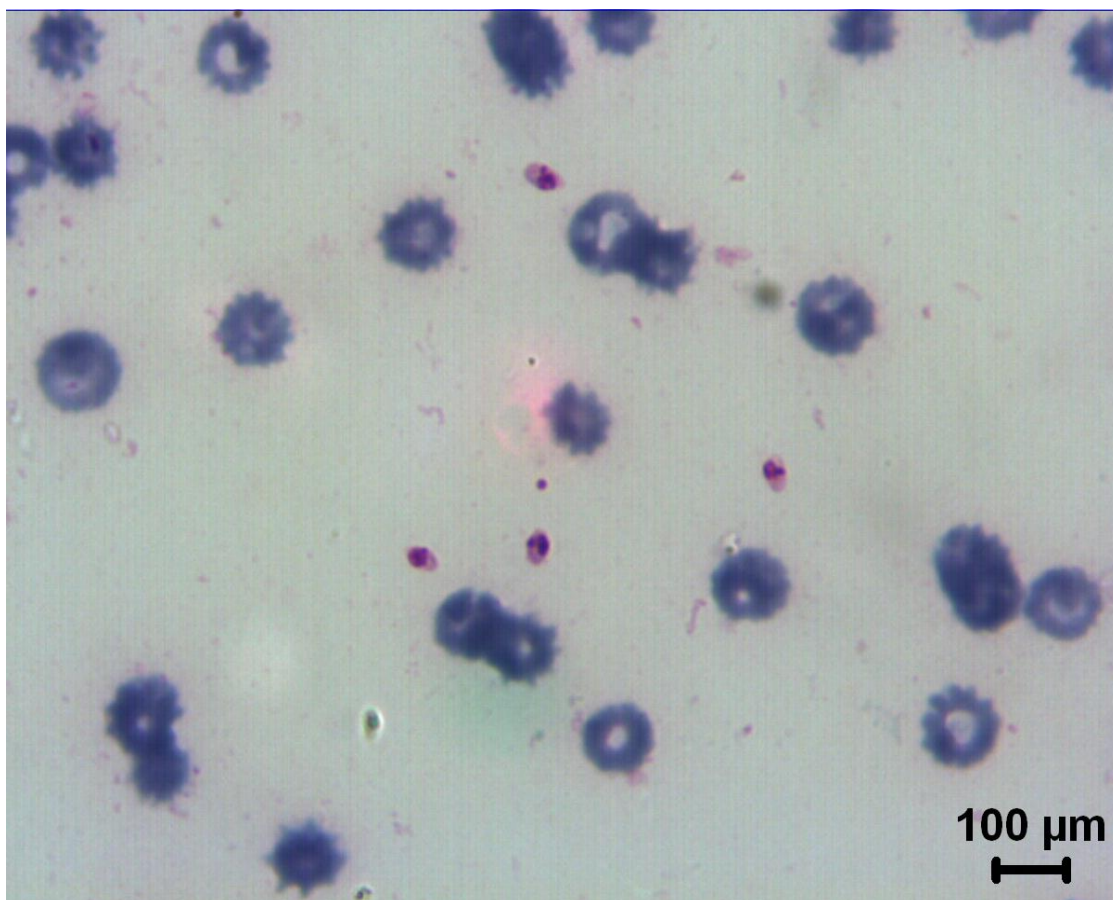


Figura 3.

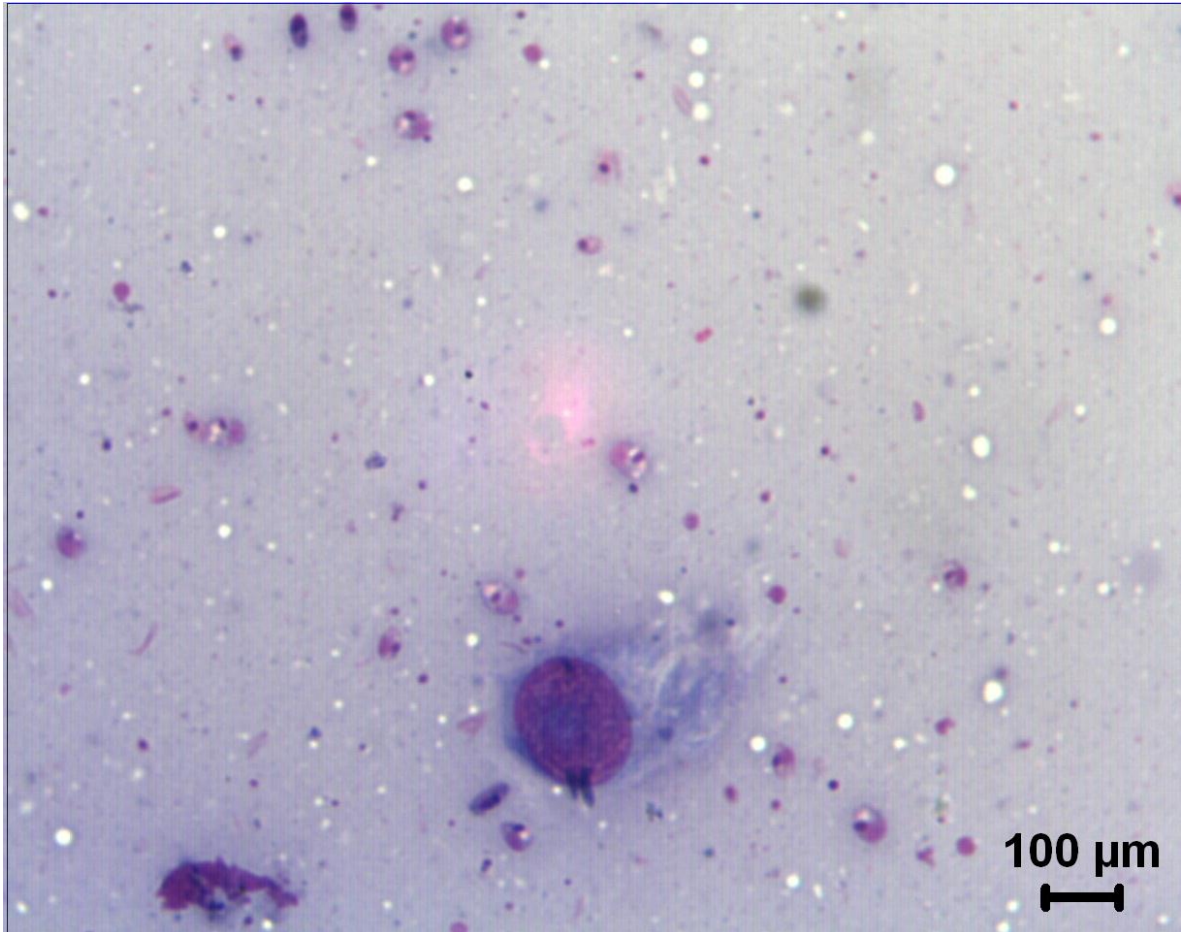


Figura 4.

Nkdsnvksdvnsidejfoiamc

Figura 5.

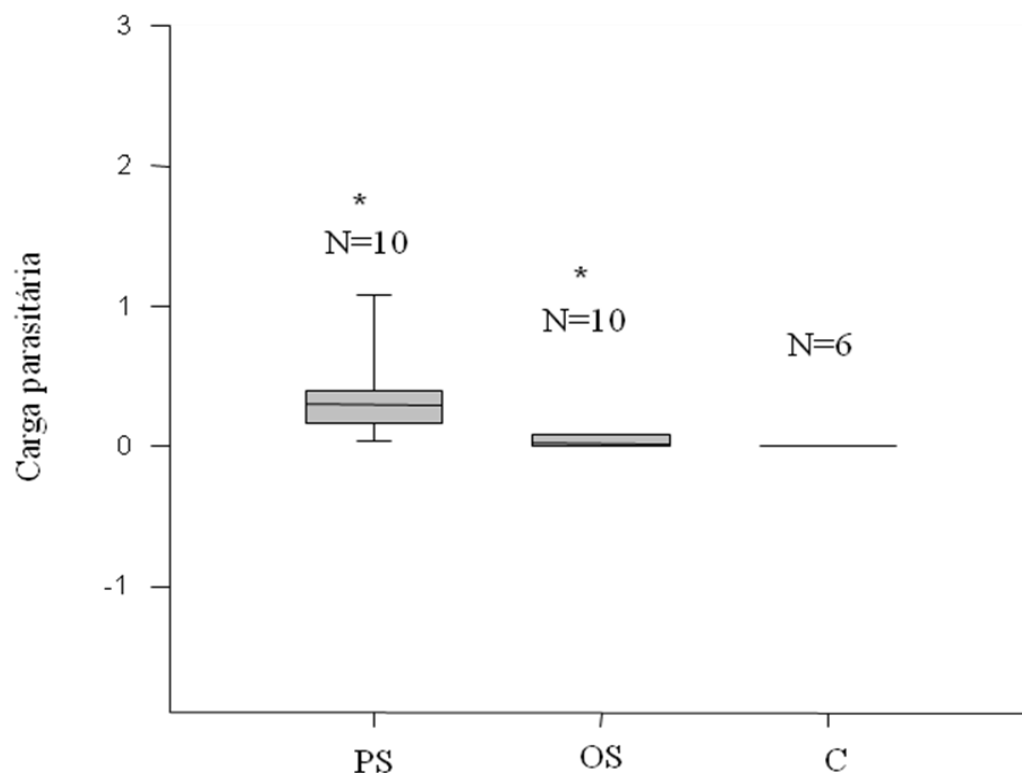


Figura 6.

