

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
MEDICINA VETERINÁRIA**

**SAULO PEREIRA CARDOSO**

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC): REVISÃO DE  
LITERATURA E ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE  
CITOPATOLOGIA, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA NO  
DIAGNÓSTICO DA LVC EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS DO  
DISTRITO FEDERAL**

**Orientador: Prof. Janildo Ludolf Reis Junior**

**BRASÍLIA – DF  
SETEMBRO / 2012**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
MEDICINA VETERINÁRIA**

**SAULO PEREIRA CARDOSO**

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC): REVISÃO DE LITERATURA E ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE CITOPATOLOGIA, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DA LVC EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS DO DISTRITO FEDERAL**

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

**Orientador: Prof. Janildo Ludolf Reis Junior**

**BRASÍLIA – DF  
OUTUBRO / 2012**

Cardoso, Saulo Pereira

Leishmaniose Visceral Canina (LVC): revisão de literatura e estudo comparativo entre as técnicas de citopatologia, histopatologia e imunohistoquímica no diagnóstico da LVC em cães naturalmente infectados do Distrito Federal. / Saulo Pereira Cardoso; orientação de Janildo Ludolf Reis Júnior; – Brasília, 2012.

71p. : il.

Monografia de Graduação – Universidade de Brasília – UnB/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CARDOSO, S. P., Leishmaniose Visceral Canina (LVC): revisão de literatura e estudo comparativo entre as técnicas de citopatologia, histopatologia e imunohistoquímica no diagnóstico da LVC em cães naturalmente infectados do Distrito Federal, **Monografia (graduação)** - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV, Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 71p., 2012

### **Cessão de Direitos**

**Nome do Autor:** Saulo Pereira Cardoso

**Título da Monografia de Conclusão de Curso:** LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC): REVISÃO DE LITERATURA E ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE CITOPATOLOGIA, HISTOPATOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DA LVC EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS DO DISTRITO FEDERAL.

**Ano:** 2012

É concedida à Universidade de Brasília a permissão para a reprodução e divulgação desta monografia para fins acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Saulo Pereira Cardoso

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: CARDOSO, Saulo Pereira

Título: Leishmaniose Visceral Canina (LVC): revisão de literatura e estudo comparativo entre as técnicas de citopatologia, histopatologia e imuno-histoquímica no diagnóstico da LVC em cães naturalmente infectados do Distrito Federal

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em: 09/10/2012

Banca Examinadora

Prof. Janildo Ludolf Reis Junior

Julgamento: APROVADO

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: Janildo Ludolf Reis Junior

Prof. Márcio Botelho de Castro

Julgamento: Aprovado

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: Márcio Botelho de Castro

Prof<sup>a</sup> Vanessa Silva Mustafa

Julgamento: aprovado

Instituição: Faculdades Integradas do Planalto Central

Assinatura: Vanessa Silva Mustafa

## DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente à Deus, sem Ele não poderia ter chegado aqui.

Aos meus queridos pais, Célia e Eriel, por terem me apoiado, acreditado e me concedido estudos de qualidade.

Aos meus irmãos, Gustavo e Isabela, por me ampararem em momentos difíceis.

À minha namorada, Alyne, pelos conselhos e pelo carinho que me ajudaram a ser o homem que sou hoje.

## **AGRADECIMENTOS**

A turma XXII de Medicina Veterinária da UnB e meus grandes amigos José Mário, Felipe, Thaísa e Priscilla, pela amizade acolhedora.

Aos funcionários do histotécnico Lícia, Camila, Lilian, Anderson, Mário, Pablo pela ajuda nas pesquisas científicas.

Ao meu orientador Janildo L. Reis Jr., pelos ensinamentos e doutrinações em patologia veterinária.

A professora Rafaela M. Barros pelo incentivo à patologia veterinária.

Aos professores da patologia Márcio Castro e Luciana Sonne, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos e colegas de trabalho Edson, Breno, Lucas, João, Gustavo, Rebekah, Letícia, Vanessa, Mirna, Anahí e Karla, por terem feito parte da minha história na patologia.

Aos companheiros da Diretoria de Vigilância Ambiental – DIVAL, pela parceria de grande valia nas pesquisas do Laboratório de Patologia Veterinária.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XI
<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1. ETIOLOGIA</b> .....	15
<b>2.2. EPIDEMIOLOGIA</b> .....	16
2.2.1. Distribuição.....	16
2.2.2. Fatores de risco.....	17
2.2.3. Reservatório.....	18
2.2.4. Ciclo de Vida.....	19
2.2.5. Resistência do agente.....	23
2.2.6. Vetores.....	23
2.2.7. Transmissão.....	25
2.2.8. Susceptibilidade.....	26
2.2.9. Período de incubação.....	27
<b>2.3. FISIOPATOGENIA</b> .....	27
2.3.1. Evasão ao sistema complemento.....	28
2.3.2. Interações com macrófagos.....	29
2.3.3. Interações com neutrófilos.....	29
2.3.4. Resposta imune em animais resistentes.....	30
2.3.5. Resposta imune em animais susceptíveis.....	31
2.3.6. Interação entre Th1 e Th2 na LVC.....	32

<b>2.4. SINAIS CLÍNICOS.....</b>	<b>33</b>
<b>2.5. PATOLOGIA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.6. DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>38</b>
2.6.1. Clínico.....	38
2.6.2. Laboratorial.....	38
2.6.2.1. Post-mortem.....	39
2.6.2.2. Citopatologia.....	39
2.6.2.3. Histopatologia.....	40
2.6.2.4. Imuno-histoquímica.....	41
2.6.2.5. RIF e ELISA.....	42
2.6.2.6. PCR.....	43
<b>2.7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....</b>	<b>45</b>
<b>3. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE CITOPATOLOGIA, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DA LVC EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS DO DISTRITO FEDERAL.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.3. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>3.4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.:** Áreas endêmicas de LVC no mundo, com adaptações.....17
- Figura 2.:** Casos autóctones de LV no Brasil.....18
- Figura 3.:** Ciclo de vida da *Leishmania*, com adaptações.....20
- Figura 4.:** Diferentes formas de *Leishmania* spp. no interior do vetor, com adaptações. (A) intestino anterior, (B) intestino médio torácico, (C) intestino médio abdominal, (D) intestino posterior, (p) paramastigota, (h) haptomônada, (i) promastigota infectante, (n) nectomônadas.....21
- Figura 5.:** Foto ampliada de uma fêmea ingurgitada, *Lutzomyia longipalpis*.....24
- Figura 6.:** Ilustração da relação entre resposta Th1 e Th2, com adaptações.....33
- Figura 7.:** Fotos dos sinais clínicos da Leishmaniose Visceral Canina, com adaptações. (A) Lesões ulceradas na pele, (B) atrofia muscular do crânio, (C) emagrecimento acentuado, (D) alopecia nas orelhas e ao redor dos olhos, (E) onicogrifose, (F) lesões ulceradas e descamações em pontas de orelha, (G) hiperqueratose no focinho e lesões ulceradas perioculares, (H) icterícia acentuada.....34
- Figura 8.:** Diagrama de protocolo diagnóstico para LVC, com adaptações.....39
- Figura 9.:** Reagentes do teste de imunofluorescência indireta - RIFI, kit Bio-Manguinhos.....42
- Figura 10.:** Resultado de teste de PCR em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata (foto), com adaptações. (PM) marcador em escada de 100pb, (a)

controle positivo para LVC, (b-q) amostra de soro canino para investigação, (No)  
controle negativo.....44

**Figura 11.:** Citopatologia de baço com carga parasitária acentuada (++++).  
Macrófago com citoplasma vacuolizado (seta larga), forma amastigota contendo  
cinetoplasto perpendicular ao seu núcleo (setas finas). (Panótico rápido, 1000X)  
.....51

**Figura 12.:** Citopatologia de medula óssea com carga parasitária discreta (++)  
Megacariócito (seta larga), formas amastigotas no interior de macrófago (setas  
finas). (Panótico rápido, 1000X).....51

**Figura 13.:** Histopatologia de linfonodo, carga parasitária discreta (++)  
Macrófagos parasitados (setas largas), formas amastigotas no interior de  
macrófago (setas finas). (HE, 1000X) .....52

**Figura 14.:** Imuno-histoquímica de linfonodo de animal controle-positivo.  
Macrófagos contendo inúmeras formas amastigotas imuno-marcadas (setas).  
(DAB, 400X).....52

**Figura 15.:** Imuno-histoquímica de linfonodo, carga parasitária moderada (+++).  
Macrófagos contendo inúmeras formas amastigotas imuno-marcadas (setas).  
(DAB, 1000X).....53

**Figura 16.:** Imuno-histoquímica de baço, carga parasitária mínima (+).  
Macrófagos contendo poucas formas amastigotas imuno-marcadas (setas).  
(DAB, 1000X).....53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.:</b> Métodos de diagnóstico prévio para LVC.....	47
<b>Tabela 2.:</b> Classificação sintomatológica.....	47
<b>Tabela 3.:</b> Avaliação semi-quantitativa da carga parasitária.....	49
<b>Tabela 4.:</b> Número de animais positivos por técnica utilizada e tecidos analisados.....	50

## RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença heteroxênica, de caráter zoonótico com distribuição mundial. O principal vetor nas Américas é a fêmea de um artrópode, díptero, *Lutzomyia longipalpis*. O agente etiológico é a *Leishmania chagasi* (sinônimo *L. infantum*), parasita intracelular obrigatório do sistema fagocítico-mononuclear que afeta qualquer tecido ou víscera dos mamíferos levando a um quadro de emagrecimento progressivo, fraqueza, anorexia, úlceras mucocutâneas, conjuntivites, onicogrifose, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia generalizada, insuficiência renal e óbito. A fisiopatogenia está ligada à resposta imunológica deficiente contra o agente. Animais resistentes conseguem eliminar o parasita ou albergá-lo sem apresentar sinais. Em contrapartida, animais susceptíveis apresentam deficiência em controlar o agente, contribuindo para sua multiplicação no interior de macrófagos e sinais clínicos mais severos. O diagnóstico da LVC pode ser feito pelos métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Entretanto, os testes sorológicos, que são mais frequentemente empregados na rotina, podem apresentar resultados falso-positivos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as técnicas de citopatologia, histopatologia e imuno-histoquímica, como métodos diagnósticos complementares aos testes sorológicos, no diagnóstico da LVC. Neste estudo foram utilizados 10 cães naturalmente infectados com diagnóstico soropositivo para LVC em testes sorológicos e citopatológicos. Amostras de linfonodos, baços e medulas ósseas foram processadas e detectaram-se formas amastigotas em 100% dos animais analisados. As três técnicas demonstraram alta especificidade, porém a técnica de imuno-histoquímica possui maior sensibilidade. A citopatologia é de baixo custo, de fácil aplicação, pouco invasiva e de rápida execução, sendo recomendada como método de triagem para formas amastigotas, enquanto que as outras duas podem ser usadas como exame confirmatório.

## ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a heteroxenic zoonotic disease with worldwide distribution. The main vector in the Americas is the female of an arthropod, Diptera, *Lutzomyia longipalpis*. The etiologic agent is *Leishmania chagasi* (synonymous *L. infantum*), obligate intracellular parasite of mononuclear phagocyte system affecting any tissue or viscera of mammals leading to a framework of progressive weight loss, weakness, anorexia, mucocutaneous ulcers, conjunctivitis, onychogryphosis, hepatosplenomegaly, generalized lymphadenomegaly, renal failure and death. The pathogenesis is linked to deficiency in the immune response against the agent. Resistant animals can eliminate the parasite or host it without showing signs. However, susceptible animals are deficient in controlling the agent, which results in the parasite multiplication in macrophages and more severe clinical signs. The diagnosis of CVL can be done by parasitological, serological and molecular methods. However, the serological tests, more frequently used, may have false-positive results. Therefore, the goal of this study was to evaluate cytopathology, histopathology and immunohistochemistry as auxiliary diagnostic methods, in ensemble to the serological tests, in the diagnosis of CVL. Ten naturally infected CVL dogs, diagnosed with serological tests, were used in this study. Samples from lymph nodes, spleen and bone marrow were processed and amastigotes were detected. A 100% of tested dogs were positive to CVL. All three techniques have shown high specificity, but immunohistochemistry was more sensitive. The cytopathology is cheap, easy to apply and is ready in few minutes and is recommended as a screening method, while the other two can be used as a confirmatory test.

## 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença, de caráter zoonótico, considerada a forma mais devastadora entre os três tipos de manifestação clínica. Possui distribuição mundial, estando presente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, ocorrendo cerca de 500 mil novos casos por ano (SHARMA & SINGH, 2008). O agente etiológico é a *Leishmania chagasi* [sinônimo *Leishmania infantum*] (MAURICIO et al, 2000), um protozoário parasita intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear que agride o tecido por ação direta ou por formar complexo imuno-antigênicos com imunoglobulinas que se depositam em paredes de vasos levando a destruição tecidual (TITUS et al, 1994; URQUHART et al, 1996). Em geral, as *Leishmanias* infectam mamíferos, mas outros vertebrados são susceptíveis. Os cães domésticos são reservatórios urbanos, enquanto que carnívoros silvestres e roedores são reservatórios silvestres (GAVGANI et al, 2002; SHARMA & SINGH, 2008).

No Novo Mundo, tem como principal vetor o díptero *Lutzomyia longipalpis*, já no Velho Mundo é o *Phlebotomus* spp.. Estes transmitem a forma promastigota durante o repasto sanguíneo, que são fagocitadas, assumem as formas amastigotas e se reproduzem no interior de macrófagos (ELNAIEM & OSMAN, 1998; DESJEUX, 1996; KISHORE et al., 2006).

O diagnóstico de LVC pode ser presuntivo quando feito apenas observando as lesões na clínica ou durante exame necroscópico (MARCONDES et al, 2003; FEITOSA et al, 2006). Exames laboratoriais complementares auxiliam na confirmação.

O exame parasitológico, observando diretamente o parasita, utilizando citopatologia, histopatologia ou imuno-histoquímica são técnicas que permitem a confirmação, mas possui sensibilidade menor que a técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) onde se verifica da presença de DNA específico do parasita no tecido avaliado. Exames sorológicos também são ferramentas que auxiliam no diagnóstico (MARCONDES et al, 2003; BRASIL, 2006).

Este trabalho tem por finalidade revisar a literatura sobre LVC e avaliar e comparar as técnicas diagnósticas de citopatologia, histopatologia e imuno-histoquímica para LVC em cães naturalmente infectados do Distrito Federal.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Etiologia

O agente etiológico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) no Novo e no Velho Mundo é a *Leishmania chagasi* [sinônimo *Leishmania infantum*] que faz parte do complexo *Leishmania donovani* (MAURICIO et al, 2000). Pertence ao reino Protista, filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida (STUART & FEAGIN, 1992) e família Trypanosomatidae (SINGH et al, 2005). Os seres do filo Euglenozoa são caracterizados pela presença de um cistótomo suportado por um dos 3 microtúbulos originários das bases flagelares, e o que distingue dos outros grupos é a haste paraxial em cada flagelo com estruturas tubulares e de treliça (LAINSON & SHAW, 1987). Pertence à ordem Kinetoplastida por conter uma estrutura granular contendo DNA, o kDNA, no interior da sua única mitocôndria associada às bases flagelares, denominado cinetoplasto (STUART & FEAGIN, 1992). Os membros da família Trypanosomatidae possuem cistótomo reduzido ou ausente, e se alimentam por absorção. Ao todo são nove gêneros dentro desta família, compreendendo: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Phytomonas*, *Wallaceina*, *Trypanosoma* e *Leishmania*, sendo todos parasitas com ciclo de vida complexo envolvendo mais de um hospedeiro (SINGH, 2006).

As espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* são os agentes da forma cutânea da Leishmaniose, que consiste na formação de centenas de úlceras na pele exposta. A forma mucocutânea é causada pelas espécies *L. (viannia) braziliensis* e *L. (viannia) guyanensis*, onde o paciente sofre extensa destruição de membranas mucosas do nariz, boca e garganta (SHARMA & SINGH, 2008).

As *Leishmanias* são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. Sua forma infectante encontrada no trato digestivo do vetor é a promastigota, forma flagelada e alongada, enquanto que a forma presente no interior das células fagocitárias dos hospedeiros vertebrados é a amastigota, não flagelada e arredondada (TITUS et al, 1994). A forma promastigota possui seis fases de desenvolvimento dentro do vetor, sendo a

última, a chamada metacíclica (forma infectante), onde o protozoário se torna capacitado a infectar o hospedeiro, porém nesta fase se torna incapaz de se multiplicar no vetor. As promastigotas são pequenas e delgadas, com flagelo longo, maior que seu comprimento corporal, medindo ao todo cerca de 8 micrômetros de comprimento e 1,5 micrômetros de largura. No vetor, são encontradas nadando livremente na faringe, nas porções do intestino médio e do anterior, e no lúmen do cárdia (BATES & ROGERS, 2004).

A forma amastigota é encontrada no interior das células fagocitárias dos hospedeiros vertebrados (CHAPPUIS et al, 2007), com 3 a 5 micrômetros de comprimento (ROSS, 1993), ovoides, não móveis, com flagelo não funcional, reduzido a uma membrana interna chamada bolsa flagelar, com cinetoplasto em forma de haste perpendicular e adjacente ao núcleo oval e central. A bolsa flagelar serve como sítio de endocitose e exocitose (WEBSTER & RUSSEL, 1993; GINN et al, 2006). Possui organelas como Complexo de Golgi, retículos endoplasmáticos liso e rugoso, lisossomo e uma organela única de cinetoplastídeos, o glicossomo (OPPERDOES, 1991).

## **2.2. Epidemiologia**

### **2.2.1. Distribuição**

A Leishmaniose visceral é uma doença crônica, fatal e sistêmica que ocorre em países de clima tropical, com distribuição mundial, e tende a se alastrar para áreas circunvizinhas pela transmissão vetorial, aumentando a abrangência territorial das regiões endêmicas (SILVA, et al, 2012). As localidades endêmicas de LVC no Velho Mundo são os países do Mediterrâneo, norte e sudeste da África, norte e sul do Oriente Médio, China, Índia, Cazaquistão, Bangladesh, Nepal, Paquistão, maioria dos países da América Latina, sendo o Brasil com maior área afetada (figura 1) (CHAPPUIS et al, 2007).

Segundo dados de 2008, foram relatados um total de 88 países com Leishmaniose Visceral (LV) em humanos, sendo 22 países do Novo Mundo e 66 do Velho Mundo, com estimativa de 500 mil novos casos por ano, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde uma das seis principais



doenças na lista de pesquisa de doenças tropicais. Os locais com maior número de novos casos de LV anuais são Índia, Bangladesh, sul do Nepal e Nordeste brasileiro (SHARMA & SINGH, 2008).



Figura 1. Áreas endêmicas de LVC no mundo, com adaptações. Fonte: CHAPPUIS et al, 2007

Novos estudos mostraram que cerca de 90% da costa leste do continente norte americano também é endêmico, bem como áreas próximas seguindo para o interior dos Estados Unidos e Canadá (PETERSEN & BARR, 2009).

De acordo com a figura 1, há endemia de LVC em todas as regiões do Brasil (CHAPPUIS, et al, 2007). A figura 2 ilustra estudo, no período de 1985 a 2002, da distribuição de LV em humanos pelo ministério da saúde com uma distribuição diferente, não abrangendo os estados de Rondônia, Paraná e Santa Catarina como ocorre na figura 1. LV em humanos foi notificada em 19 estados do Brasil, sendo que 90% dos casos ocorrem na região Nordeste (BRASIL, 2006).

A epidemiologia da LV é complexa, dependente de variáveis socioeconômicas, climáticas, geográficas. Áreas endêmicas com casos confirmados em humanos ocorrem geralmente em comunidades pobres, menos desenvolvidas (CHAPPUIS ET AL, 2007). Diferente dos humanos, os cães são mais susceptíveis a LV, pois em áreas endêmicas e de elevado nível sócio-econômico e desenvolvimento urbano, são os que mais sofrem com a doença, como a exemplo da situação do bairro nobre, Lago Norte, pertencente à capital

federal do Brasil (DISTRITO FEDERAL, 2009). No período de 2005 a 2011 ocorreram 13 casos autóctones de LV em humanos no Distrito Federal (BRASIL, 2009; BRASIL, 2011).

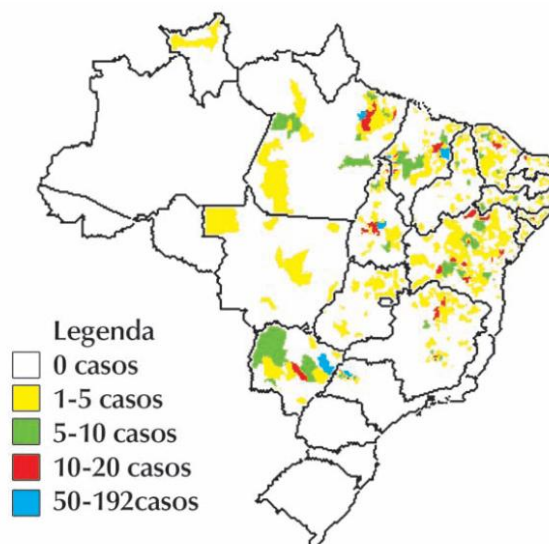


Figura 2 – Casos autóctones de LV no Brasil. Fonte: BRASIL, 2006.

### 2.2.2. Fatores de risco

O primeiro fator de risco a ser citado é a exposição ao vetor. A ampla distribuição do flebotomíneo nas Américas, e sua capacidade adaptativa às áreas urbanas e periurbanas, influenciam na possibilidade de animais sadios e infectados a sofrerem repasto sanguíneo e assim haver a manutenção do ciclo epidemiológico (REBÊLO et al, 1999).

O vetor *Lutzomyia longipalpis* possui sazonalidade, aumenta sua densidade populacional em períodos mais quentes e úmidos, o que acarreta em maior número de casos autóctones em áreas endêmicas nesses períodos (SAVANI, 2004).

Cães com parasitismo dérmico, sintomáticos ou assintomáticos para LVC, em contato com humanos são considerados fator de risco importante para infecção em humanos, podendo também ser fonte de infecção para outros animais (COSTA & VIEIRA, 2001).

Humanos que vivem na periferia das grandes cidades possuem maior chance de se tornarem soropositivos para Leishmaniose, devido ao contato mais próximo com áreas de mata que são focos naturais do vetor. Geralmente, as periferias urbanas possuem condições sanitárias precárias, prováveis locais de multiplicação do vetor, e maior contato com animais silvestres e sinantrópicos, possíveis reservatórios de *Leishmania* (WIJEYRATNE, 1994).

Durante as épocas mais quentes e úmidas do ano, o aumento da densidade dos vetores flebotomíneos aumenta o risco de infecção dos vertebrados susceptíveis (SHARMA & SINGH, 2008). A criação de outros animais domésticos como cavalos e galinhas, contribui no aumento de fonte alimentar para os flebotomíneos, o que contribui para maior densidade do vetor (WIJEYRATNE, 1994).

### **2.2.3. Reservatórios**

Em áreas urbanas, periurbanas e rurais, os cães domésticos são considerados os principais reservatórios de LV para humanos (GAVGANI et al, 2002), devido à alta susceptibilidade da espécie e ao elevado parasitismo que ocorre na pele, além da relação íntima com humanos (ASHFORD, 1996). Humanos infectados também são relatados como reservatórios (GAVGANI et al, 2002). Estudos recentes indicam que gatos possam albergar o protozoário, e serem potenciais mantenedores de Leishmaniose em áreas endêmicas, descritos como outro reservatório doméstico (MAROLI et al, 2007).

Aves domésticas da espécie *Gallus gallus* são discutidas como possíveis reservatórios (ALEXANDER et al, 2002). Porém, há diversos fatores que impedem o estabelecimento da infecção nessas aves (ZILBERSTEIN & SHAPIRA, 1994), e por um motivo não esclarecido, após a ingestão de sangue pelos flebotomíneos durante o repasto nas aves, a *Leishmania* seria eliminada (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006).

Os reservatórios silvestres são importantes mantenedores da Leishmaniose em áreas rurais e periurbanas. São descritos como reservatórios silvestres diversas espécies, tais como os carnívoros Cachorro-do-Mato (*Cerdocyon thous*) no Brasil e Venezuela (DEANE, 1956), a Raposa-do-Campo

(*Lycalopex vetulus*) no Brasil (CORREDOR et al, 1989), e a Raposa Vermelha (*Vulpes vulpes*) na Itália (DIPINETO et al, 2007); os marsupiais *Didelphis albiventris* encontrados no Brasil (SHERLOCK et al, 1984), e *D. marsupialis* na Colômbia (CORREDOR et al, 1989) e Venezuela (ZULUETA et al, 1999); roedores como o rato doméstico (*Rattus rattus*), descrito como reservatório na Venezuela (ZULUETA et al, 1999), e o rato silvestre (*Proechimys canicollis*) na Colômbia (CORREDOR et al, 1989).

Os flebotomíneos fazem repasto em diversas espécies de vertebrados como aves, lagartos, ruminantes, felídeos, canídeos e diversos roedores (SHARMA & SINGH, 2008), sendo muitas dessas espécies potencialmente capazes de serem reservatórios.

#### 2.2.4. Ciclo de vida

A *Leishmania* possui um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, precisa se desenvolver tanto no vetor como no hospedeiro definitivo (SCHLEIN, 1993), como ilustrado na figura 3. Quando o vetor não infectado faz o repasto sanguíneo, penetrando a pele do vertebrado reservatório com partes afiadas presentes no aparelho bucal, suga a pequena poça de sangue formada no local, ingere a forma amastigota presente nos macrófagos do tecido ou em monócitos provenientes da corrente sanguínea que se instalam no trato digestivo do vetor (SHARMA & SINGH, 2008), particularmente no intestino médio, onde é secretada uma rede de quitina embebida em uma matriz de proteínas e carboidratos (WALTERS et al, 1989).

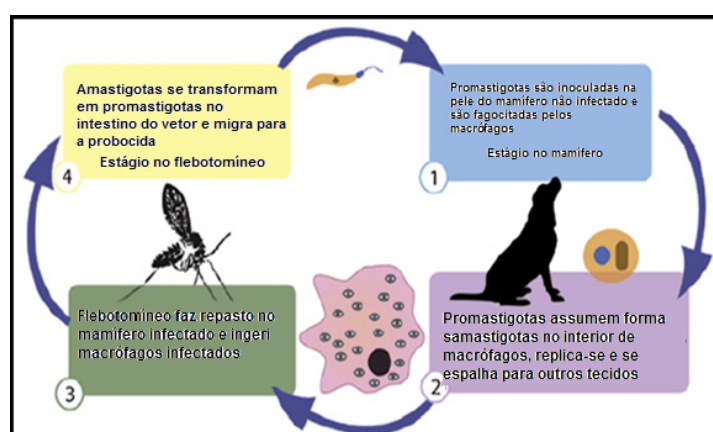


Figura 3 – Ciclo de vida da *Leishmania*, com adaptações. Fonte: PETERSEN & BARR, 2009.

Logo que o sangue é ingerido, a forma amastigota assume a forma promastigota procíclica (WALTERS et al, 1993), responsável pelo primeiro aumento da população de *Leishmania* no vetor (GOSSAGE et al, 2003). Além da forma promastigota procíclica, as *Leishmanias* mudam para outras diferentes formas, como ilustrada na figura 4. Antes do sangue ser todo digerido no intestino, as formas procíclicas assumem, progressivamente, formas nectomônadas com morfologia mais longa e delgada (SACKS & KAMHAWI, 2001; WALTERS et al, 1989). Essas formas migram para o intestino médio torácico e para a válvula do cárdia, e continuam se desenvolvendo em duas linhagens. Uma linhagem de desenvolvimento dará origem a haptomônadas, formas mais curtas e amplas, que precedem as formas paramastigotas compactas, e a outra linhagem dará a forma virulenta, a promastigota metacíclica (WALTERS et al, 1989).

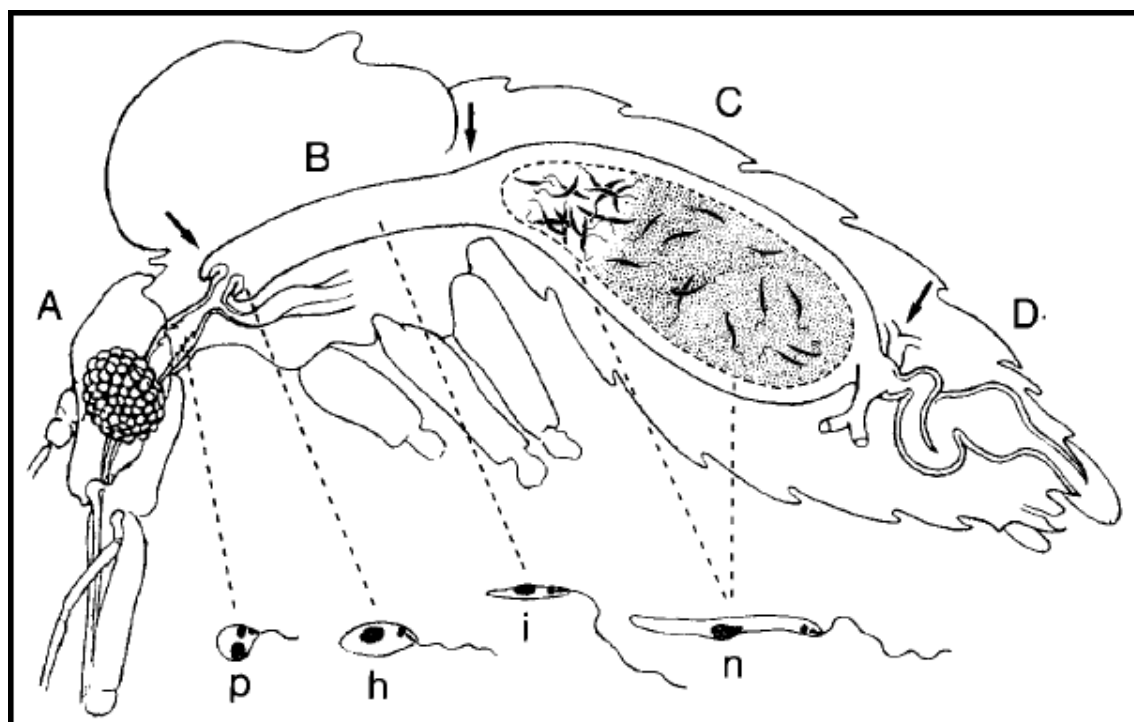


Figura 4 – Diferentes formas de *Leishmania* spp. no interior do vetor, com adaptações. (A) intestino anterior, (B) intestino médio torácico, (C) intestino médio abdominal, (D) intestino posterior, (p) paramastigota, (h) haptomônada, (i) promastigota infectante, (n) nectomônadas. Fonte: SCHLEIN, 1993

O flebotomíneo contaminado, ao refazer o repasto em um hospedeiro susceptível, regurgita a forma promastigota metacíclica (infectante) pelo

aparelho bucal que alcança o tecido e o leito capilar, infectando o indivíduo (BATES, 1994; BATES & ROGERS, 2004, WALTERS et al, 1993). A saliva do vetor é importante no estabelecimento da infecção, pois contem componentes imunossupressores (RIBEIRO et al, 1989) que promovem, redução da produção de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), redução da apresentação de antígeno pelo macrófago (HALL & TITUS, 1995; TITUS & RIBEIRO, 1990; THEODOS & TITUS, 1993), indução da produção de interleucina 4 (IL-4) por linfócitos (LIMA & TITUS, 1996), inibição da instalação da resposta Th1 (MBOW et al.,1998) e redução na expressão de moléculas co-estimulatórias das células apresentadoras de antígeno (APCs) (THEODOS & TITUS, 1993). O protozoário se depara com sistema imune inato e resiste à lise mediada pelo sistema complemento (FRANKE et al, 1985), porém é opsonizado pelas proteínas C3 derivadas desse sistema. A opsonização favorece então a fagocitose pela ligação com receptores de membrana (MOSSER et al, 1987). As promastigotas são fagocitadas por neutrófilos (LAUFS et al, 2002), células dendríticas (KIMA, 2007), e por macrófagos, podendo se tornar a forma amastigota nesses três tipos celulares, mas só consegue se replicar no interior dos macrófagos (CHANG, 1978).