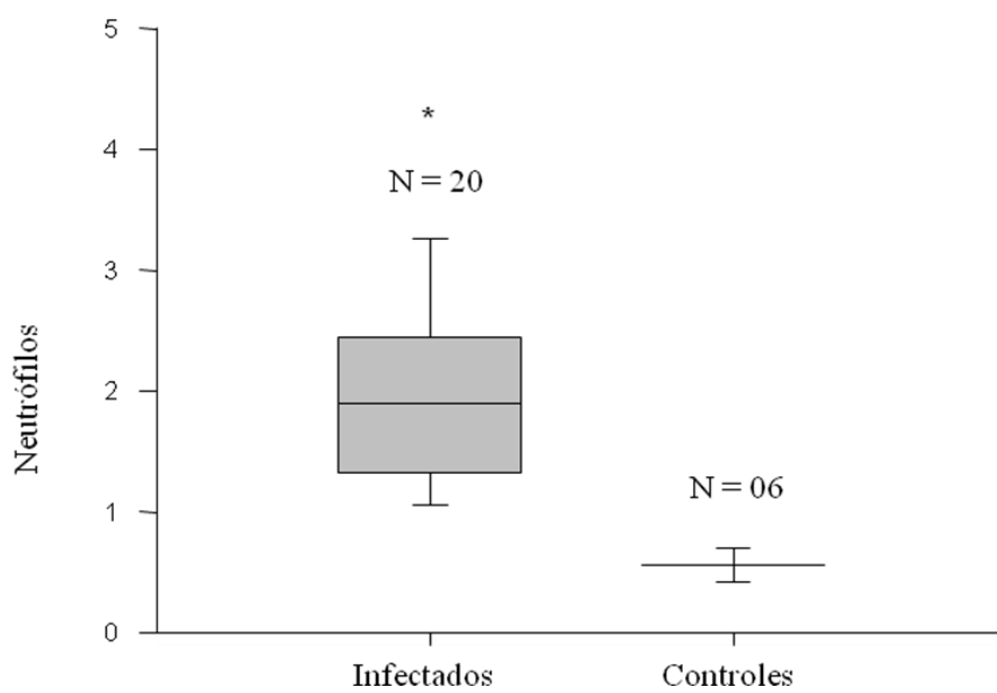


Figura 7.

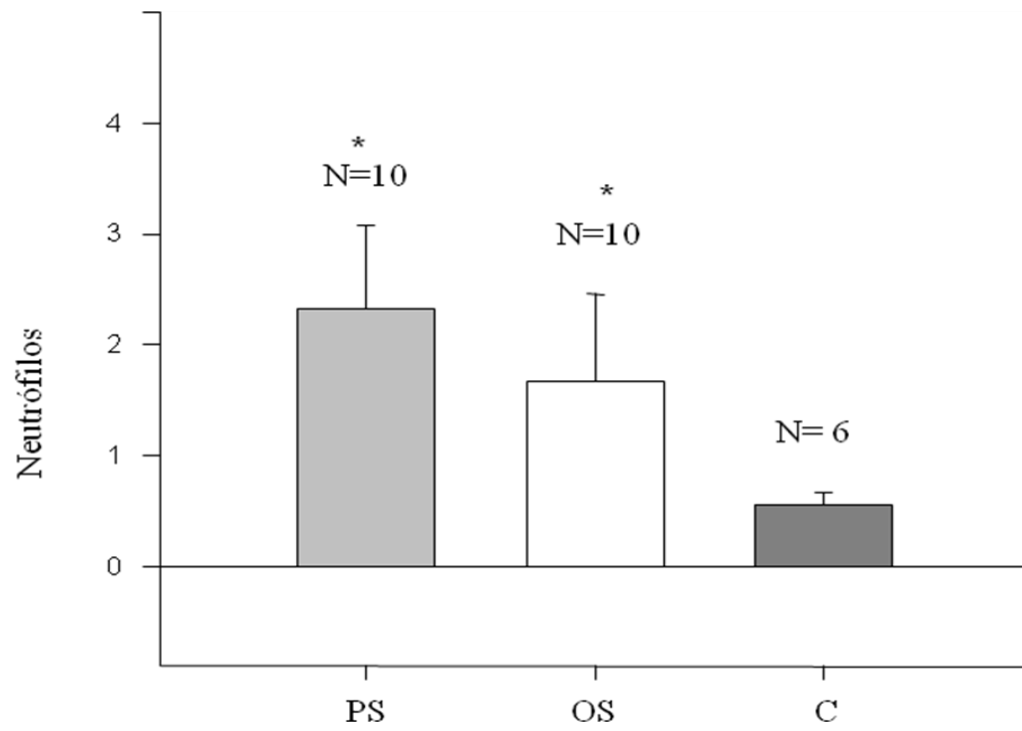


Figura 8.

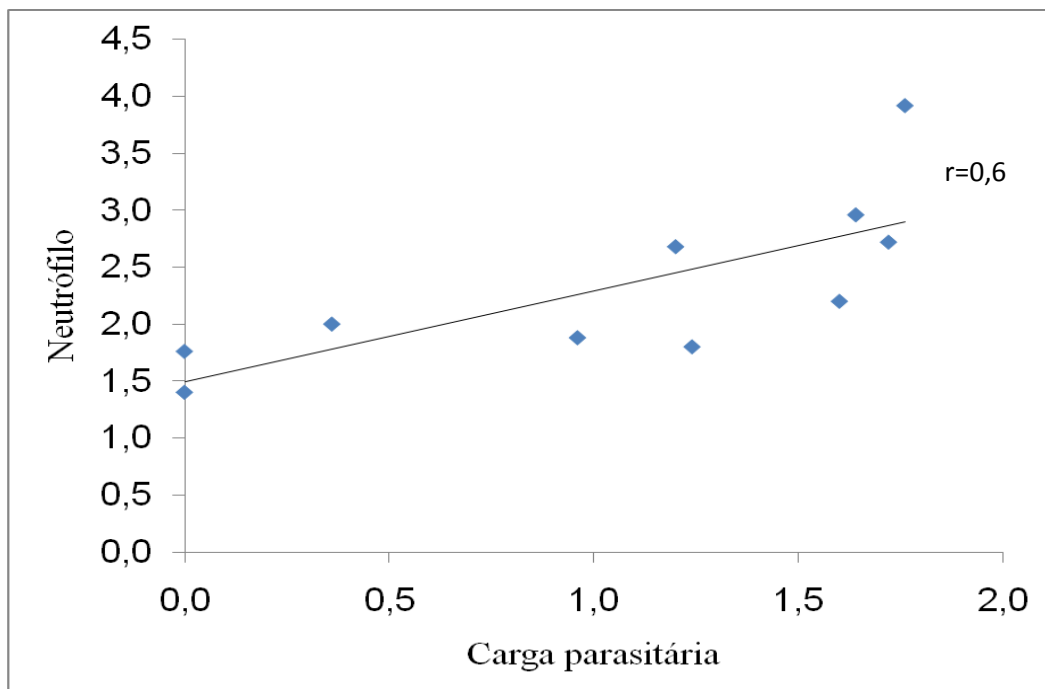


Figura 9.

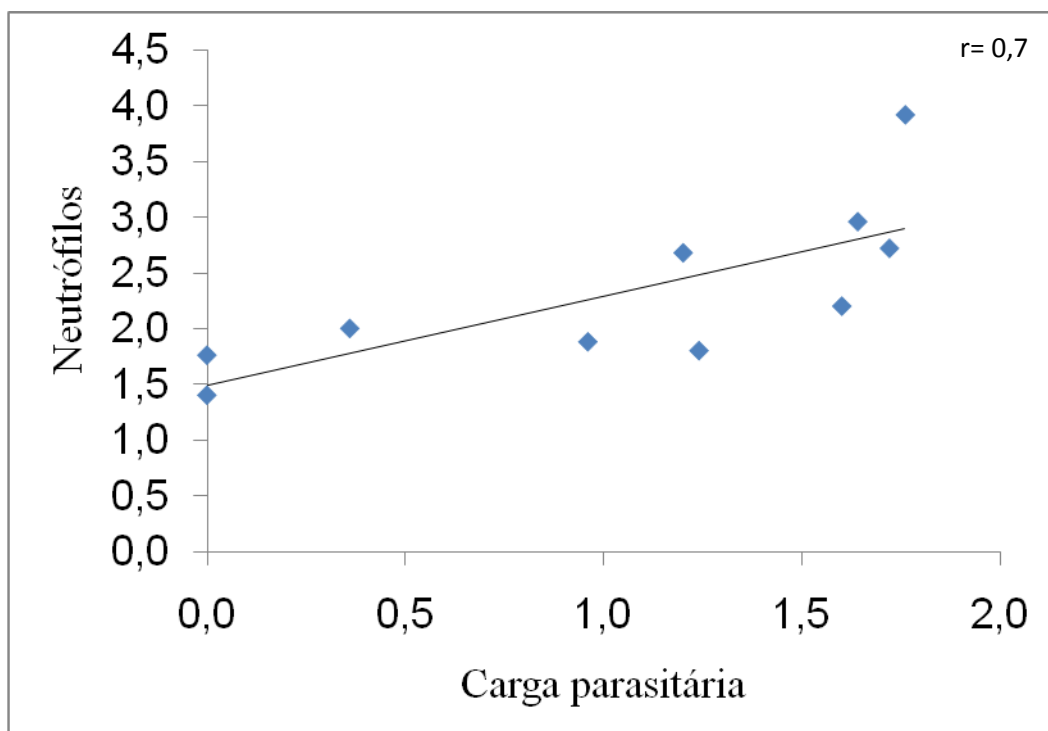


Figura 10.

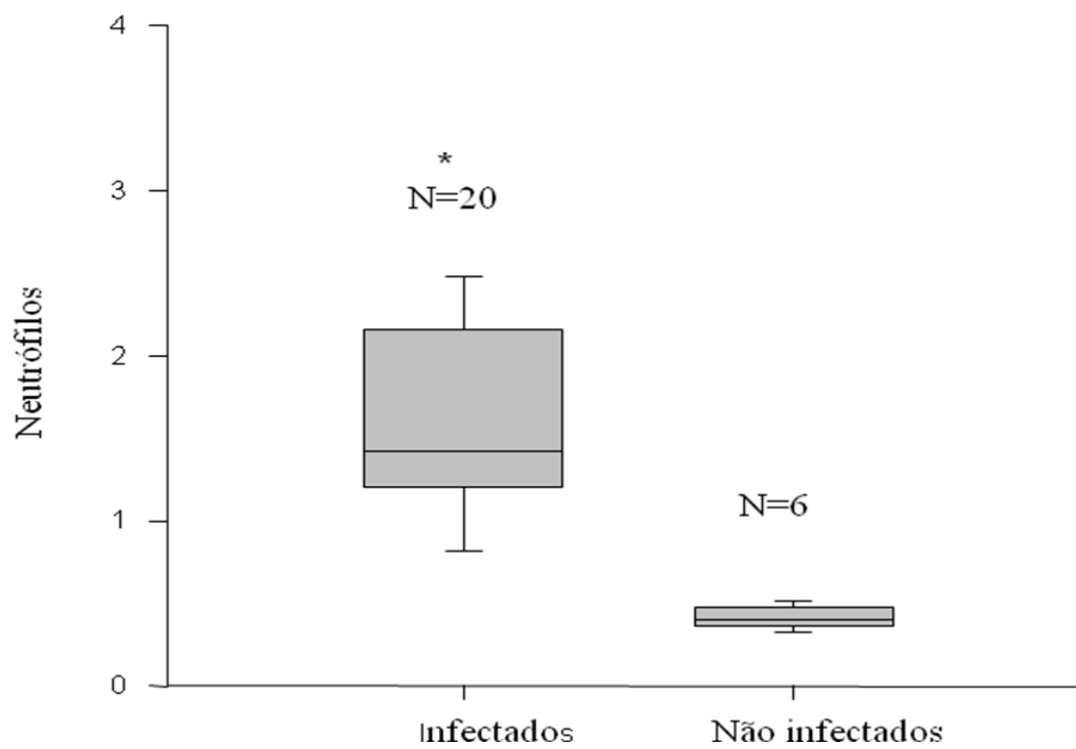


Figura 11.

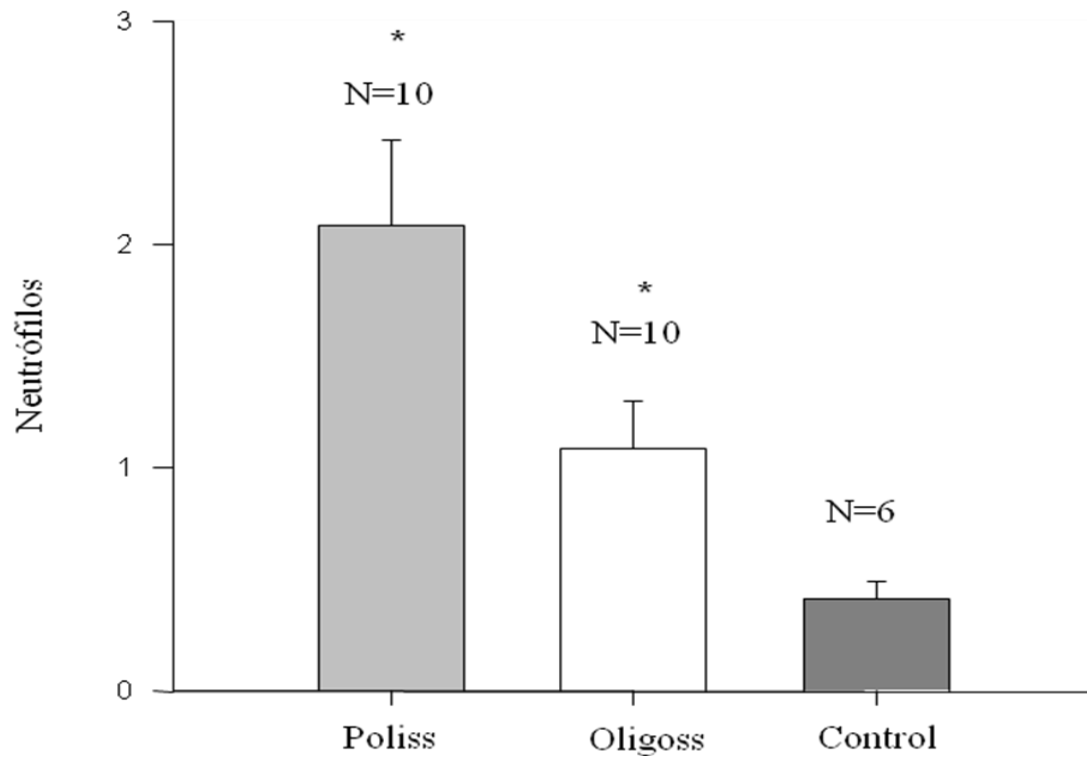


Figura 12.

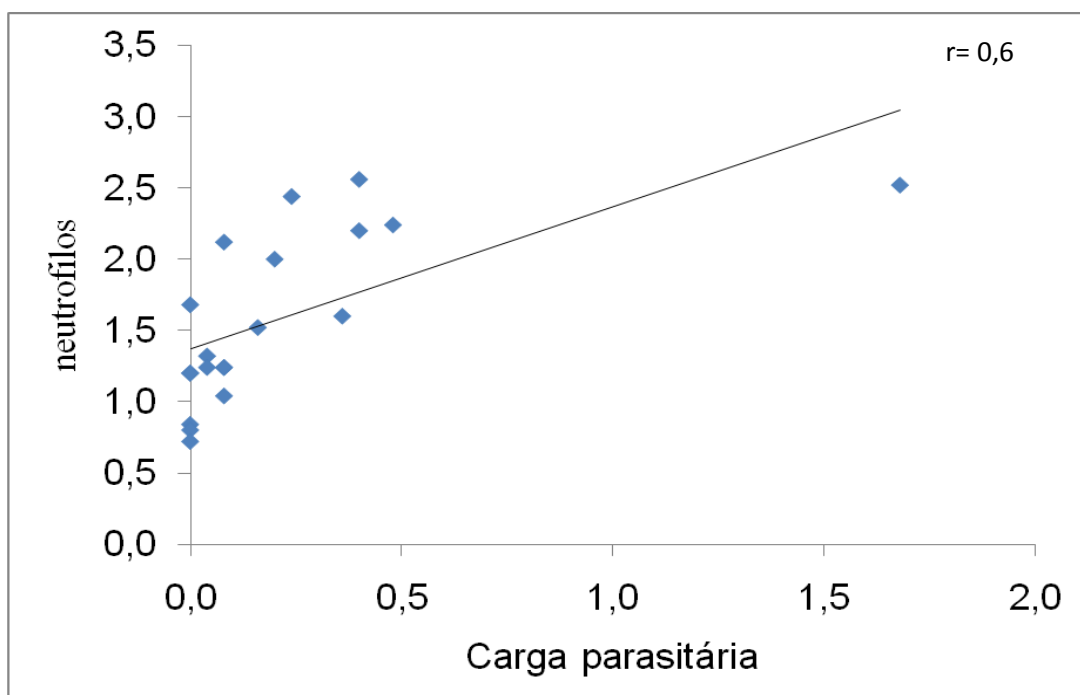


Figura 13.