Ao ser fagocitada pelo fagócito do hospedeiro, a promastigota metacilica é levada para o fagossomo, um vacúolo formado pela invaginação da membrana plasmática. Posteriormente, o vacúolo é fusionado com endossomos e lisossomos, tornando-se um vacúolo parasitóforo (VP) (RITTIG & BOGDAN, 2000). Dentro do VP, a forma promastigota do protozoário assume a forma amastigota, adaptada para suportar o ambiente ácido e proteolítico e se multiplicar por divisão binária (SHARMA & SINGH, 2008). O mecanismo de infecção de outros macrófagos e a disseminação para os diversos órgãos não estão bem definidos. Acredita-se que os macrófagos infectados são fagocitados por outros não infectados (CHANG, 1978), ou que são liberados VPs por exocitose, e outros macrófagos os fagocitam (RITTIG et al, 1998; RITTIG & BOGDAN, 2000). A hipótese mais aceita nos dias de hoje é a de que a multiplicação das amastigotas na célula hospedeira ocorre até que a membrana celular sofra lise e os protozoários sejam liberados e fagocitados por outros macrófagos (MOSSER & BRITTINGHAM, 1997). O ciclo se repete durante

vários meses, levando a um curso crônico, e a doença se difunde para áreas mucocutâneas e vísceras.

### **2.2.5. Resistência do agente**

Os protozoários da Leishmaniose possuem elevada capacidade adaptativa frente às condições adversas suportadas nos diferentes ambientes, temperatura, mudança de pH e resposta imune do hospedeiro, podendo ser explicada pela habilidade de modular sua expressão gênica. Provavelmente essa modulação ocorre pela amplificação de um gene específico ou por múltiplas repetições tandem, ou seja, repetições seguidas de um padrão de dois ou mais nucleotídeos. Suporta a ampla variação térmica na passagem do hospedeiro para o trato gastrointestinal do vetor. Sobrevive ao pH ácido do estômago do flebotomíneo, e do fagolisossomo dos macrófagos. Escapa dos derivados de oxigênio e ao ataque imunológico do sistema complemento, de anticorpos e de linfócitos T (SINGH & SIVAKUMAR, 2005). O sistema complemento é a primeira linha de ataque do hospedeiro contra o protozoário, porém entre as formas assumidas pela *Leishmania*, a promastigota metacíclica é a mais resistente ao sistema complemento (FRANKE et al, 1985).

### **2.2.6. Vetores**

Os flebotomíneos são artrópodes dípteros, da família Psychodidae (YOUNG & DUNCAN, 1994). Foram descritas 470 espécies conhecidas de flebotomíneos nas Américas (GALATI, 2003), e aproximadamente 10% são, ou supostamente são, vetores de Leishmaniose no Novo Mundo (LAISON & SHAW, 2005). Os vetores da LVC encontrados no Novo Mundo pertencem ao gênero *Lutzomyia*, amplamente distribuídos na América Latina, desde a Argentina até o México (SINGH, 2006, YOUNG & DUNCAN, 1994), e seu habitat é, em geral, em florestas (SHARMA & SINGH, 2008). Já no Velho Mundo são os do gênero *Phlebotomus* (SINGH, 2006), e vivem em ecossistemas desérticos ou semiáridos (SHARMA & SINGH, 2008).

Os flebotomíneos são pequenos, com 2 a 3 milímetros de comprimento e corpo recoberto por pêlos. São encontrados em locais de alta temperatura e umidade onde há restos orgânicos como fezes, folhas caídas, fendas em árvores ou em paredes, cupinzeiros, locais onde haja microclima favorável para fêmea ovopor 15 a 80 pequenos ovos, que irão eclodir e as larvas se alimentarem da matéria orgânica para se desenvolverem.

A fêmea, como ilustrada na figura 5, precisa de sangue como fonte proteica para o desenvolvimento dos ovos, deste modo, apenas esta faz o repasto. Os flebótomos são mais ativos no alvorecer e no crepúsculo. Possuem hábito de voar poucas distâncias a cada vôo, não podendo voar na ausência de correntes de ar. A densidade populacional do vetor aumenta sazonalmente, em épocas de clima úmido e quente, diminuindo em clima seco e frio (SHARMA & SINGH, 2008).



Figura 5 – Foto ampliada de uma fêmea ingurgitada, *Lutzomyia longipalpis*. Fonte: BRASIL, 2006.

O díptero *Lutzomyia longipalpis*, conhecido como mosquito palha, é o principal vetor da LVC no Brasil (GONTIJO & MELO, 2004). A distribuição desse vetor no país abrange todo território nacional, com exceção da região sul (AGUIAR & MEDEIROS, 2003). O crescente desmatamento pressiona a migração dos flebotomíneos a se adaptarem às condições das regiões urbanas



e periurbanas, deste modo, a Leishmaniose deixou de ser unicamente rural (BRASIL, 2006).

Nas Américas, outra espécie também foi descrita como vetor, a *Lutzomyia forattini* (MARCONDES, 2001; TRAVI et al, 2002). No Velho Mundo, são diversos vetores relatados, entre eles *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. argentipes* e *P. orientalis* (ELNAIEM & OSMAN, 1998; DESJEUX, 1996; KISHORE et al., 2006).

Nos Estados Unidos, outra espécie de flebotomíneo tem sido incriminada como potencial vetor, *Lutzomyia shannoni*, distribuído no sul e sudeste desse país. Contudo, não há estudos que comprovem viabilidade da *L. infantum* no interior desses vetores após o repasto (DUPREY et al, 2006).

Outro vetor pode ser mencionado como possível agente transmissor de *Leishmania*, o ectoparasita *Rhipicepalus sanguineus*. Apesar de não serem encontradas formas promastigotas em esfregaços sanguíneos desses ectoparasitas (Coutinho et al, 2005), o kDNA, pertencente às *Leishmanias*, pode ser encontrado pelo exame de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) das glândulas salivares desses carrapatos (DANTAS-TORRES et al, 2010). Estudos comparativos usando carga de kDNA em ambos vetores, mostram que há maior carga parasitária nesses ectoparasitas do que nos flebotomíneos (PAIVA et al, 2006), mas não confirma a competência vetorial do *Rhipicepalus* em inocular o protozoário no hospedeiro pela picada (DANTAS-TORRES et al, 2010).

### **2.2.7. Transmissão**

A principal transmissão ocorre quando o animal vertebrado é picado pela fêmea do vetor flebotomíneo contaminado com o parasita (KALRA & BANG, 1988), a forma promastigota é então inoculada na pele do hospedeiro, fagocitada por células de defesa, e no interior destas perde o flagelo assumindo a forma amastigota (SANTOS-GOMES et al, 2000). Um vetor infectado pode transmitir o parasita de um cão soropositivo para outros cães, podendo isso ocorrer com humanos, e ainda picar um humano infectado e transmitir o agente para outro humano não infectado (SHARMA & SINGH, 2008). Na Índia,

comumente se observa a transmissão vetorial de humanos para humanos pela picada do flebotomíneo (SINGH, 2006).

A transmissão pelo *Rhipicepalus sanguineus* é mecânica, podendo ocorrer pela ingestão acidental do parasita quando o animal faz a remoção com os dentes. Esses vetores possuem facilidade para trocar de hospedeiro, deste modo, cães saudáveis poderiam se tornar infectados pela ingestão de carrapatos contaminados com sangue de outro hospedeiro positivo para Leishmaniose (COUTINHO et al, 2005). Também foram feitos estudos semelhantes com o ectoparasita *Ctenocephalides felis*, com resultado positivo para infecção em hamsters com inoculação oral de um macerado preparado com esses vetores (COUTINHO & LINARDI, 2007).

A transfusão sanguínea é potencialmente infectante, e foi relatada em cães na América do Norte (OWENS et al, 2001). Cães que receberem sangue contaminado podem desenvolver a forma clínica, ou apenas serem reservatórios assintomáticos com desenvolvimento de protozoários na pele, permitindo a disseminação da LVC pelo repasto dos flebotomíneos (FREITAS et al, 2005).

Estudos mostram que a LVC pode ser transmitida sexualmente entre hospedeiros vertebrados (de cão para cão). Ocorre quando o macho infectado copula com a fêmea não infectada. A *Leishmania* possui tropismo pelo aparelho sexual do macho, em especial o epidídimo, o prepúcio e a glândula. As formas amastigotas são eliminadas pelo sêmen e o ato traumático da copula favorece o processo de infecção (SILVA et al, 2009).

Outro tipo de transmissão é a transplacentária. Apesar de haver autores que digam que não ocorra (ANDRADE et al, 2002), pesquisas mostram que em áreas com ausência de vetor competente, cães filhotes, sejam eles recém nascidos, ou de poucos dias ou semanas, provenientes de cadelas positivas para LVC, são também positivos, comprovando a transmissão vertical (BOGGIATO et al, 2011; MASUCC, et al, 2003). A transmissão vertical tem sido descrita nos Estados Unidos, porém não se sabe se este é o principal mecanismo de transmissão da Leishmaniose em cães no país (PETERSEN & BARR, 2009).

#### **2.2.8. Susceptibilidade**

Qualquer animal vertebrado, seja hígido ou não, é susceptível de se tornar infectado após a picada do flebotómíneo (SHARMA & SINGH, 2008). Não há predileção por raça ou sexo (BRASIL, 2006). Animais mais jovens são mais susceptíveis (SILVA et al, 2005).

Animais propensos a desenvolver a doença clínica são os que desenvolvem resposta imunológica com elevado nível de interleucina-4 (IL-4) e imunoglobulina E (IgE), baixos níveis de interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), com pouca ativação de macrófagos por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (LIEW, 1989).

O polimorfismo do complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC II) em cães está associado com susceptibilidade no desenvolvimento de LVC. O alelo DLA-DRB1\*01502 do MHC II, foi encontrado em cães com elevado nível de imunoglobulina-G que está relacionada com susceptibilidade, este não seria eficaz na ativação da resposta imune (QUINNEL et al, 2003). Em camundongos, genes de MHC estão relacionados com controle da susceptibilidade na infecção por *L. infantum* e *L. donovani* (BLACKWELL et al, 1980; LECLERCQ et al, 1996).

### **2.2.9. Período de incubação**

Nos cães, o tempo entre a picada do vetor e o aparecimento dos sinais clínicos da doença, varia de três meses a vários anos (LANOTTE et al, 1981; BRASIL, 2006), com média de 3 a 7 meses (BRASIL, 2006) . Nos humanos, esse período varia de 10 dias a 24 meses, com média de 2 a 6 meses (BRASIL, 2006).

### **2.3. Fisiopatogenia**

A fisiopatogenia da LVC em mamíferos esta intimamente relacionada com a resposta imune individual, podendo ser esta eficaz ou ineficaz. Tem sido descritos inúmeros estudos relacionados à resposta imune contra Leishmaniose em camundongos (FONSECA et al, 2003; BACELLAR & CARVALHO, 2005), havendo estudos em cães.

Animais com LVC desenvolvem uma doença branda ou severa, sendo classificados como oligossintomáticos ou polissintomáticos respectivamente, e outros desenvolvem uma doença limitada de auto-cura com sinais subclínicos ou podem não apresentar nenhum sinal, os chamados assintomáticos (MANCIANTI et al, 1988; MURRAY, 2005). Animais susceptíveis se tornam sintomáticos e apresentam um padrão de resposta celular com proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo II (Th2), enquanto que os resistentes são assintomáticos e apresentam uma proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo I (Th1) (ROMAO et al, 2007). Esses dois tipos celulares podem ser diferenciados pelas citocinas produzidas (MOSMANN et al, 1986). Deste modo, os animais resistentes apresentam hipersensibilidade tardia enquanto que os susceptíveis apresentam uma linfoproliferação excessiva (DESPLAZES et al , 1995), porém em alguns casos se nota a completa anergia pelo desgaste da resposta imune (FOLI et al, 1995).

### **2.3.1. Evasão ao sistema complemento**

O sistema complemento é composto por um grupo de proteínas no soro sanguíneo que interage com a superfície dos patógenos, e possui funções de marcar e identificar o patógeno como “estranho”, promover quimiotaxia para leucócitos e promover a lise por abertura de um poro com o complexo de ataque a membrana (MAC) na superfície do agente. Esse sistema pode ser ativado por três diferentes vias: via clássica, via alternativa e via lectina ligante de manose (MBL). A via clássica é ativada quando o complemento C1q se adere a anticorpos ligados na superfície do patógeno, a via alternativa é ativada quando o complemento C3 se adere espontaneamente na superfície do patógeno, e por fim, a via MBL é ativada quando a proteína ligante de manose (lectina) se adere a manose na superfície do patógeno (CAMPAGNE et al, 2007).

A *Leishmania* é capaz de ativar as três diferentes vias, mas alguns estudos propõem que a via clássica (DOMINGUEZ & TORANO, 1999) e a alternativa (PUENTES et al, 1988) são as principais ativadas.

A forma promastigota metacíclica é inoculada pelo vetor e atinge a corrente sanguínea, neste momento ocorre o contato com o sistema

complemento. Estudos mostram que o lipofosfoglicano (LPG) de superfície desses protozoários são bastante longos em comparação a de outras células susceptíveis a lise (MCCVONVILLE, 1992), desta forma, as proteínas do complemento se ligam ao LPG e a MAC é formada longe da membrana (PUENTES et al, 1990). Outro mecanismo proposto é que esta forma resistente do protozoário possui proteases (YAO et al, 2008) em sua superfície que clivam a proteína C3b do complemento em iC3b que não permite a formação da MAC (MOSSER et al, 1987). Quando o parasita é opsonizado por iC3b favorece o processo de fagocitose pelos macrófagos sem desencadear o processo de explosão oxidativa (MOSSER et al, 1987).

### **2.3.2. Interação com macrófagos**

Os mecanismos de evasão estão relacionados com a capacidade da *Leishmania* de reduzir ou inibir funções celulares. No interior dos macrófagos, o LPG da promastigota metacíclica perturba o funcionamento correto da fusão dos endossomos e lisossomos com o fagossomo, gerando um VP sem total acidificação (DESJARDINS & DESCOTEAUX, 1997). Esse evento permite que haja tempo para assumir a forma amastigota, mais resistente ao ambiente ácido e proteolítico (OLIVIER & TANNER, 1987). Além disso, o parasita inibe a produção de interleucina 12 (IL-12) que está envolvida na ativação de linfócitos T CD4+ Th1 (SACKS & SHER, 2002). Macrófagos infectados aumentam a expressão de interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ), ambos suprimem a resposta imune eficaz anti-*leishmania* (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998). Para ganhar tempo de se multiplicar no interior dos macrófagos, o parasita consegue atrasar a apoptose induzida via fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e fator estimulador de granulócito e macrófago (GM-CSF) (MOORE & MATLASHEWSKI, 1994).