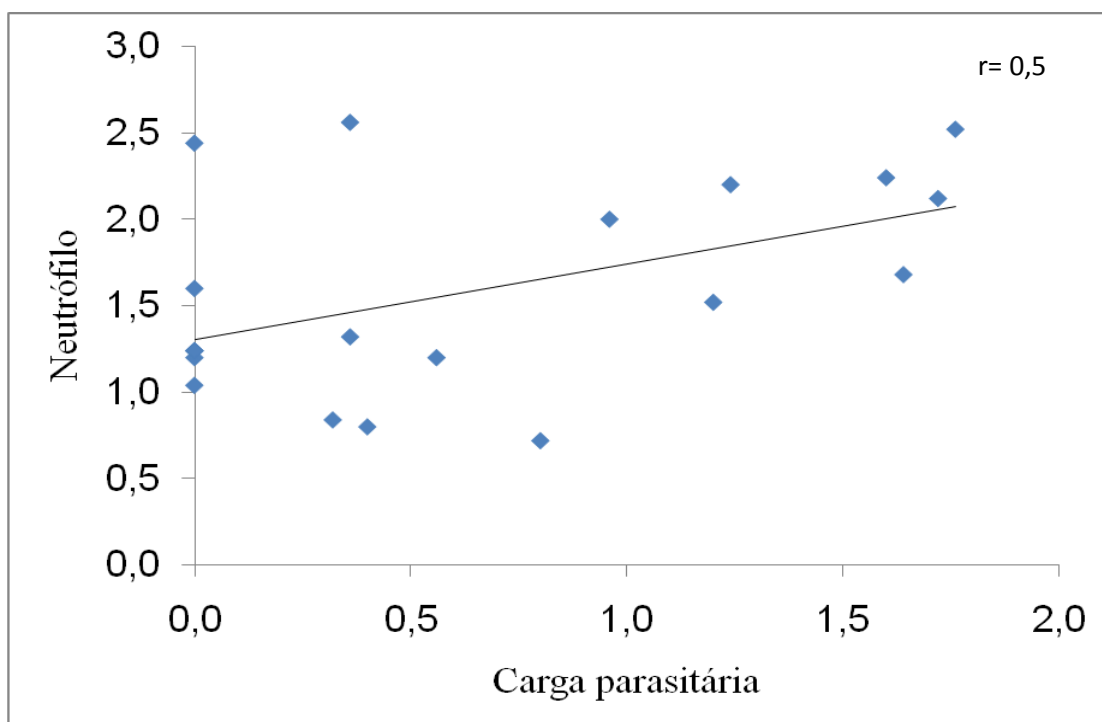


Figura 14.

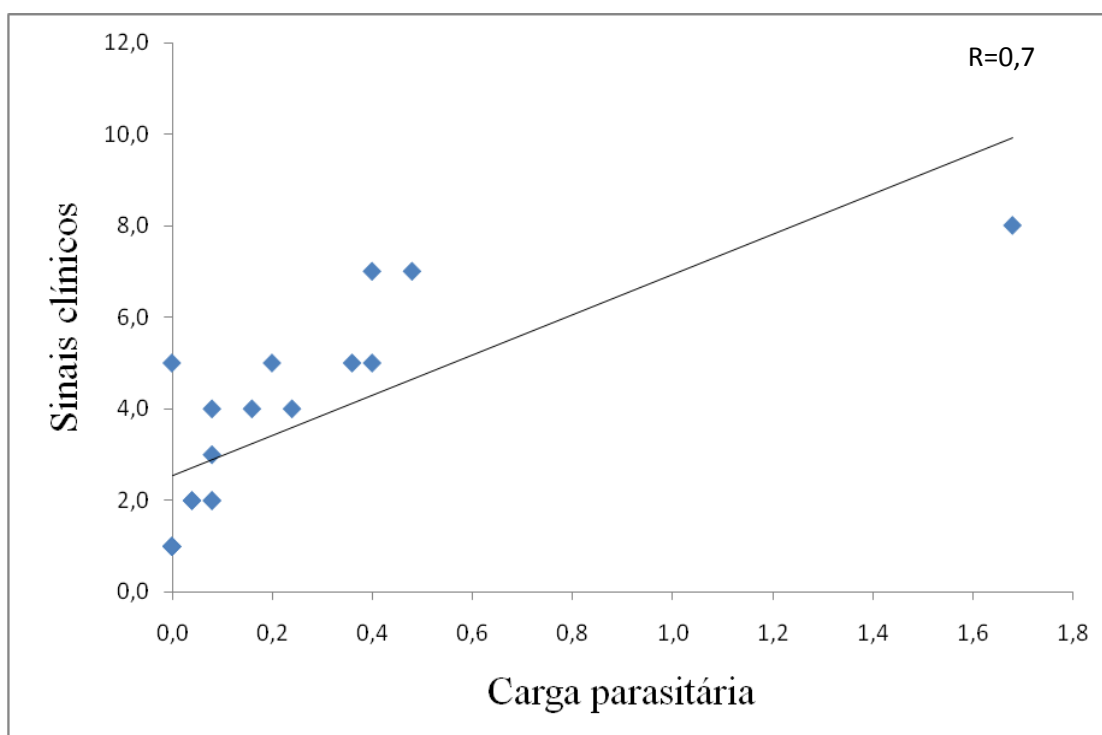


Figura 15.

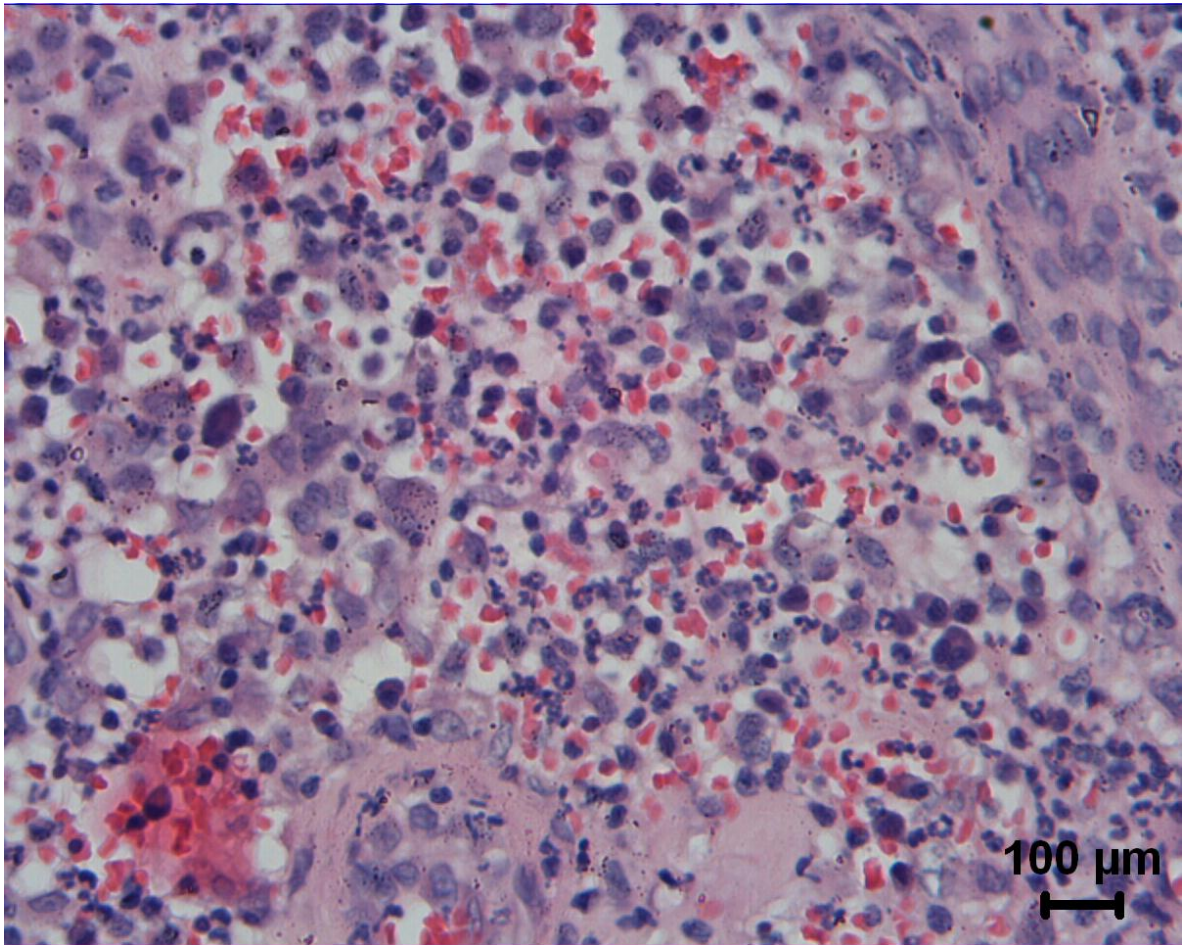


Figura 16.

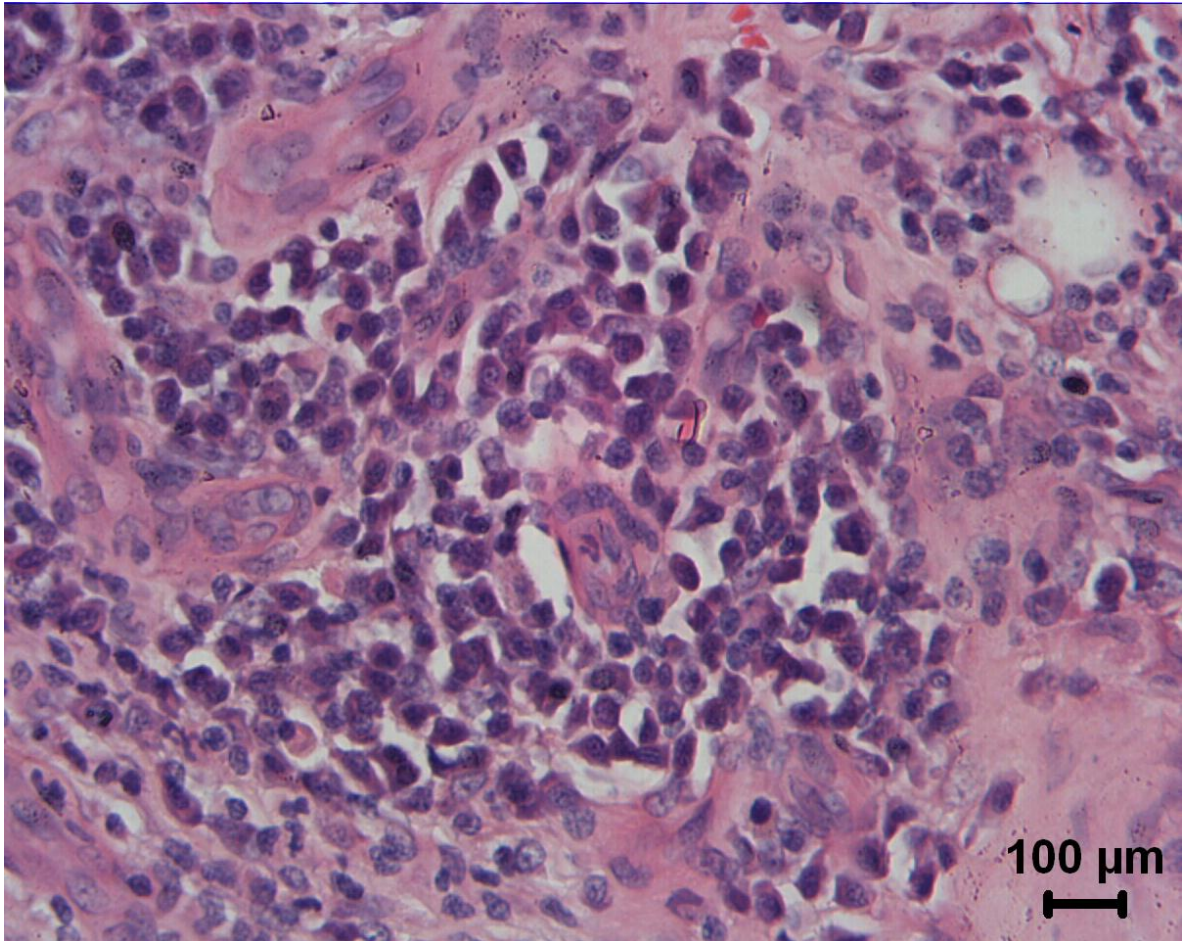


Figura 17.

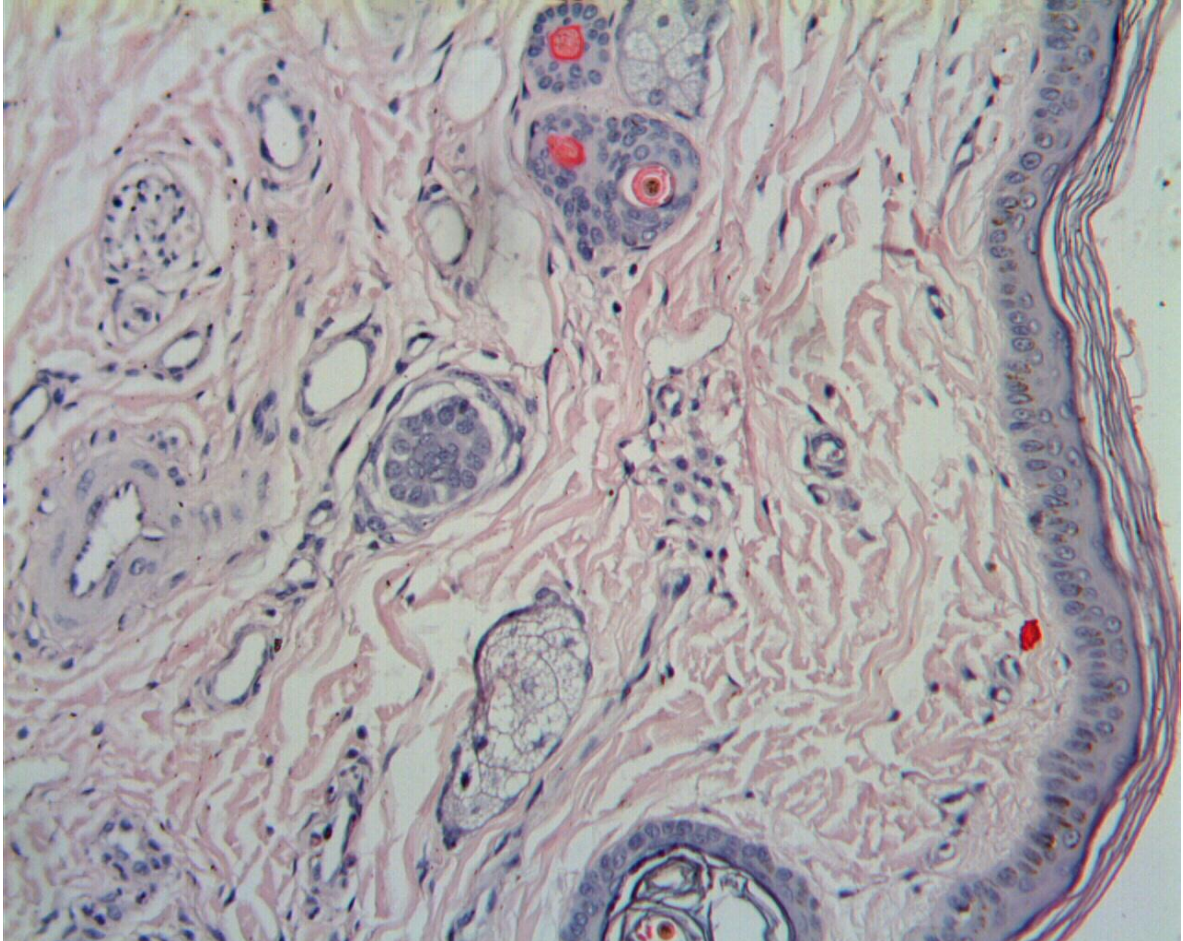


Figura 18.

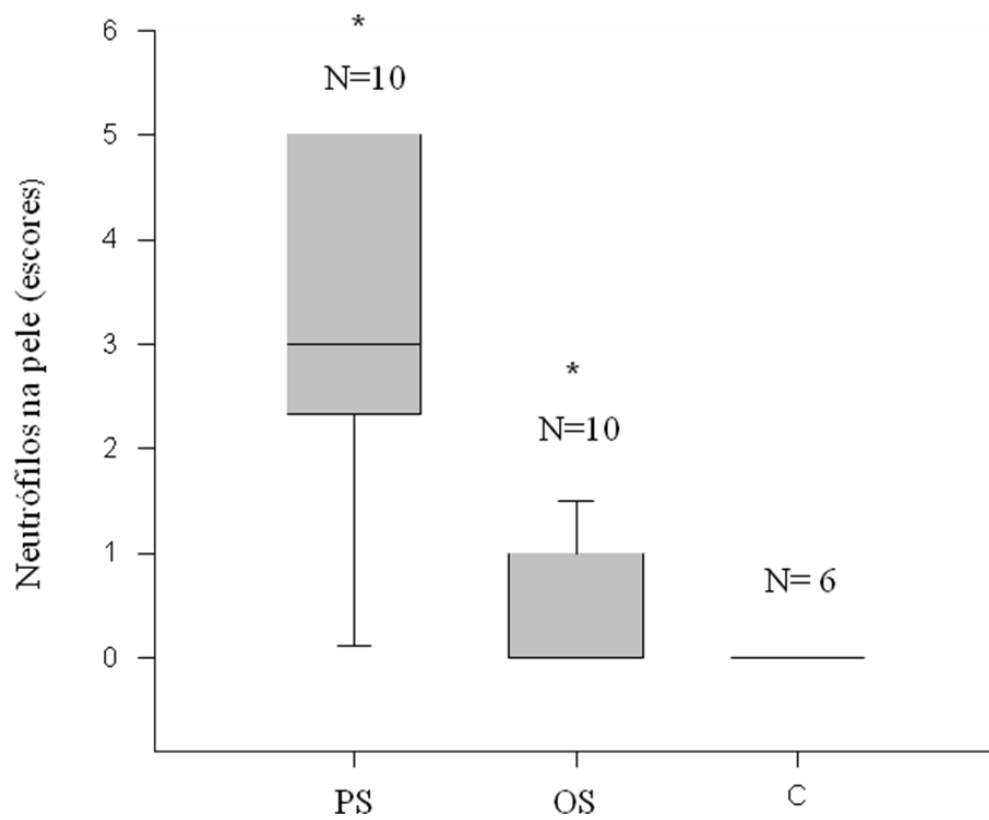


Figura 19.