### **2.3.3. Interação com neutrófilos**

A primeira linha celular de defesa recrutada são os neutrófilos, chegando durante as primeiras horas ao local de inoculação das promastigotas (MULLER

et al, 2001) com a função de fagocitar e eliminar patógenos, bem como recrutar outras células. Os neutrófilos são recrutados por interleucina 8 (IL-8), interleucina 17 (IL-17), complemento C3a, TNF, fator quimiotático secretado por promastigotas (VAN ZANDBERGEN, 2002). A *Leishmania* também perturba a funcionamento anti-microbial desse leucócito, deixando-o em um estado ativado reduzido, com baixa atividade lítica (GUEIRARD et al, 2008). Do mesmo modo como no macrófago, neutrófilos parasitados possuem atraso na apoptose (AGA et al, 2002), porém o parasita não se multiplica no interior desses leucócitos, apenas permanece albergado (CHANG, 1978).

#### **2.3.4. Resposta imune em animais resistentes**

Uma cascata de reações está relacionada com a defesa contra a *Leishmania*. Há uma interposição entre resposta imune adaptativa e inata, sendo que esta última tem se mostrado mais eficaz no controle da infecção. Na resposta imune inata, os neutrófilos chegam ao local de infecção primeiro, fagocitam as formas promastigotas e as eliminam por metabólitos obtidos por reações oxidativas, como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO) (MURRAY et al, 1983). Formas amastigotas também são sensíveis ao NO (OLIVEIRA et al, 1998). Os neutrófilos promovem quimiotaxia pela produção de interleucina 8 (IL-8) e proteína inflamatória macrofágica beta (MIP-1 $\beta$ ) que atraem mais neutrófilos e macrófagos para o local (SCAPINI et al, 2000).

Para haver produção de NO é necessário ativar a enzima nitrato sintetase (iNOS) presente em macrófagos e neutrófilos que ocorre na presença de IFN- $\gamma$  (MURRAY & NATHAN, 1999). Assim, o NO produzido pelas células de defesa eliminam o protozoário. Outra citocina importantes para o desenvolvimento do padrão Th1 é a interleucina 2 (IL-2), o GM-CSF, os fatores de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e beta (TNF- $\beta$ ) (MOSMANN et al, 1986). A produção de IL-2 pelas Th1 estimula seu próprio crescimento, o das NK, tornando essas últimas ativadas para eliminar patógenos, enquanto que o GM-CSF estimula a produção de macrófagos e neutrófilos.

Nas fases iniciais da infecção, as APCs como células dendríticas da pele, macrófagos e monócitos, produzem IL-12. A IL-12 é considerada a

principal citocina envolvida no controle da infecção em camundongos resistentes, sendo responsável pela ativação de células *Natural Killers* (NK), ativação e diferenciação de linfócitos Th1 para produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (TRINCHIERI & GEROSA, 1996). As NK ativadas por IL-12 constituem fonte primária de IFN- $\gamma$  (SCHARTON, T. M., SCOTT, 1993). Células Th1 reconhecem macrófagos infectados pela interação com complexo maior de imuno-compatibilidade tipo II (MHC II), uma molécula trans-membrana presente nas APCs (DAAR et al, 1984), e após o reconhecimento as Th1 produzem IFN- $\gamma$  (TRINCHIERI & GEROSA, 1996).

Foi realizado um estudo com uso de camundongos infectados com *Leishmania* spp. avaliando a interação entre TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , conhecidos como linfotoxinas, que estão presentes na superfície de macrófagos e linfócitos CD4+ Th1, respectivamente. O estudo demonstrou que a ligação formada entre esses fatores forma o complexo linfotoxina  $\alpha\beta$ 2, uma membrana protetora (membrana linfotoxina) que está relacionada com a integridade dos órgãos linfoides e com a resistência contra o protozoário (XU et al, 2007).

A presença de imunoglobulinas-G (IgG) no soro de animais com reposta padrão Th1 indica que a subclasse IgG2a está relacionada com infecções assintomáticas (DEPLAZES et al, 1995). Estes anticorpos são mais específicos e são produzidos em baixa quantidade no padrão Th1 (PINNELI et al, 1994).

### **2.3.5. Resposta imune em animais susceptíveis**

Diversos fatores estão relacionados com a sobrevivência da *Leishmania* no hospedeiro, que escapa à resposta imune inata e que leva ao estabelecimento de uma resposta humoral ineficaz que ocorre no padrão Th2, com formação de auto-anticorpos e complexos imuno-antigênicos que favorecem a destruição das vísceras e estabelecimento dos sinais clínicos (CARVALHO et al, 1983).

Como mencionado anteriormente, a saliva do vetor é responsável por favorecer primariamente a infecção de forma imunossupressora, prejudicando os fatores protetores contra o protozoário (RIBEIRO et al, 1989). Camundongos susceptíveis, possuem macrófagos que na presença de algumas espécies de

*Leishmania* (BARRAL-NETTO et al, 1992) produzem fator de diferenciação e crescimento beta (TGF- $\beta$ ), uma citocina que desativa o macrófago, inibe ação da IFN- $\gamma$ , reduz expressão de MHC II (DING et al, 1990), aumenta expressão de IL-10 (BARRAL-NETTO et al, 1993) e suprime produção de NO por macrófagos infectados (LI et al, 1999). A IL-10 é outra citocina que favorece o protozoário inibindo diversas citocinas produzidas pelos macrófagos (DE WAAL et al, 1991), diminui a expressão de MHC II e suprime a produção de IFN- $\gamma$  pelas células Th1 (BOGDAN et al, 1991). Camundongos resistentes e susceptíveis produzem a mesma quantidade de IL-10 na fase crônica da doença, contudo, os susceptíveis produzem uma quantidade muito maior durante a fase aguda (CHATELAIN et al, 1992).

As imunoglobulinas produzidas por linfócitos B no padrão Th2, são IgE e IgG1 devido ao estímulo por IL-4 (MOSMANN & COFFMAN, 1989), e estão relacionadas com o desenvolvimento da doença clínica (DEPLAZES et al, 1995). Neste caso, os anticorpos que se ligam aos antígenos de *Leishmania* são não protetores, podem opsonizar alguns protozoários que posteriormente serão fagocitados perpetuando o ciclo de multiplicação e disseminação ou formar complexos imuno-antigênicos que circulam pelo sangue em grande quantidade (GOTO & LINDOSO, 2004). Estes complexos se depositam na parede de vasos de diversas vísceras e tecidos favorecendo o desenvolvimento de vasculites, uveítes e artrites (SLAPPENDEL & FERRER, 1990; LOPEZ et al, 1996), lesões renais imunomediadas com culminação de insuficiência renal (POLI et al, 1991; SLAPPENDEL & FERRER, 1990).

### **2.3.6. Interação entre Th1 e Th2 na LVC**

A resposta imune celular e humoral em cães infectados por *Leishmania* não possui dois padrões definidos observados em animais assintomáticos e sintomáticos (STRAUSS AYALI et al, 2007). Observa-se uma interposição entre a resposta Th1 e Th2 (figura 6) em animais susceptíveis e resistentes, porém em cães assintomáticos a resposta Th1 é a que prevalece e o animal pode manter baixos nível de infecção mantida por baixos níveis de IL-10 produzidos neste padrão misto, logo o que determina a progressão ou a cura da doença é o



balanço entre estes tipos de resposta (BANETH et al, 2008). Da mesma forma, o aparecimento da doença clínica que está ligada ao padrão Th2 pode ser precedido de um período de doença assintomática seguido de ausência ou baixa resposta Th1 durante o período silencioso do estabelecimento do parasita (SANTOS-GOMES et al, 2002).

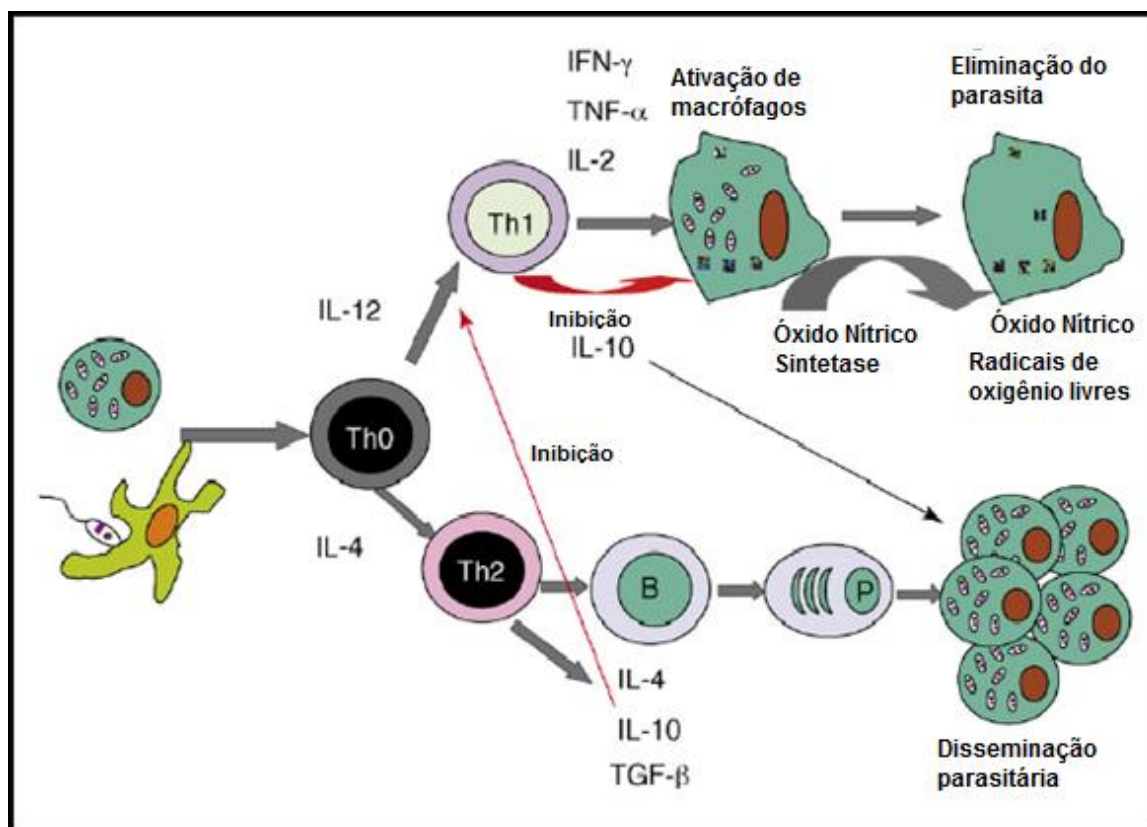


Figura 6 – Ilustração da relação entre resposta Th1 e Th2, com adaptações. Fonte: BANETH et al, 2008

## 2.4. Sinais Clínicos

O quadro clínico observado na LVC (figura 7) é variável e dependente da susceptibilidade/resistência do hospedeiro e da cepa transmitida. Nesse intuito, alguns cães se curam espontaneamente enquanto outros desenvolvem diversos sinais que evoluem até a morte (MICHALICK & GENARO, 2005).

Animais com LVC são classificados de acordo com o número de sinais clínicos presentes (MANCIANTI, et al, 1988). O autor considerou assintomático, quando animal não apresentava nenhum sinal sugestivo da doença; oligossintomático, quando apresentava no máximo três sinais clínicos somados

a moderada perda de peso, alopecia localizada, pêlos opacos, ou pelo menos um destes três sinais; e por fim, sintomático ou polissintomático, quando apresentava sinais clássicos da Leishmaniose tais como lesões cutâneas, pêlos opacos, severa perda de peso, apatia, ceratoconjutivite e outros (MANCIANTI et al, 1988).



Figura 7 – Fotos dos sinais clínicos da Leishmaniose Visceral Canina, com adaptações. (A) Lesões ulceradas na pele, (B) atrofia muscular do crânio, (C) emagrecimento acentuado, (D) alopecia nas orelhas e ao redor dos olhos, (E) onicogrifose, (F) lesões ulceradas e descamações em pontas de orelha, (G) hiperqueratose no focinho e lesões ulceradas perioculares, (H) icterícia acentuada. Fonte: BRASIL, 2011

No início da infecção há febre intermitente, perda de peso, linfadenopatia (LIMA et al, 2004). Alguns autores relatam que os principais sinais clínicos são hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, hipergamaglobulinemia, caquexia e anemia (CIARAMELLA, et al, 1997; FERRER, 1999; LIMA et al, 2004; BRITO et al, 2004). Na pele são observadas lesões nodulares não ulcerativas, escamação, dermatose ulcerativa (FONDEVILA et al, 1997), fissura nos coxins e alopecia generalizada, esta última pode ocorrer tanto pela ação direta do agente nos folículos pilosos quanto pela deposição de imunocomplexos na membrana basal (URQUHART et al, 1996).

Devido ao caráter viscerotrópico da doença, cães com LVC apresentam alterações nos diversos órgãos e tecidos. Os linfonodos apresentam linfadenomegalia generalizada (KRAUSPENHAR et al, 2007). O animal apresenta comprometimento da função renal secundário à lesões por deposição de imunocomplexos (LOPEZ et al, 1996) com progressão para insuficiência renal (CIARAMELLA et al, 1997). Quando há perda de 70% dos glomérulos renais

ocorre elevação sérica de ureia e creatinina avaliados em perfil bioquímico (NIETO et al, 1992). As lesões oculares podem ocorrer da mesma forma pela deposição de imunocomplexos, acarretando em ceratoconjutivites e uveítes (CIARAMELLA et al, 1997; FERRER, 1999; BRITO et al., 2004). Observam-se ulcerações e/ou erosões no trato gastrointestinal que levam a diarreias e melena (FERRER, 1999), além de vômitos e anorexia (POCAI et al, 1998). Ocorrem hemorragias por interferência na formação da malha de fibrina devido à hipergamaglobulinemia, pela trombocitopenia secundária a hipoplasia medular e sequestro de plaquetas pelo baço, sequestro de fatores coagulatórios devido vasculite por imunocomplexos e interferência na atividade plaquetária secundária a uremia (LUVIZOTTO, 2006). As unhas das mãos e dos pés apresentam crescimento anormal, caracterizando a onicogribose (REIS et al, 2006) que ocorre por uma perturbação na matriz ungueal devido a presença da *Leishmania* (URQUHART et al, 1996). As vasculites podem ocorrer em qualquer local do corpo, quando atingem o encéfalo o animal pode desenvolver diversos sinais neurológicos como letargia, convulsão, mioclonia, nistagmo, tremores, paralisias, ptose labial, andar em círculos, tetraparesia e outras (VIÑUELAS et al, 2001). O envolvimento do sistema músculo-esquelético é notável pela atrofia muscular e pelas lesões de osteólise e osteoproliferação (BURACO et al, 1997; SOUZA et al, 2005). Pode haver desenvolvimento de pneumonia intersticial secundário a vasculite (LUVIZOTTO, 2006).

Frequentemente, nos animais sintomáticos se observam alterações causadas por outros agentes, pois a imunossupressão e a debilitação dos indivíduos favorecem a infecções oportunistas por bactérias, fungos, parasitas e hemoparasitas (LUVIZOTTO, 2006).

O perfil bioquímico mostra aumento dos níveis séricos de gama-glutamilttransferase (GGT) e fostatase alcalina (ALP) devido colestase nos ductos biliares (VIDAL et al, 2009; KANEKO et al, 1997). Também se observa aumento sérico de aspartato aminotransferase (AST) por lesão direta dos hepatócitos (LOPES et al, 1996; KANEKO et al, 1997)

## **2.5. Patologia**

As lesões macroscópicas encontradas são semelhantes às citadas nos sinais clínicos, porém ao exame necroscópico podem ser observadas diretamente pela análise direta dos órgãos. Na microscopia óptica de luz se visualizam formas amastigotas de *Leishmania* em lâminas histopatológicas coradas com hematoxilina e eosina (HE). Essas formas são visualizadas no interior de vacúolos parasitóforos, medindo 3 a 5 micrômetros de comprimento (ROSS, 1993), basofílicas (KRAUSPENHAR et al., 2007), com cinetoplasto em haste ou perpendicular (WEBSTER & RUSSEL, 1993), albergadas no citoplasma de macrófagos inchados (CHAPPUIS et al, 2007). O infiltrado inflamatório característico encontrado nos diversos órgãos são linfócitos, plasmócitos, histiócitos contendo formas amastigotas ou não (KRAUSPENHAR et al., 2007; BARROS, 2011). Alterações microscópicas são encontradas tanto em animais sintomáticos quanto em assintomáticos (BARROS et al, 2011).

Ao exame externo, se observam na pele lesões descamativas, ulceradas, crostosas, pêlos opacos, alopecia local ou generalizada, sendo comumente observadas áreas alopécicas e ulceradas ao redor dos olhos (lesão em óculos), focinho, orelhas, dorso (FONDEVILA et al, 1997, SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997), rarefação de pêlos nas orelhas, focinho, pescoço, cauda e membros distais (VIADANNA et al, 2011). As lesões histopatológicas encontradas na pele variam de acordo com a lesão encontrada na macroscopia. A dermatite alopécica contem infiltrado de células Langerhans, discreto infiltrado de linfócitos T e acentuada quantidade de protozoários. Já em lesões nodulares na pele não se observam células apresentadoras de antígeno, mas há acentuada quantidade de macrófagos e de parasitas. Por fim, úlceras na pele mostraram uma inflamação intermediária (FONDEVILA et al, 1997). Com frequência o infiltrado é observado próximo a folículos pilosos e estruturas anexas da derme (BARROS, 2011). No exame externo também se observa onicogribose (REIS et al, 2006).

Pode ser observada coloração amarelada das mucosas e do subcutâneo que caracterizam icterícia (POCAI et al, 1998), bem como edema subcutâneo principalmente nos membros distais (GENARO, 1995). Os olhos geralmente apresentam blefarite, ceratoconjuntivite, ou apenas conjuntivite, uveíte, sinéquia, edema de córnea e outras alterações (CIARAMELLA et al, 1997; FERRER,

1999; BRITO et al, 2004; VIADANNA et al, 2011). Apresentam infiltrado inflamatório mononuclear no trato uveal (CIARAMELLA et al, 1997). Este infiltrado também é observado na conjuntiva bulbar, na córnea e áreas perivasculares (BARROS, 2011).

Ao exame interno, o fígado pode estar aumentado com bordos arredondados (hepatomegalia) e com evidenciação do padrão lobular (KRAUSPENHAR, et al., 2007), observando-se na microscopia uma reação inflamatória granulomatosa com acentuada quantidade de células Kupffer contendo amastigotas no citoplasma. São encontradas na cápsula, espaço porta, áreas periportais e áreas intralobulares (TAFFURI et al, 2001; BARROS, 2011).

O baço também pode apresentar-se aumentado (esplenomegalia) (KRAUSPENHAR et al, 2007) e desenvolve um quadro crônico, com macrófagos organizados em granulomas repletos de formas amastigotas e com distribuição difusa (XAVIER et al, 2006).

Os rins podem se tornarem insuficientes apresentando áreas de aderência da cápsula fibrosa em sua superfície visceral, áreas de depressão irregular na superfície, áreas de infarto e de hemorragia, alterações na coloração renal, congestão, isquemias no córtex e na medula, vários pontos esbranquiçados (nefrite intersticial) (ALBUQUERQUE et al, 2008; FERRARI et al, 2010). Observa-se glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial, ambos caracterizados por infiltração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (LOPEZ et al 1996; COSTA et al, 2000). Também são vistas glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite proliferativa degeneração hidrópica tubular, esclerose glomerular, cilindros hialinos intratubulares e mineralização tubular (BARROS, 2011).

Todos os linfonodos podem ficar aumentados de volume e tamanho (linfadenomegalia generalizada) (KRAUSPENHAR et al., 2007) e ao corte se notam lesões hipertróficas tanto na região cortical quanto na medular. Os linfonodos desenvolvem proliferação linfoplasmocitária e histiocitária (KRAUSPENHAR et al., 2007) com acentuada quantidade de macrófagos na região medular contendo amastigotas no citoplasma (LIMA et al, 2004) O infiltrado inflamatório é encontrado na cápsula, seios medulares e cordões

medulares. Essa proliferação caracteriza uma hiperplasia e hipertrofia de folículos linfóides, porém alguns animais apresentam atrofia desses folículos (BARROS, 2011).

. Em animais com LVC, a atrofia muscular é facilmente notada. Alterações ósseas como proliferação periosteal e óstelise também são vistas (BURACCO et al, 1997; SOUZA et al, 2005). A medula óssea apresenta uma hiperplasia, caracterizando uma hipertrofia e hiperplasia de células (TAFURI et al, 2001; KRAUSPENHAR et al., 2007).

## **2.6. Diagnóstico**

### **2.6.1. Clínico**

O diagnóstico clínico é baseado nos sinais clínicos citados na seção 2.4 desta revisão. Esse diagnóstico não tem sucesso quando na avaliação de animais assintomáticos. Já os sintomáticos, a clínica só garante uma suspeita, os sinais são inespecíficos, sendo necessárias outras ferramentas para confirmação. Neste sentido, o diagnóstico laboratorial parasitológico é a melhor opção, pois evita o embate entre diagnósticos diferenciais (FEITOSA et al, 2006).

### **2.6.2. Laboratorial**

O diagnóstico laboratorial da LVC pode ser determinado com exame necroscópico levando a uma suspeita da doença, ou por exames complementares sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI e imunoensaio enzimático - ELISA), parasitológicos (citopatologia, histopatologia e imuno-histoquímica) ou moleculares (reação de polimerase em cadeia – PCR) que confirmem a presença da *Leishmania* (MARCONDES et al, 2003; BRASIL, 2006). Após a suspeita clínica, a literatura propõe a adoção de procedimentos em etapas, como ilustrado na figura 8, a fim de determinar a positividade ou negatividade na investigação de animais com LVC (QUEIROZ et al, 2010;)

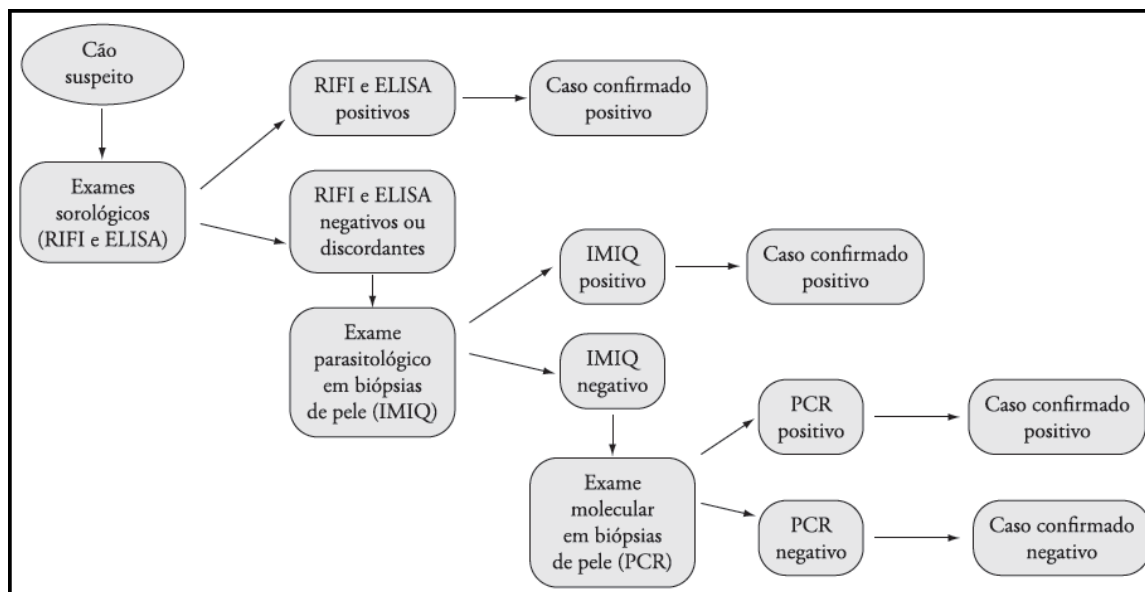


Figura 8 – Diagrama de protocolo diagnóstico para LVC, com adaptações. Fonte: QUEIROZ et al, 2010

### 2.6.2.1. *Post-mortem*

O exame de necropsia da carcaça animal possibilita o diagnóstico *post-mortem* avaliando-se os diversos conjuntos de órgãos, assim permitindo a análise direta de tecidos que não era possível observar *in vivo* (PEIXOTO & BARROS, 1998). A observação das lesões macroscópicas descritas na seção 2.5.1 desta revisão levam a uma maior suspeita de Leishmaniose durante o procedimento. Contudo, o procedimento não garante a confirmação de positividade do animal devido à inespecificidade das lesões havendo apenas uma suspeita (MARCONDES et al, 2003).

### 2.6.2.2. Citopatologia

O exame parasitológico pode ser feito com auxílio da técnica de citopatologia (BRASIL, 2006). Desta forma, utiliza-se um microscópio óptico para visualização direta do parasita. Existem diversos modos de coleta de material, tais como raspado profundo de pele ou por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de linfonodos, medula óssea ou baço, sendo o material obtido colocado em lâmina de vidro e espalhado o material sobre esta com outra lâmina, a fim de se obter uma camada celular fina, translúcida e homogênea (URBANO et al,

2005). Da mesma forma, o material para citopatologia pode ser coletado durante o procedimento de necrópsia, preparando esfregaços ou *imprinting* diretos desses tecidos (BRASIL, 2006; IKEDAGARCIA et al, 2008). As lâminas devem ser coradas com panótico ou *Giemsa* para que haja contraste nas estruturas celulares permitindo a diferenciação destas e a visualização das formas amastigotas, de coloração basofílica, em forma de vírgula, no interior de VP em macrófagos (BRACHO et al, 2007). A diferenciação das *Leishmanias* é feito pelo encontro do cinetoplasto perpendicular ao seu núcleo, garantido a confirmação diagnóstica deste protozoário e descartando outros parasitas intracelulares (WEBSTER & RUSSEL, 1993; GINN et al, 2006).

Este método possui elevada especificidade, chegando a 100%, e sensibilidade variando entre o grau de parasitemia, tipo de material coletado, qualidade da amostra, podendo atingir 80% em cães sintomáticos, sendo menor em cães assintomáticos (BRASIL, 2006). Outras vantagens são a fácil execução, rapidez na avaliação e baixa invasão do paciente (BRASIL, 2003).

### **2.6.2.3. Histopatologia**

A análise histopatológica é uma técnica tradicional utilizada em laboratórios de patologia para observar as alterações estruturais e celulares nos tecidos e órgãos coletados em necropsias ou biopsias. O método consiste em fixar esses fragmentos de órgãos em formol 10%, processá-los rotineiramente, incluí-los em parafina, microtomizá-los em finos cortes de 1 a 4 micrômetros, em seguida são acondicionados em lâminas de vidro, desparafinizados e corados em hematoxilina e eosina (HE) (CARSON & HLADIK, 2008). Com auxílio da microscopia óptica de luz, em aumento de 400 a 1000 vezes, são observadas as alterações histopatológicas da LVC e formas amastigotas (QUEIROZ et al, 2010).

A especificidade é de aproximadamente 100% pela visualização direta do parasita, já a sensibilidade varia conforme parasitemia, quantidade de tecido analisado, paciência do observador na avaliação, podendo chegar a no máximo 80% (FEITOSA et al, 2000; NOLI, 1999), sendo menor em cães assintomáticos (BRASIL, 2006).



#### 2.6.2.4. Imuno-histoquímica

Diversos métodos diagnósticos necessitam de uma ferramenta que auxilie na confirmação. A imuno-histoquímica constitui um exame eficaz na identificação específica do alvo marcando proteínas pela ligação de anticorpos em antígenos. Para visualizar o antígeno desejado, utiliza-se um anticorpo primário e outro secundário, este segundo reage com uma solução cromógena que dará a coloração à marcação, sendo possível a diferenciação observando em microscopia óptica de luz (KIERNAN, 2004). O diagnóstico presuntivo obtido na avaliação de lâminas em HE pode ser confirmado com a imuno-histoquímica, além de descartar diagnósticos diferenciais (LEONG & WRIGHT, 1987). Deste modo, a identificação das *Leishmanias* no tecido de animais positivos é facilitada por esta técnica (TAFURI et al, 2004).

Utilizam-se diversos protocolos divididos em diferentes etapas que podem durar de 1 a 2 dias para serem executadas. O tecido após ser preparado em lâmina de vidro, semelhante à técnica de HE, é trabalhado com enzimas e soluções para posteriormente receber o anticorpo primário, podendo este ser monoclonal ou policlonal. Tafuri e colaboradores e Queiroz e colaboradores recomendam o uso de anticorpo policlonal oriundo de soro hiperimune de cães sororreagentes para LVC nos testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) devido ao baixo custo. Alguns protocolos usam a incubação do anticorpo *over night* no tecido durando até 22 horas albergando as lâminas em câmara escura e úmida à temperatura de 4°C. As etapas seguintes consistem em se aplicar um anticorpo secundário anti-IgG de coelho promovendo uma reação cruzada e, para detecção desta reação, utiliza-se o complexo Avidin-Biotin Peroxidase e o substrato cromógeno específico para peroxidase, este último revelará o antígeno marcado. Para haver contraste das estruturas celulares e do alvo marcado é necessário contracorar com hematoxilina. Ao final do processo, desidratam-se as lâminas e em seguida são montadas para serem visualizadas à microscopia (TAFURI et al, 2004; QUEIROZ et al, 2010).

### 2.6.2.5. RIFI e ELISA

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ilustrado na figura 9, e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são testes sorológicos geralmente aplicados em conjunto com a finalidade de se obter maior segurança diagnóstica da LVC. São utilizadas para inquéritos sorológicos e recomendadas pelo Ministério da Saúde. Ambas as técnicas expressam o nível de imunoglobulinas séricas circulantes (BRASIL, 2006).

A coleta do material para análise deve ser feito pela venopunção podendo ser da veia cefálica ou da jugular e armazenado em tubos de ensaio sem anticoagulante, como EDTA, para haver separação do soro sanguíneo (QUEIROZ et al, 2010).

O RIFI funciona por meio de uma marcação antígeno-anticorpo. Esta reação pode ser visualizada ou quantificada utilizando-se diferentes marcadores, neste caso, o marcador utilizado é um fluorocromo, uma substância que é excitada quando absorve luz ultravioleta e em seguida emite uma luz visível, podendo ser visualizada em um microscópio de epiluminescência ou confocal. Um dos fluorocromos mais utilizados é o isotiocianato de fluoresceína (FITC) que emite luz de coloração verde (BEUTNER, 2003; AOKI et al, 2010).



Figura 9 – Reagentes do teste de imunofluorescência indireta - RIFI, kit Bio-Manguinhos.

Fonte: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2010. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/ensaios-sorologicos/imunofluorescencia-indireta/leishmaniose-canina>>, Acesso em: 09/08/2012.

No teste de ELISA também ocorre uma reação de ligação entre antígeno e anticorpo. Os antígenos são obtidos de culturas *in vitro* de *Leishmania* spp. Utiliza-se microplacas para adsorver esses antígenos. O soro das amostras e do controle são adicionados a essas placas. Posteriormente, são colocadas anti-imunoglobulinas (anti-IgG) de cães marcadas com enzima peroxidases. Caso a amostra (soro) possua anticorpos anti-*Leishmania*, ocorrerá uma mudança na coloração do teste que é interpretado por espectrofotometria (MACHADO ET AL, 1997; BRASIL, 2006; OLIVEIRA et al, 2008).