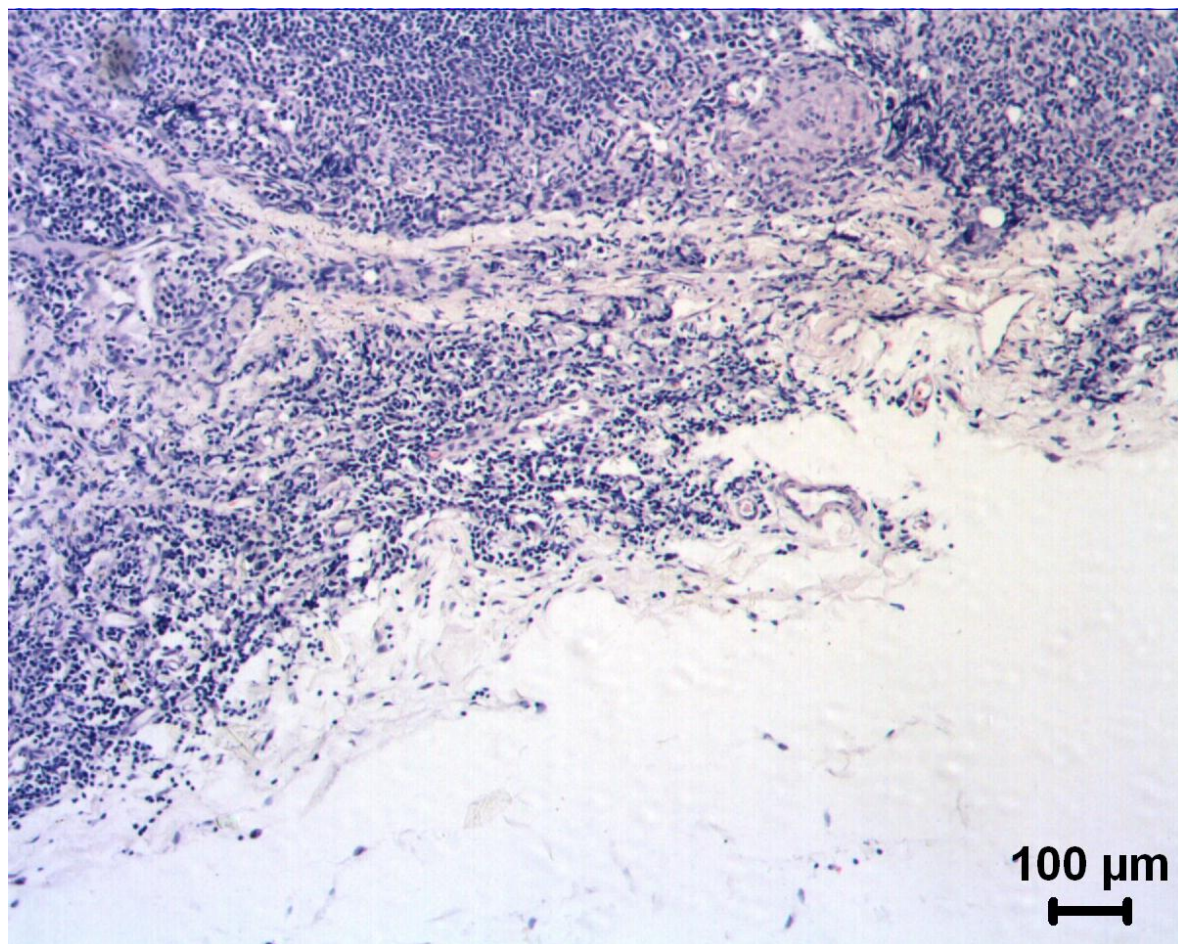


Figura 20.

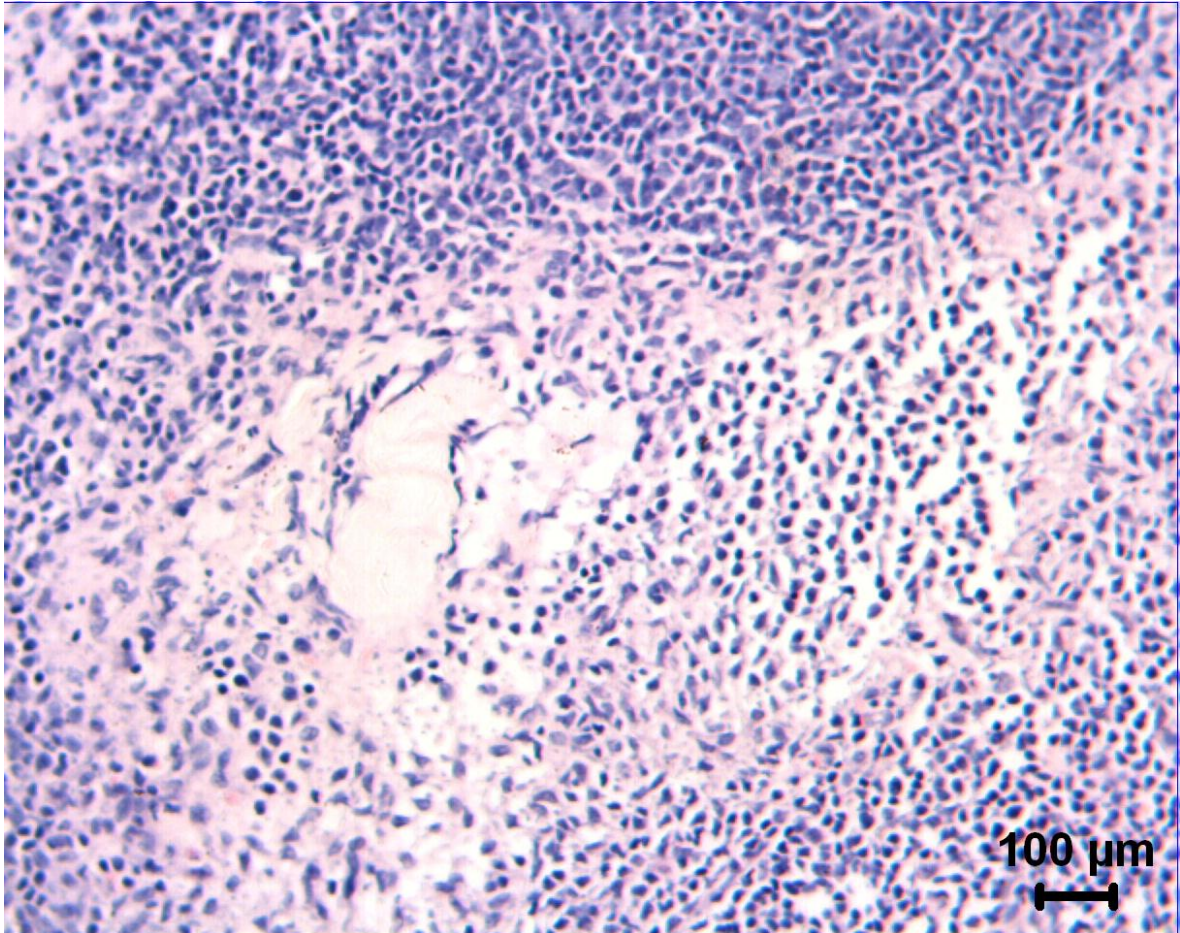


Figura 21.

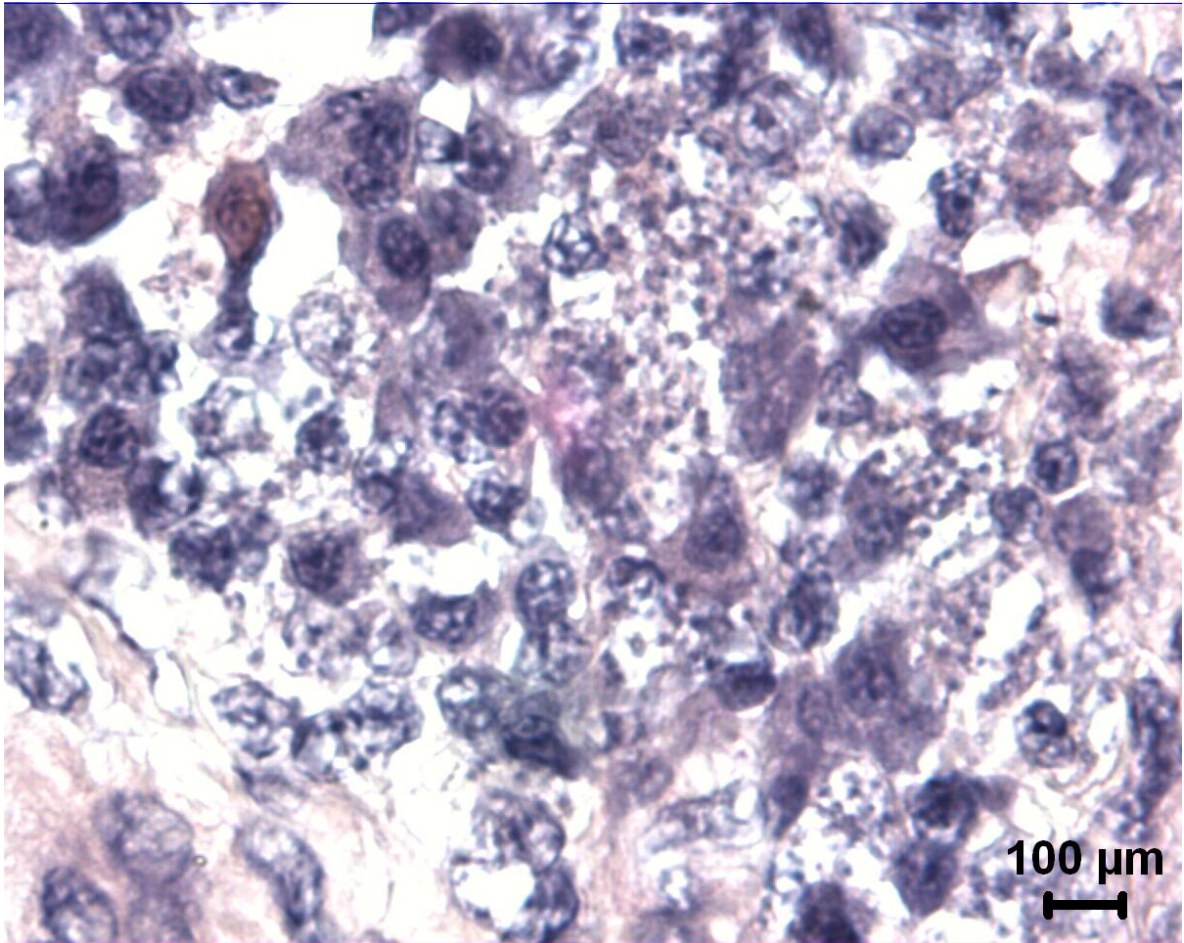
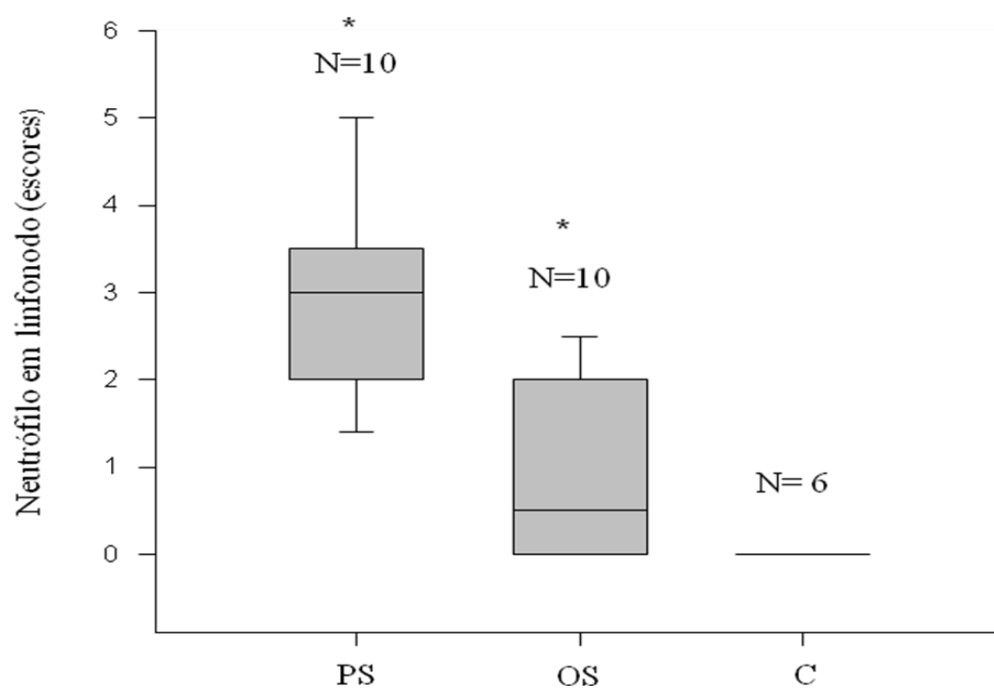