O animal considerado sororreagente no RIFI é o que apresenta título semelhante ou maior que o ponto de corte que é 1:40, no ELISA quando atinge o nível de densidade óptica maior ou igual a 3 ( $N \geq 3$ ) (MACHADO ET AL, 1997; OLIVEIRA et al, 2008). O ponto de corte do ELISA é 3 pois é o resultado obtido no controle negativo (BRASIL, 2006). A aplicação dessas técnicas em conjunto possui vantagens como custo baixo, facilidade na aplicação e sensibilidade/especificidade adequadas (ALVES & BEVILACQUA, 2004), mas podem apresentar falsos positivos e falsos negativos (FEITOSA et al., 2000; SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997). O RIFI quando aplicado isoladamente possui baixa sensibilidade (BERRAHAL et al., 1996). O RIFI possui a desvantagem de reações cruzadas com outras doenças como a Leishmaniose Cutânea e a Doença de Chagas (BRASIL, 2006).

#### **2.6.2.6. PCR**

O exame de reação em cadeia pela polimerase (PCR) é um exame molecular que comprova a presença do agente pelo isolamento e amplificação de sequências de pares de bases de seu DNA específico (BRASIL, 2003).

O material a se coletar pode ser proveniente de qualquer tecido, até mesmo sangue, alguns autores relatam o uso de pele ou órgãos linfóides. A coleta é feita por biópsia em animais vivos ou fragmento de órgãos durante o procedimento de necropsia. O material deve ser coletado assepticamente, evitando-se contaminações e posteriormente congelado. A literatura recomenda

que o processo de congelamento seja com nitrogênio líquido e em seguida armazená-lo em freezer a -70°C (RODGERS et al, 1990; QUEIROZ et al, 2010).

O processo de amplificação é feito com 120 pares de bases, como observado na figura 10, que são específicos para *Leishmania* spp. e estão presentes no kDNA, o DNA mitocondrial único do cinetoplasto (STUART & FEAGIN, 1992). O par de oligonucleotídeos, os chamados primers, usados são 13A 5'-dGTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' e 13B 5'-dATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3', e a enzima da reação é uma polimerase. Utilizam-se variações de calor em um termociclador para promover a abertura das fitas de DNA e permitir que os primers se liguem, ocorrendo primeiro uma denaturação, ligação e por fim uma polimerização. Ocorrem vários ciclos de modo que a amplificação seja exponencial (BOLLELA et al, 1999).

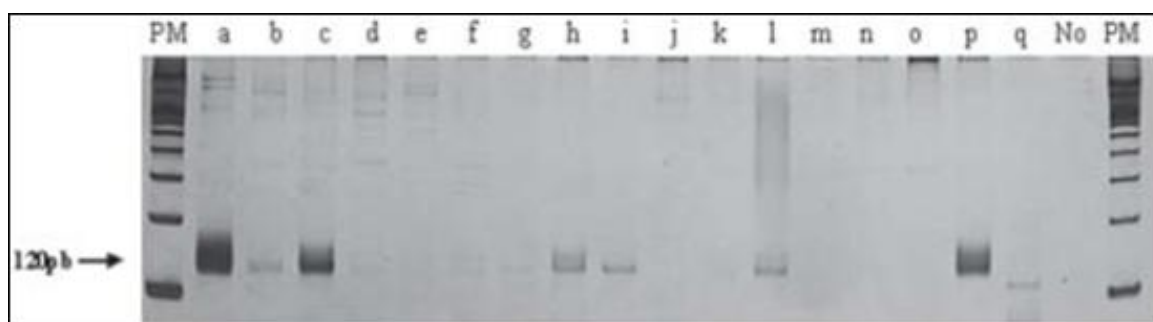


Figura 10 – Resultado de teste de PCR em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata (foto), com adaptações. (PM) marcador em escada de 100pb, (a) controle positivo para LVC, (b-q) amostra de soro canino para investigação, (No) controle negativo. Fonte: NUNES et al, 2007.

A verificação da amplificação do produto PCR é feito por eletroforese com gel de poliacrilamida a 8% utilizando-se nitrato de prata como corante, como ilustrado na figura 10. É importante o uso de controles positivos e negativos (RODGERS et al, 1990; QUEIROZ et al, 2010). O PCR possui especificidade de 100%, considerada uma ótima ferramenta diagnóstica tanto para animais assintomáticos quanto sintomáticos, já sua sensibilidade é de 94%, mas o resultado depende do tipo de amostra coletada, se o animal é proveniente de áreas endêmicas, método de extração do DNA e do alvo DNA a ser amplificado (BRASIL, 2006), sendo recomendado usar um alvo específico e único, como o kDNA (STUART & FEAGIN, 1992). A desvantagem principal é a

necessidade de estrutura com equipamentos de elevado custo e mão de obra especializada (BRASIL, 2003).

## **2.7. Diagnóstico diferencial**

A forma cutânea e a forma mucosa da Leishmaniose causadas por outras espécies de *Leishmania* spp. devem ser levadas em conta no diagnóstico diferencial de lesões cutâneas que ocorrem na LVC (GINN et al, 2006, SHARMA & SINGH, 2008).

Doenças oportunistas como tuberculose disseminada, salmonelose, linfoma, toxoplasmose, histoplasmose e coccidiomicose, devem ser consideradas como diagnósticos diferenciais (BRASIL, 2006).

A erlichiose é um importante diagnóstico diferencial por conter alguns achados clínicos similares, tal como anemia, trombocitopenia e aplasia medular, e por apresentar algumas reações cruzadas com testes diagnósticos sorológicos (LLERA et al, 2002).

Na pele são observadas inúmeras lesões que podem ser oriundas de outras moléstias como sarna sarcóptica, sarna demodécica, seborreia, lúpus eritematoso sistêmico, pêfigo foliáceo, esporotricose, histoplasmose, dermatite responsiva a zinco e outras (GINN et al, 2006)

As neoplasias não podem ser esquecidas. A exemplo, o tumor venéreo transmissível é o diferencial de lesões proliferativas no prepúcio causada por *Leishmania infantum* em cães (FOSTER & LUDDS, 2006).

### **3. Estudo comparativo entre as técnicas de citopatologia, histopatologia e imuno-histoquímica no diagnóstico da LVC em cães naturalmente infectados do Distrito Federal.**

#### **3.1. Materiais e métodos**

Foram selecionados 10 cães positivos para LVC provenientes da Diretoria de Vigilância Ambiental (DIVAL) do Distrito Federal e do Hospital Veterinário (Hvet) da Universidade de Brasília. Solicitou-se ao DIVAL animais positivos ou suspeitos para LVC que seriam eutanasiados, bem como do Hvet para a realização do experimento. O diagnóstico prévio de LVC em alguns animais foi emitido pelo DIVAL utilizando-se os testes de RIF e ELISA, outros animais receberam diagnóstico prévio pelo LPV-UnB por PAAF de medula óssea. Após a eutanásia, os animais foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária-UnB (LPV-UnB) para serem necropsiados e coletados fragmentos de linfonodos, baço e medula óssea.

Os cães foram classificados em sintomáticos e assintomáticos, quando apresentava pelo menos um sinal clínico sugestivo de LVC ou nenhum sinal observado, respectivamente. Em seguida as amostras foram rotineiramente processadas para citopatologia, empregando-se *imprintings* ou esfregaços desses tecidos selecionados, e histopatologia em cortes parafinizados, corados com hematoxilina e eosina (HE). Cortes das mesmas amostras usadas na histopatologia embedidas em parafina foram submetidas ao método de imuno-histoquímica, com a aplicação de um anticorpo policlonal anti-*Leishmania* (anticorpo primário) produzido em cães. Para melhor fixação do corte microtomizado, utilizou-se lâminas silanizadas. Foi empregada recuperação antigênica em calor (banho-maria, por 45 minutos) e incubação com o anticorpo, a 4°C em câmara úmida por 12 horas. A reação foi revelada em solução cromógena de diamino benzidina (DAB) e contra-corado com hematoxilina. Em todos os métodos empregados neste estudo, as amostras tiveram suas cargas parasitárias avaliadas semi-quantitativamente em ausente (0), mínima (+), discreta (++) , moderada (+++) e acentuada (++++).

### 3.2. Resultados

A tabela 1 indica a quantidade de animais e os métodos utilizados no diagnóstico prévio da LVC, antes de chegar ao LPV-UnB. Dos 10 animais com a doença, 5 animais foram diagnosticados por exames sorológicos (RIFI e ELISA), 3 pela citopatologia e outros 3 não possuíam diagnóstico prévio, sendo feito o exame citopatológico para encontrar o parasita e confirmar a suspeita inicial. Apenas 1 animal recebeu diagnóstico prévio tanto pelo RIFI e ELISA quanto pela citopatologia.

<b>Tabela 1 – Método utilizado na triagem</b>			
	<b>RIFI e ELISA</b>	<b>Citopatologia</b>	<b>Suspeita</b>
N 1552-11	X		
N 1768-11		X	
N 1772-11	X		
N 1905-11	X		
N 1908-11	X		
N 045-12			X
N 202-12			X
N 358 -12	X	X	
P 237-12			X
P 177-12		X	

A maioria dos cães analisados, como observado na tabela 2, foram classificados como sintomáticos (9/10) e em assintomáticos (1/10). Entre os sintomáticos, os sinais clínicos mais observados foram linfadenomegalia (8/9), hepatomegalia (7/9) e dermatopatias (7/9).

<b>Tabela 2 – Classificação sintomatológica</b>		
<b>ID</b>	<b>Classificação</b>	<b>Sinais clinicopatológicos</b>
N 1552 – 11	Sintomático	Linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, petéquias na superfície renal, lesões de pele crostosas ao redor dos olhos, na lombar e no dorso, onicogribose, petéquias na mucosa da

		vesícula urinária e prostatomegalia.
N 1768 – 11	Sintomático	Magreza, linfadenomegalia, hepatomegalia, lesões de pele crostosas, ulcerativas e esfoliativas por todo corpo, áreas de alopecia, seborréia, atrofia muscular do quarto posterior.
N 1772 – 11	Sintomático	Linfadenomegalia, hepatomegalia, lesões de pele crostosas, ulcerativas e esfoliativas nas orelhas.
N 1905 – 11	Sintomático	Icterícia, linfadenomegalia, hepatomegalia, lesões de pele ulceradas nos membros pélvico e área de alopecia nos 4 membros.
N 1908 – 11	Sintomático	Icterícia, linfadenomegalia, rim com cápsula renal aderida, área de infarto no córtex renal, onicogribose, endocardiose, estrias multifocais avermelhadas na mucosa, cornos uterinos aumentados e preenchidos por muco.
N 045 – 12	Sintomático	Linfadenomegalia, áreas de infarto no baço, hepatomegalia, lesões de pele crostosas ao redor dos olhos e nas orelhas, lesões ulcerativas nas orelhas, regiões de ílio e ísquio.
N 202 – 12	Sintomático	Magreza, linfadenomegalia e áreas de infarto em linfonodo, hepatoesplenomegalia, lesões de pele crostosas nas orelhas e áreas de alopecia nos 4 membros.
N 358 – 12	Sintomático	Linfadenomegalia, evidenciação das estrias corticomedulares renais, hepatomegalia, lesões de pele esfoliativas nos membros, tórax e orelhas.
P 177 – 12	Assintomático	Sem sinais clínicos.
P 237 – 12	Sintomáticos	Esplenomegalia, hemorragia meningeal, opistótono, pedalagem, miose, depressão, sonolência, encefalite.

A tabela 3 ilustra os 10 animais utilizados neste estudo com os respectivos métodos empregados e a carga parasitária. Nota-se que o tecido que apresentou maior carga em todos os exames foi a medula óssea, enquanto que linfonodo apresentou menor carga, além de ser o tecido em que mais se observou ausência do parasita nos exames realizados, mesmo o animal sendo positivo para LVC em outros métodos (RIFI/ELISA).



A técnica da citopatologia utilizada neste estudo detectou positividade em 100% dos animais avaliados, detectando-se formas amastigotas em 8 linfonodos, 10 baços e 10 medulas ósseas como ilustrado na tabela 4. Quando o parasita não era detectado pela citopatologia de um tecido, como linfonodos negativos (2/10), ao se avaliar a citopatologia do baço e da medula óssea, foram visualizadas formas amastigotas intracitoplasmáticas. A técnica de histopatologia detectou formas amastigotas em 100% dos animais, com 6 linfonodos, 8 baços e 8 medulas ósseas positivos. Da mesma forma a imuno-histoquímica confirmou o diagnóstico de LVC em todos os 10 animais, 7 linfonodos, 10 baços e 9 medulas ósseas positivas.

<b>Tabela 3 – Avaliação semi-quantitativa da carga parasitária</b>									
<b>ID</b>	<b>Citopatologia</b>			<b>Histopatologia</b>			<b>Imuno-histoquímica</b>		
	<b>B</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>B</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>B</b>	<b>L</b>	<b>M</b>
N 1552-11	+	0	++	0	0	+	++	++	++
N 1768-11	+	+	++	++	+	++	++++	++	++
N 1772-11	+	0	++	+	0	0	+	0	+
N 1905-11	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
N 1908-11	++	+	++++	+	0	+	+++	++	+++
N 045-12	+	+	++	0	+	0	++	0	0
N 202-12	+	+	+++	++	++++	+++	+++	++++	+++
N 358 -12	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++
P 177-12	+++	++	++++	++++	+	+++	++++	++	+++
P 237-12	+	+	+	+	0	+	+	0	+

ID: identificação do animal; B: baço, L: linfonodo, M: medula óssea.

0: ausência de parasita; +: quantidade mínima; ++: quantidade discreta; +++: quantidade moderada; ++++: quantidade acentuada

A avaliação semi-quantitativa revelou maior carga parasitária ou maior detecção de formas amastigotas pelas técnicas imuno-histoquímica e citopatologia, sendo o baço o que apresentou maior quantidade de formas amastigotas e a medula óssea menor detecção ou carga parasitária por estes métodos. A histopatologia demonstrou ser menos sensível com relação às outras duas técnicas.

<b>Tabela 4 – Número de animais positivos de acordo com a metodologia e tecido</b>			
<b>Citopatologia</b>			
	<b>Baço</b>	<b>Linfonodo</b>	<b>Medula óssea</b>
Negativo	0	2	0
+	6	5	1
++	2	2	4
+++	1	0	3
++++	1	1	2
Total de positivos	10	8	10
<b>Histopatologia</b>			
	<b>Baço</b>	<b>Linfonodo</b>	<b>Medula óssea</b>
Negativo	2	4	2
+	3	3	3
++	3	0	1
+++	1	2	4
++++	1	1	0
Total de positivos	8	6	8
<b>Imuno-histoquímica</b>			
	<b>Baço</b>	<b>Linfonodo</b>	<b>Medula óssea</b>
Negativo	0	3	1
+	2	0	2
++	2	4	2
+++	4	2	4
++++	2	1	1
Total de positivos	10	7	9

+: quantidade mínima; ++: quantidade discreta; +++: quantidade moderada; ++++: quantidade acentuada.

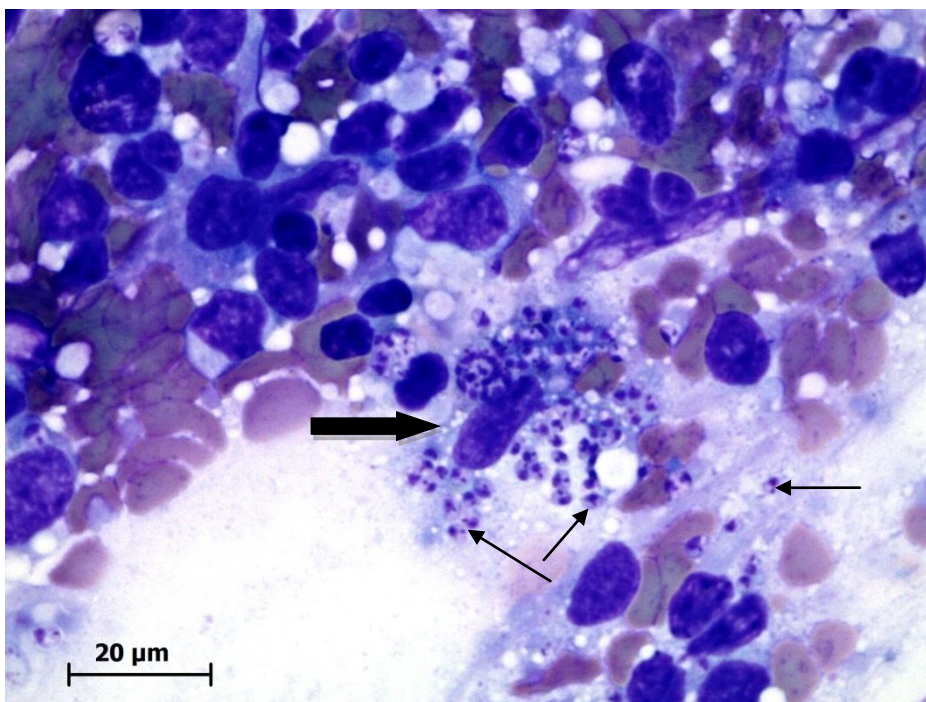


Figura 11 – Citopatologia de baço com carga parasitária acentuada (++++). Macrófago com citoplasma vacuolizado (seta larga), forma amastigota contendo cinetoplasto perpendicular ao seu núcleo (setas finas). (Panótico rápido, 1000X)

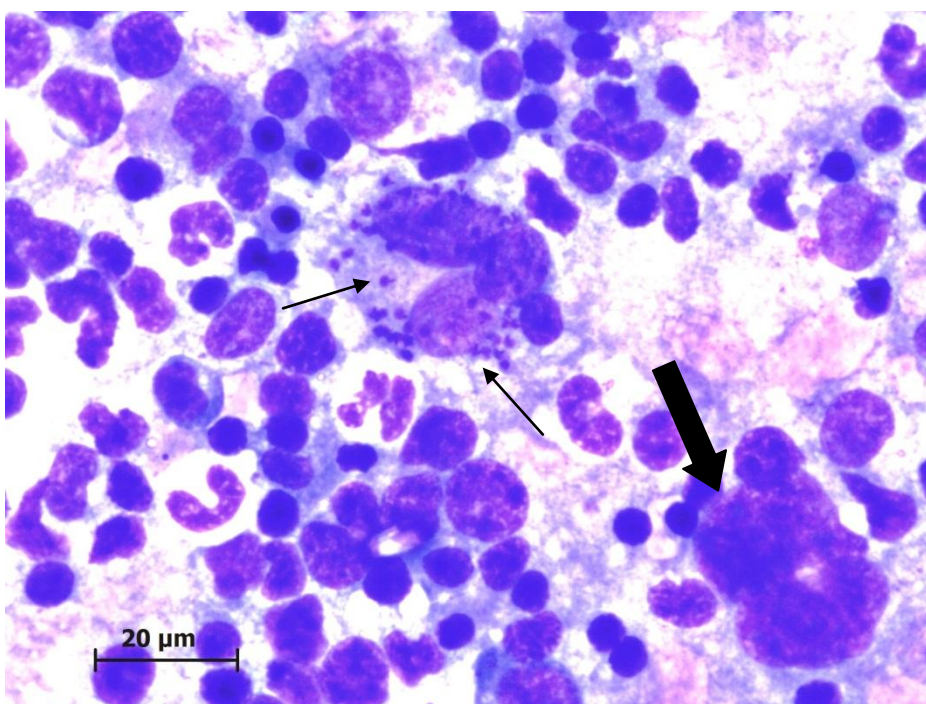


Figura 12 – Citopatologia de medula óssea com carga parasitária discreta (++) . Megacariócito (seta larga), formas amastigotas no interior de macrófago (setas finas). (Panótico rápido, 1000X).

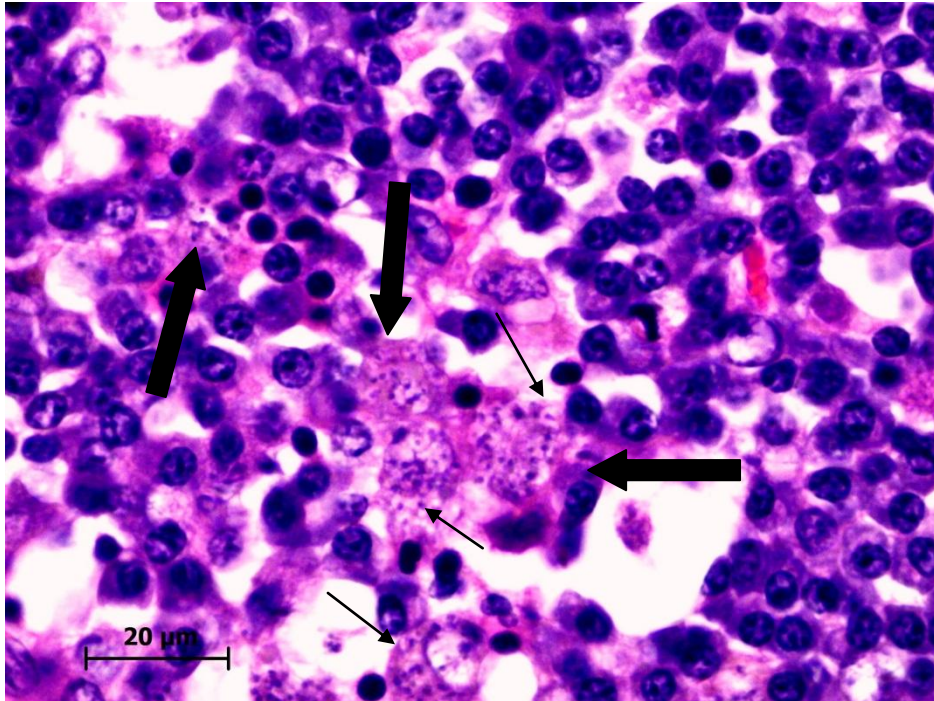


Figura 13 – Histopatologia de linfonodo, carga parasitária discreta (++)  
Macrófagos parasitados (setas largas), formas amastigotas no interior de  
macrófago (setas finas). (HE, 1000X)

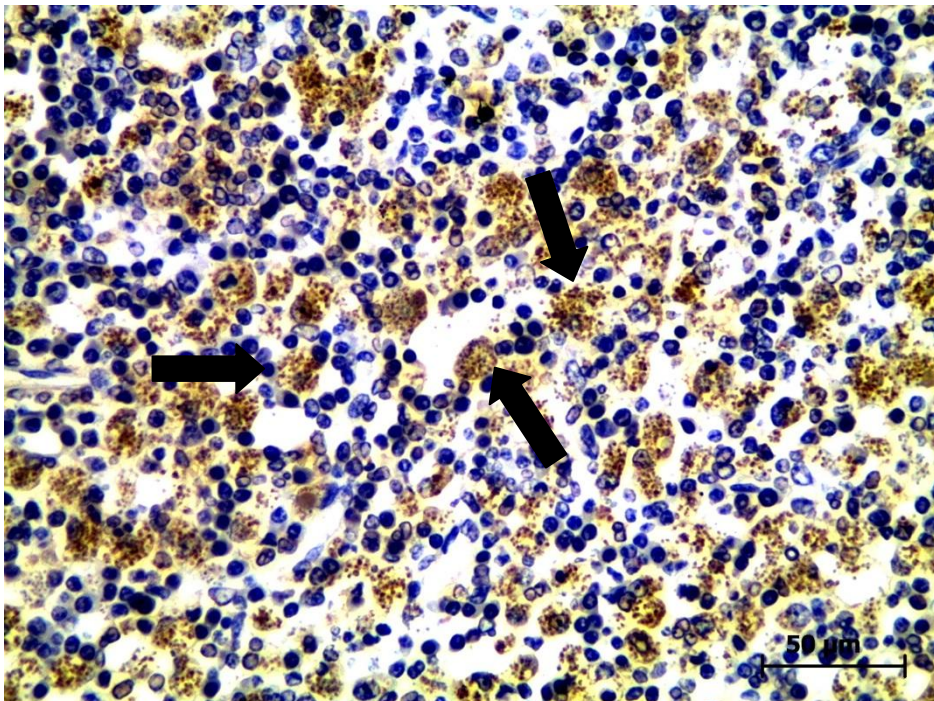


Figura 14 – Imuno-histoquímica de linfonodo de animal controle-positivo.  
Macrófagos contendo inúmeras formas amastigotas imuno-marcadas (setas).  
(DAB, 400X).

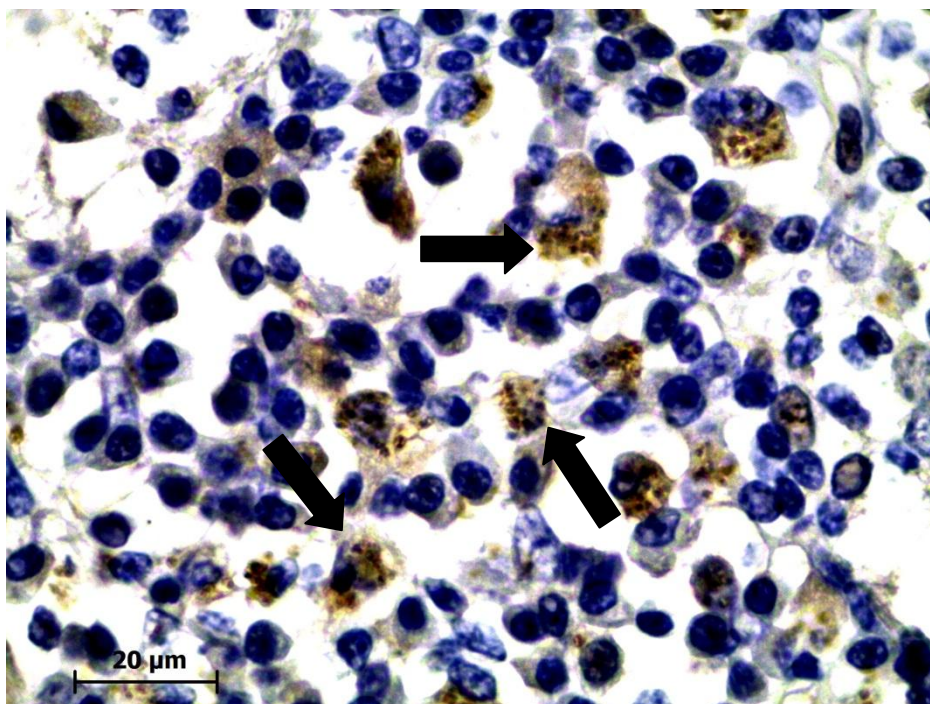


Figura 15 – Imuno-histoquímica de linfonodo, carga parasitária moderada (+++). Macrófagos contendo inúmeras formas amastigotas imuno-marcadas (setas). (DAB, 1000X).

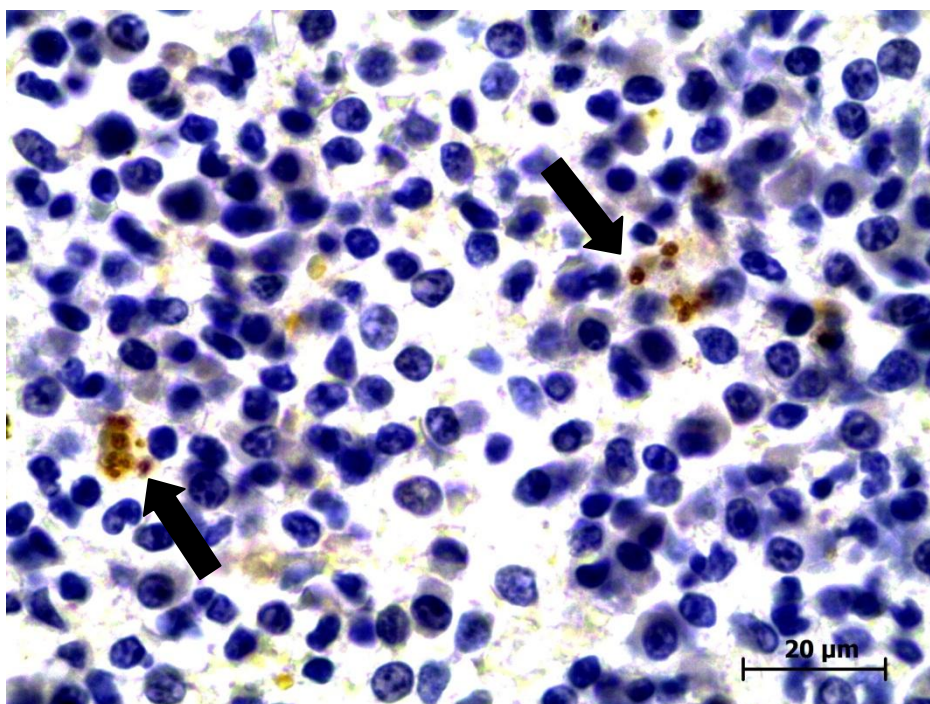


Figura 16 – Imuno-histoquímica de baço, carga parasitária mínima (+). Macrófagos contendo poucas formas amastigotas imuno-marcadas (setas). (DAB, 1000X).

### 3.3. Discussão

Os exames de RIFI e ELISA com resultados positivos feitos antes dos animais serem encaminhados ao LPV tiveram confirmação pelos outros exames diagnósticos utilizados neste estudo, demonstrando que tais exames sorológicos possuem elevada sensibilidade diagnóstica e uma confiabilidade em seu uso na triagem para Leishmaniose, assim como observado por BRASIL, 2006. Os animais que não tiveram exame sorológico na triagem, foram encaminhados apenas por suspeita para investigação laboratorial por apresentarem lesões de pele, emagrecimento, alopecia e onicogribose, sinais clínicos descritos em animais com LVC de acordo com Mancianti e colaboradores (1988).

O número de animais sintomáticos desse estudo pode ser explicado devido à identificação inicial de um animal suspeito para LVC ocorrer de maneira subjetiva, observando-se os diversos sinais clínicos inespecíficos e em seguida são realizados inquéritos para diagnóstico de LVC. Deste modo, animais que não apresentam sinais clínicos são dificilmente diagnosticados, o que explica a baixa quantidade de assintomáticos diagnosticados (MARCONDES et al, 2003; FEITOSA et al, 2006, BRASIL, 2006). Os achados clinicopatológicos linfadenomegalia, hepatomegalia e dermatopatias foram as mais frequentes em animais soropositivos para LVC (KRAUSPENHAR, et al., 2007).

A técnica de citopatologia demonstrou ser o método mais eficiente para o diagnóstico da LVC entre as técnicas avaliadas, uma vez que esta apresenta inúmeras vantagens, por ser um procedimento pouco invasivo, de fácil aplicação, baixo custo, requer mínima utilização de equipamentos e reagentes laboratoriais e desde a coleta até a leitura das lâminas requer poucos minutos (BRASIL, 2003). Além dessas vantagens, Feitosa et al (2000) afirma que a histopatologia pode chegar a 80% de sensibilidade assim como a sensibilidade de 80% encontrada no manual do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) sobre citopatologia. Contudo, o presente estudo demonstrou que a citopatologia apresenta maior sensibilidade quando compara à histopatologia, uma vez que formas amastigotas foram detectadas em alguns animais pela técnica de citopatologia, o mesmo não sendo possível pela histopatologia. A observação de várias lâminas citopatológicas, a qualidade do preparo, o tempo de visualização

de cada lâmina e pessoal bem treinado garantiram uma elevada sensibilidade neste exame (URBANO et al, 2005; BRASIL, 2006)

A histopatologia e de a imuno-histoquímica são técnicas que utilizam fragmentos de tecidos e, portanto, são mais invasivos. Adicionalmente, são métodos que requerem no mínimo de 48 a 72 horas para serem realizados, além de necessitarem de um maior número de reagentes e equipamentos laboratoriais. A vantagem da técnica de imuno-histoquímica é a maior sensibilidade, uma vez que anticorpos anti-*Leishmania* são empregados, necessitando de menor experiência de quem faz a leitura microscópica das amostras e assim minimizando falso-positivo, que podem ocorrer com maior frequência com as técnicas de citopatologia e histopatologia (TAFURI et al, 2004).