Figura 22.



3. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados permitem as seguintes conclusões:

1. Amastigotas são detectadas em maior número de animais em aspirado de linfonodo;
2. A maior probabilidade em encontrar amastigotas é na pele, pois a carga parasitária é maior;
3. Os vetores se infectam, em maior proporção, dos parasitos presentes na pele e em menor proporção, dos parasitos que chegam pelo fluxo linfático e sanguíneo;
4. A presença de neutrófilos está associada a uma carga parasitária maior;
5. O risco do cão transmitir a infecção ao vetor está relacionada à presença de neutrófilos no infiltrado inflamatório de linfonodo, pois o número de parasitos na pele é maior quando há presença de neutrófilos no linfonodo;
6. Quanto maior a carga parasitária no linfonodo mais intensa é a gravidade das manifestações clínicas;
7. O exame citológico do linfonodo poplíteo pode ser usado para avaliar o risco epidemiológico do cão no ciclo infeccioso da LV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AGA E, KATSCHINSKI DM, VAN ZANDBERGEN G, LAUFS H, HANSEN B. MULLER K, SOLBACH W, LASKAY T: Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of immunology*, v.169, p. 898-905, 2002.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, v.57, p. 1-88, 2004.

ALVES ; BEVILACQUA. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Caderno de saúde pública*, v.20, p.259-265, 2004

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M. Comparation of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical and Hygiene*, v. 53, p. 251-255, 1995.

BADARÓ, R.; BENSO, D.; EULALIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. J. rK39: A cloned antigen of *leishmania chagasi* that prelicts active visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Disiases*, n.173, p.758-761, 1996

BALEEIRO, C.; PARANHOS-SILVA, M.; SANTOS, J.; OLIVEIRA, G.; NASCIMENTO, E.; CARVALHO, L.; SANTOS, W. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic área. *Veterinary Parasitology*, v. 139, p. 21-28, 2006.

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.28, p.329-337, 2006

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A. Canine leishmaniasis: Identification of asymptomatic carries by polymerase chain reaction and immunoblotting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 55, p. 273-277, 1996.

BOCETA, C.; ALONSO, C.; JIMENEZ-RUIZ, A. Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.22, p.55-62, 2000

BRAGA, M. D.; COELHO, I. C.; POMPEU, M. M.; EVANS, T. G.; MAC-AULLIFE, I. T.; TEXEIRA, M. J.; LIMA, W. O. Controlo f canine visceral leishmaniasis compararison of reults from a rapid elimination programo f serum reactive dogs immunoenzyme assay and slower elimination of serum reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.31, n.5, p.419-424, 1998

BRASIL-Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Editora do ministério da Saúde, 2006

CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. Advances in immunology, v.73, p. 369, 1999

CHANG, H. R., C. VESIN, G. E. GRAU, P. POINTAIRE, D. ARSENIJEVIC, M. STRATH, J. C. PECHERE, AND P. F. PIGUET. Respective role of polymorphonuclear leukocytes and their integrins (CD-11/18) in the local or systemic toxicity of lipopolysaccharide. Journal of leukocyte biology, v.53,p.636–639, 1993.

CHARMOY, M.; MEGNEKOU, R.; ALLENBACH, C; ZWEIFEL, C.; PEREZ, C.; MONNAT, K.; BRETON, M.; RONET, C.; LAUNOIS, P.;TACCHINI-COTTIER, F. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. Journal of leukocyte biology, v 82, p.288–299 2007.

CHEN, L., ZHANG, Z. H.; WATANABE, T.; YAMASHITA, T.; KOBAYAKAWA, T.; KANEKO, A.; FUJIWARA, H.; SENDO. F.. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. Parasitology international, v. 54, p.109–118, 2005.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONI, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by leishmania infantum. The veterinary Record, v. 141, p.539-543, 1997

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. Leishmaniose visceral americana (calazar americano ou neotropical) In___. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo: Atheneu, p. 65-80,1999.

CIRAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONI, A. A retrospective clinical atudy of canine leishmaniasis in 150 dogs

naturally infected by *leishmania infantum*. The Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 56, p. 319-327, 1997

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A. FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; de MARIA, M. LINARDI, P. M. Participation of Rhipicephalus sanguíneos (acari: ixodidae) in the epidemiology of canine viscerla leishmaniasis. Veterinary Parasitology, v.128, p.149-155, 2005

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to outhor mamals?. Veterinary Parasitology, v.147, p.320-325, 2007

CUNHA, A. M E CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus leishmania pathogenic to man leishmania chagasi sp previous note. Hospital (Rio de Janeiro), v.11, p.3-9, 1937

DEPLAZES, P. SMITH, N. C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; SECRET, J. Specific IgG and IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to leishmania infantum and outhor parasites. Parasite Immunology, v.17, p.451-458, 1995

DIAS, D. V.; DA COSTA, C. A.; TOLEDO, V. P. C. P.; BAMBIRRA, E.; GENARO, O.; MICHALICK, M. S. M.; COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; ORÉFICE, F. 1999. Canine visceral leishmaniasis – parasitological and histological study in canine eyes – Part 1. Revista brasileira de oftalmologia. v, 58, p. 331–337, 1999.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L. Forty years of visceral leishmaniasis in the state of Piauí: a review. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.53, p.3-11, 2011.

FERRER, L. M. Clinical aspect of leishmaniasis In: Proceedings or the International canine Leishmaniasis Forum Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis on update: Wiesbaden Hoeschst Roussel Vet, p. 6-10, 1999.

FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F.; NASCIMENTO, L. D.; ABRANTES, T. R.; MOUTA-CONFORT, E.; PASSOS, S. R. L.; SCHUBACH, T. M. P. Canine visceral leishmaniasis: Study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. Revista do Instituto de medicina Tropical. São Paulo, v.52, p.193-196, 2010

FONDEVILA, D.; VILAFRANÇA, M.; FERRER, L. Epidermal immuno competence in canine leishmaniasis. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.56, p.319-327, 1997

- FREITAS, E.; MELO, M. N.; da COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. M. Transmission of leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, v. 137, p.159-167, 2006
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, n.3, p.338-349, 2004.
- GRANDONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis: moving towards a solution. *Proceedings of the second International canine leishmaniasis forum*. Servilha, Spain, p.7-14, 2002.
- GUEIRARD, P.; LAPLANTE, A.; RONDEAU, C.; MILON, G.; DESJARDINS, M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasite to macrophages. *Cellular Microbiology*, v. 10. P.100-111, 2008
- LAISON, R. E SHAW, J. J. Evolution classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in biology and medicine*. Academic Press Inc (London) Ltd, v.1, p.1-20, 1987
- LARANJEIRA, D. L. Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade do vetor. 2008 79f. Tese de Doutorado Patologia Experimental e Comparada- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008
- LAVERAN, C. L. A; MESNIL, F. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplas madonovani* Lou. Et mean) Parasite d'une fièvre d'Inde. *C.R.Hebd.Acad.Sci.*,n.137, p.957-961, 1903.
- LEITE, G. Leishmaniasis visceral.I. introduction, history e epidemiology. *Revista Brasileira de medicina*, v.15, p.605-610, 1958
- LIMA, G. M.; VALLOCHI, A. L.; SILVA, U. R.; BEVILACQUA, E. M.; KIFFER, M. M.; ABRAHAMSOHN. I. A.. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunology letters*, v. 64, p.145–151, 1998.
- MACIANRI, F.; TARDONI, S.; MELOSI, M. Evaluation of the effectiveness of commercial immunomigration test in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Parasitologia*, v.44, p.99, 2002.
- MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M.; LEAL L. A.; MARZOCH, M. C. A. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic

and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases*, v.8, p.440-444, 2004

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for leishmania from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.138, p.366-370, 2006

MAIA, C.; RAMADA, J.; CRISTOVÃO, J., CAMPINO, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Journal of Veterinary*, 2007

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

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. I. evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene*, v. 82, p. 566-567, 1988

MARZOCHI, M. C. A., COUTINHO, S.G., SOUZA, W. J., AMENDOEIRA, M. R. Leishmaniose visceral (calazar). *Jornal Brasileiro de medicina*, v. 41, n.5, p.61-84, 1981

MARZOCHI, M.C; COUTINHO, S. G.; SABROSA, P.L. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v.1, n.4, p. 432-446, 1985

McFARLANE, E.; PEREZ, C.; CHARMOY, M.; ALLENBACH, C.; CARTER, K. C.; ALEXANDER, J.; TACCHINI-COTTIER, F. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infection and immunity*, v.76, p.532-541, 2008

MEREDITH, S.; KROON, N.; SONDORP, E.; SEAMAN, J.; GORIS, M.; INGEN, C.; OOSTING, H.; SCHOONE, G.; TERPSTRA, W.; OSKAM, L. Leish-kit, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal Clinical Microbiology*, v. 33, p. 1742-1745, 1995.

MOHEBALI, M.; TARAN, M.; ZARET, Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using a immunochromatographic dipstick rK39 test and direct agglutination. *Veterinary Parasitology*, v. 121, p. 289-245, 2004.

- MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. F. C.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebótomos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical*, v.1, p. 147-157, 2005
- MONTEIRO, S. P.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 27, p. 67-72, 1994.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, v.18, p.399-405, 2002
- MYLONAKIS, M. E.; PAPAIO ANNOU, N.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V. I. Citologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *L. infantum*. *Veterinary Parasitology*, v.34, p.243-247, 2005
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology*, v. 6, p. 173–182, 2006.
- NEOGY, A.; VOULDOUKIS, J.; SILVA, O.; TSELENTIS, Y.; LASCOMBE, J.; SEGALIN, T.; RZEPKA, D.; MONJOUR, L. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic área of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 44, p. 772-777, 1992.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. *Parasitologia Humana*, 11º ed , Ed Atheneu, São Paulo, p.56-72, 2005
- NICOLE, C. Isolument et culture des corps de leishman. *Archive de Institut Pasteur de Tunis*, v.3, p.55-56, 1908
- NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology*, v. 16, p. 213-232, 2005.
- OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; DORVAL, M. E. L.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R.; SANCHES, M.; CUNHA, R. V.; BOIA, M. N. Foco Emergente de leishmaniose Visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical**. V.39, n.5, p.446-450, 2006.

- OLIVEIRA, L. S.; JULIAO, F. S.; SOUZA, V. M. M.; FREITAS, D. S.; SOUZA, B. M. P. S.; PAULE, B. J. A.; AGUIAR, P. H. P.; MELO, S. M. B., FRANKE, C. R. A utilização da Imunofluorescência Indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. *Ciência Animal Brasileira*, v.6, n.1, p.41-47, 2005
- PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T.. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of immunology*, v. 127, p.1438–1443, 1981.
- QUINNELL, R. J. COURTNEY, O.; SHAW, M.; DAY, M. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, C.; KAYE, P. M. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, v.183, p.1421-1424, 2001
- RAMIRO, M.J.; ZARATE, J.J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J.A.; LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, v.21, p.2474-2484, 2003.
- REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, p. 87-95, 2009
- REY, L. Parasitos e doenças parasitárias de homem nas Américas e na África. *Parasitologia*. Ed. Guanabara Koogan 2ª edição, Rio de Janeiro, p.731, 1991
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C.; ROSE, K.; CURTIS, J.; BALDWIN, T.; MATHIS, A.; KUMAR, B.; SAKATHIANANDESWAREN, A.; SPURCK, T.; LOW CHOY, J.; HANDMAN, E. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterization of the causative organism. *International Journal for parasitology*, v.34, p 655-664, 2004.
- ROSS, R. Further notes on leishmania's bodies. *British medical Journal*, v.11, p.1401, 1903
- SABROZA, P. Epidemiologia das leishmanioses. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Araujo/Fiocruz. Agência Fiocruz de Notícias. Rio de Janeiro, 2006
- SANTOS, L.R., BARROUIN-MELO, S.M., CHANG, Y.; OLSEN, J.; MCDONOUGH, S.P.; QUIMBY, F. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA

expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 98, p. 43-48, 2004.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. R.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALLACO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, v.12, p.315-317, 1998

SCHALLING, G. H.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; SILVA, E. Evaluation of the direct agglutination test and the rk39 dispstick teste for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 1015-1018, 2002b.

SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DO PIAUÍ. Coordenação de Vigilância em Saúde Ambiental. Programa de Controle das Leishmanioses. Série histórica de 1998 a 2008. Teresina: Secretaria Estadual da Saúde; 2009.

SHALLING, H.; SCHOONE, G.; BEIJER, E.; KROON, C.; HOMMERS, M.; OZBEL, Y.; OZENSOY, S.; SILVA, E.; CARDOSO, L. Development of a fast agglutination serelning test (FAST) for the detection of anti-Leishmania antibodies in dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 109, p.1-8, 2002a.

SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A.; CARREIRA, S. C. A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.2, n.1, p. 324-328, 2005

SILVA, E. S.; GONTINJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O. P.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 285-2, 2001

SILVA, E.; VANDER MEIDE, W.; SCHOONE, G.; GONTIJO, C.; SCHALLING, H.; BRAZIL, R. Diagnosis of Canine Leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Veterinary research communications*, v.30, p.637-643, 2006.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Veneral transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v.160. p.55-59, 2009

SOLANO-GALENO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESRA, L.; GALLEGO, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. ARBOIX, M.; PORTUS, M. leishmaniasis infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody response in healthy and ill dogs from endemic áreas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary Parasitology*, v.96, p.265-276, 2001

THALHOFER, C. J.; CHEN, Y.; SUDAN, B.; LOVE-HOMAN, L.; WILSON, M. E. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infection and Immunity*, v.79, p.108-117, 2011

TRAVI, B. L. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Columbia: Relationship between clinical and parasitology status and infectivity for sand flies. *The American Society of tropical Medicine and Hygiene*, v.64, p.119-124, 2001

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. *Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia*, v.24, p.146-154, 2001

VERÇOSA, B. L. A.; LEMOS, C. M.; MENDONÇA, I. L.; SILVA, S. M. M. S.; CARVALHO, S. M.; GOTO, H.; COSTA, F. A. L. Transmission potencial, skin inflammatory response and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC veterinary Research*, v.4, p. 1-7, 2008

WILLENSE, T. *Leishmaniose: Dermatologia clínica de cães e gatos*. 1 ed. São Paulo: Manole, Cap. 5, p. 42-43, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en_>. Acesso em 28 de Agosto de 2011.

XAVIER, S. C.; ANDRADE, H. M.; HADADE MONTE, S. J.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; MICHIALICK, M. S.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC veterinary research*, v. 2, p. 1-7, 2006.

Apêndice 1

FICHA PARA EXAME CLÍNICO

Identificação
Animal nº _____
Sexo: Macho () Fêmea (); Cor: _____
Peso: _____ Kg; Idade: _____
Procedência: _____
Diagnóstico: Sorológico _____ Parasitológico _____

Exame clínico
Emagrecimento: Sim () Não () Alopecia: Sim () Não ()
Descamação furfurácea na pele (seborréia): Sim () Não () Queratite: Sim () Não ()
Lesões na pele: Sim () Não ()
- Localização: Focinho () Orelha () Extremidades () Outros _____
Ulcerações na pele: Sim () Não ()
- Localização: Focinho () Orelha () Extremidades () Outros _____
Despigmentação no focinho: Sim () Não ()
Nódulos Subcutâneos: Sim () Não () Onicogribose: Sim () Não () Conjuntivite: Sim () Não ()
Edema: Sim () Não () Apatia: Sim () Não ()
Febre: Sim () Não () Mucosas pálidas: Sim () Não ()
Coriza: Sim () Não () Tosse: Sim () Não () Epistaxe: Sim () Não () Espirro: Sim () Não ()
Dispnéia: Sim () Não () Incoordenação motora: Sim () Não ()
Hiperestesia: Sim () Não ()
Paresia do trem posterior: Sim () Não ()
Fezes sanguinolentas: Sim () Não () Diarréia: Sim () Não ()
Linfonodos superficiais aumentados: Sim () Não () Qual? _____

Exame de necropsia
Linfonodos mesentéricos aumentados: Sim () Não ()
Baço aumentado: Sim () Não () Fígado aumentado: Sim () Não ()
Observações: _____