### **3.4. Conclusão**

Este estudo demonstrou que a citopatologia é um método eficaz para o diagnóstico da LVC, e pode ser utilizada como método confirmatório em animais positivos em testes sorológicos como RIFI e ELISA. A eficácia desta técnica é devido ao seu baixo custo, rápida execução e, quando se dispõe de pessoal treinado para a leitura das lâminas, apresenta baixo percentual de falso-positivos, presentes nos métodos sorológicos mencionados anteriormente.

A imuno-histoquímica é uma técnica de alta sensibilidade e especificidade e pode ser utilizada como método adicional, em conjunto com o RIFI, ELISA e citopatologia, para confirmar infecção por *Leishmania* spp. em cães.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGA, E., KATSCHINKI, D. M., 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**, vol. 169, p. 898-905, 2002.
- AGUIAR, G. M., MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotômíneos do Brasil, p.207-255. In: RANGEL, E. F., LAINSON, R., **Flebotômíneos do Brasil**, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 368 pags, 2003.
- ALBUQUERQUE, B. C. N. C., MAIA, F. C. L., SILVA JÚNIOR, V. A., LIMA, A. M. A., ALBUQUERQUE, E. R. C., PIMENTEL, D. de S., ALVES, L. C., Alterações estruturais em rins de caninos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, vol. 15, n. 1, p. 3-5, 2008.
- ALEXANDER, B., DE CARVALHO, R. L., MCCALLUM, H., PEREIRA, M. H., Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil, **Emerging Infectious Disease Journal**, vol. 8, p. 1480-1485, 2002.
- ALVES, G. B. B., PINHO, F. A., SILVA, S. M. M. S., CRUZ, M. S. P., COSTA, F. A. L., Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 43, n. 3, p. 310-315, 2010.
- ALVES, W. A., BEVILACQUA, P. D., 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, n. 1, p. 259-265, 2004.
- ANDRADE, H. M., TOLEDO, V. P. C. P., MARQUES, M. J., SILVA, J. C. F., TAFURI, W. L., MAYRINK, W., GENARO, O., *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Veterinary Parasitology**, vol. 103, p. 71-81, 2002.
- AOKI, V., SOUSA JUNIOR, J. X., FUKUMORI, L. M. I., PÉRIGO, A. M., FREITAS, E. L., OLIVEIRA, Z. N. P., Imunofluorescência direta e indireta, **Anais Brasileiro de Dermatologia**, vol. 85, n. 4, p. 490-500, 2010.
- ASHFORD, R. W., Leishmaniasis reservoirs and their significance in control, **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, vol.14, p. 523-532, 1996.
- BACELLAR, O., CARVALHO, E. M., Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral, **Gazeta Médica da Bahia**, Bahia, vol. 75, cap. 1, p. 24-34, 2005.
- BANETH, G., KOUTINAS, A. F., SOLANO-GALLEGO, L., BOURDEAU, P., FERRER, L., Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one, **Trends in Parasitology**, vol. 24, n.7, p. 324-330, 2008.
- BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., BROWELL, C. E., SKEIKY, Y. A., ELLINGSWORTH, L. R., TWARDZIK, D. R., REED, S. G., Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism, **Science**, vol. 257, n. 5069, p. 545-548, 1992.
- BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A. YONG, E. C., BROWELL, C. E., TWARDZIK, D. R., REED, S. G., Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*, **Proceedings National Academy of Science**, vol. 90, n.8, p. 3442-3446, 1993.



BARROS, R. M., Caracterização histopatológica da Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal, **Dissertação de Mestrado em Saúde Animal**, Distrito Federal, 116 p., 2011.

BATES, P. A., Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture, **Parasitology**, vol. 108, p. 1-9, 1994.

BATES, P. A., ROGERS, M. E., New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, vol.4, p. 601-609, 2004.

BERRAHAL, F., MARY, C., ROZE, M., BERANGER, A., ESCOFFIER, K., LAMOUREUX, D., DUNAN, S., Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting, **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 273-277, 1996.

BEUTNER, E. H., The development of immunofluorescence and the immunopathology of the skin, **International Journal of Dermatology**, vol. 42, p. 99-109, 2003

BLACKWELL, J., FREEMAN, J., BRADLEY, D., Influence of H2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice, **Nature**, vol. 283, p.72-74, 1980.

BOGDAN C., ROLLINGHOFF, M., The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion, **International Journal of Parasitology**, vol. 28, p. 121-134, 1998.

BOGDAN, C., VODOVOTZ, Y., NATHAN, C., Macrophage deactivation by interleukin 10, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 174, n. 6, p. 1549-1555, 1991.

BOGGIATO, P. M., CORLEY-GIBSON, K. N., METZ, K., GALLUP, J. M., HOSTETTES, J. M., MULLIN, K., PETERSEN, C. A., Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America, Iowa, United States of America, **Neglected Tropical Disease**, vol. 5, cap. 4, 6 p., 2011.

BOLLELA, V. R., SATO, D. N., FONSECA, B. A. L., Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar, **Revista de Saúde Pública**, vol. 33, n.3, p. 281-286, 1999.

BRACHO, C. O., DE QUINTANA, L. P., ARENAS, S. M., PARRA, M. R., Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: a validation study, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 102, n. 5, p. 549-554, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, Leishmaniose Visceral – DF, **Boletim epidemiológico Nº1/2009**, disponível em: <<http://www.saude.df.gov.br/sites/300/373/00000262.pdf>> Acesso em 10/10/2012.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, **Informativo Epidemiológico da Leishmaniose Visceral**, Ano 3, nº 2, Semana Epidemiológica Nº 13 de 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde, **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, Brasília, 120 p., 2003.

BRASIL, Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Editora MS, 122p., Brasil, 2006.

BRASIL, Sociedade Mundial de Proteção Animal, **Leishmaniose Visceral Canina: Um manual clínico veterinário**, Rio de Janeiro, 19 p., 2011.

- BRENNER, D. S., JACOBS, S. C., DRACHENBERG, C. B., PAPADIMITRIOU J. C., Isolated Visceral Leishmaniasis Presenting as an Adrenal Cystic Mass, **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, vol. 124, n. 10, p. 1553-1556, 2000.
- BRITO, F. L. C., ALVES, L. C., ORTIZ, J. P. D., MAIA, F. C. L., SILVA JUNIOR, V. A., LAUS, J. L., Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda city, Pernambuco, Brazil, **Ciência Rural**, vol. 34, p. 925-929, 2004.
- BURRACO, P., ABATE, O., GUGLIELMINO, E., Osteomyelitis and arthrosynovitis Associated with *Leishmania donovani* infection in a dog, **Journal of Small Animal Practice**, vol. 38, p.29-30, 1997.
- CAMPAGNE, M. V. L., WIESMANN, C., BROWN, E. J., Macrophage complement receptors and pathogen clearance, **Cell Microbiology**, vol. 9, p. 2095-2102, 2007.
- CARDOSO, L., NETO, F., SOUSA J. C., RODRIGUES, M., CABRAL, M., Use of a leishmanin test in the detection of canine *Leishmania* specific cellular immunity, **Veterinary Parasitology**, vol. 79, p. 213–220, 1998.
- CARSON, F. L., HLADIK, C., Histotechnology: A Self-Instructional Text, **American Society for Clinical Pathology**, 3 ed, 2008.
- CARVALHO, E. M., ANDREWS, B. S., MARTINELLI, R., DUTRA, M., ROCHA, H., Circulating immune complexes and rheumatoid factor in schistosomiasis and visceral leishmaniasis, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 32, n. 1, p. 61-68, 1983.
- CHANG, K. P., Intracellular multiplication of *Leishmania donovani* during repeated passages in primary cultures of hamster peritoneal macrophages, **Journal of Parasitology**, vol. 64, p. 931-933, 1978.
- CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R. W., ALVAR, J., BOELAERT, M., Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?, **Nature Reviews, Microbiology**, vol. 5, n.10, p. 873-882, 2007.
- CHATELAIN, R., VARKILA, K., COFFMAN R. L., IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice, **Journal of Immunology**, 1992, vol. 148, p. 1182-1187, 1992.
- 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**, vol. 141, p. 539-543, 1997.
- CORREDOR, A., GALLEGO, J. F., TESH, R. B., PELÁEZ, D., DIAZ, A., MONTILLA, M., PALÁU, M. T., *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, Colombia, vol. 83, p. 195, 1989.
- COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no combate de leishmaniose no Brasil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.2, p.223-228, 2001.
- COUTINHO, M. T. Z., BUENO, L. L., STERZIKA, A., FUJIWARA, R. T., BOTELHO, R. J., MARIA, De M., GENAROA, O., LINARDIA, P. M., Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis, **Veterinary Parasitology**, Minas Gerais, Brasil, vol. 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 other mammals?, **Veterinary Parasitology**, vol. 147, p. 320–325, 2007.

CRUZ, F. O., Bio-Manguinhos , **Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz**, 2010, Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/ensaios-sorologicos/imunofluorescencia-indireta/leishmaniose-canina>>. Acesso em: 09/08/2012.

DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S. P., Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 48, n.3, p.151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F., LORUSSO, V., TESTINI, G. PAIVA-CAVALCANTI, M. De, FIGUEREDO, L. A., STANNECK, D., MENCKE, N., BRANDÃO-FILHO, S. P., ALVES, L. C., OTRANTO, D., Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy, **Parasitology Research**, Brazil and Italy, vol. 106, n. 4, p. 857-860, 2010.

DAAR, A. S., FUGGLE, S. V., FABRE, J. W., TING, A., MORRIS, P. J., The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs, **Transplantation**, vol. 38, p. 293-298, 1984.

DEANE, L. M., Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará, **Serviço Nacional de Educação Sanitária**, Rio de Janeiro, 162p., 1956.

DEPLAZES, P., SMITH, N. C., ARNOLD, P., LUTZ, H., ECKERT, J., Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites, **Parasite Immunology**, vol. 17, n. 9, p451-458, 1995.

DESJARDINS, M., DESCOTEAUX, A., Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 185, p. 2061-2068, 1997.

DESJEUX, P. H., Leishmaniasis. Public health aspects and control, **Clinics in Dermatology**, vol. 14, p. 417-423, 1996.

DE LUNA, R., VUOTTO, M. L., IELPO, M. T. L., AMBROSIO, R., PIANTEDOSI, D., MOSCATIELLO, V., CIARAMELLA, P., SCALONE, A., GRADONI, L., MANCINO, D., Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Itália, vol. 70, p. 95-103, 1999.

DE WAAL, M. R., ABRAMS, J., BENNET, B., FIGDOR, C. G., DE VRIES, J. E., Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 174, p. 1209-1220, 1991.

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

DINIZ, S. A., MELO, M. S., BORGES, A. M., BUENO, R., REIS, B. P., TAFURI, W. L., NASCIMENTO, E. F., SANTOS, R. L., Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs, **Veterinary Pathology**, Belo Horizonte, vol. 42n. 5, p. 650-658, 2005.

DIPINETO, L., MANNA, L., BAIANO, A., GALA, M., FIORETTI, A., GRAVINO, A. E., MENNA, L. F., Presence of *Leishmania infantum* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Southern Italy, **Journal of Wildlife Diseases**, Wildlife Disease Association, vol. 43, n. 3, p. 518-520, 2007.

DISTRITO FEDERAL, Vigilância em Saúde detecta novos casos de Leishmaniose, **Exibição de notícia**, Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal, Distrito Federal, 1 p., 2009.

- DOMINGUEZ, M., TORANO, A., Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 189, p. 25-35, 1999.
- DUPREY, Z. H., STEURER, F. J., ROONEY, J. A., KIRCHHOFF, L. V., JACKSON, J. E., ROWTON, E. D., SCHANTZ, P. M. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003, **Emerging Infectious Diseases**, Geórgia, vol. 12, n. 3, p. 440–446, 2006.
- ELNAIEM, D. A., OSMAN, F. O., Evidence for active transmission of visceral leishmaniasis within a village in eastern Sudan, **Acta Tropica**, vol. 71, p. 305–309, 1998.
- FEITOSA, M. M., IKEDA, F. A., LUVIZOTTO, M. C., PERRI, S. H. V., Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba-São Paulo (Brasil), **Clínica Veterinária**, ano 5, n. 28, p. 36-44, 2000.
- FERRARI, H. F., CARREIRA, V. S., MOREIRA, M. A. B., MATTA, V. R., HAGA, C. H., LUVIZOTTO, M. C. R., Morphological, immunohistochemical and molecular study of renal lesions in canine visceral leishmaniasis (CVL), **Veterinária e Zootecnia**, vol. 17, n. 1, 123-131, 2010.
- FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis, In: Canine leishmaniasis update, **Proceedings of a canine leishmaniasis forum**, Ed. R. Killick-Kendrick, Barcelona, vol. 28-31, p. 6-10, 1999.
- FOLI, B. A., SAVILLE, M. W., YARCHOAN, R., Effects of the th-1 and th-2 stimulatory cytokines interleukin-12 and interleukin-4 on human immunodeficiency virus replication, **Blood**, vol. 85, p. 2114-2123, 1995.
- FONDEVILA, D., VILAFRANCA, M., FERRER, L., Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 56, p. 319-327, 1997.
- FONSECA, S. G., ROMÃO, P. R., FIGUEIREDO, F., MORAIS, R. H., LIMA, H. C., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q., TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis, **European Journal of Immunology**, São Paulo, vol. 33, n. 8, p. 2297-2306, 2003.
- FOSTER, R. A., LUDDS, P. W., Inflammation of the penis and prepuce (balanoposthitis), In: JUBB, K. V. E., KENNEDY, P. C., PALMER, N. C., **Pathology of Domestic Animals**, 5ª ed., vol 3, cap.5, p. 615, 2006.
- FRANKE, E. D., MCGREEVY, P. B., KATZ, S. P., SACKS, D. L., Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes, **Journal of Immunology**, vol. 134, p. 2713-2718, 1985.
- FREITAS, E., MELO, M. N., 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**, Minas Gerais, Brazil, vol.137, n. 1-2, p. 159-167, 2006.
- GALATI, E. A. B., Morfologia e Taxonomia. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos taxons da América. In: Rangel, E. F., LAINSON, R., **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro, 1ª edição, Ed. Fundação Oswaldo Cruz, p. 53-175, 2003.
- GAVGANI, A. S. M., HODJATI, M. H., MOHITE, H., DAVIES, C. R., Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial, **The Lancet**, Iran, vol. 360, p. 374–379, 2002.
- GENARO, O., Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P., MELO, A. L., LINARDI, P. M., **Parasitologia Humana**, São Paulo, 9ª edição, Ed. Atheneu, 523 p., 1995.

- GHINATO, L., MAIA, F. C. L., ALVES, L. C., TAFURI, V. L., FIGUEIREDO, M. M., TORRES, S. M., PIMENTEL, D. S., Pimentel Alterações estruturais e marcação imunohistoquímica do parasitismo no intestino de cães (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908), **Medicina Veterinária**, Recife, vol. 5, n. 2, p. 9-13, 2011.
- GINN, P. E., MANSELL, J. E. K. L., MAXIE, M. G., RAKICH, P. M., Protozoal diseases of skin, In: JUBB, K. V. E., KENNEDY, P. C., PALMER, N. C., **Pathology of Domestic Animals**, 5ª ed., vol 1, cap.5, p. 710-711, 2006.
- GONTIJO, C. M. F., MELO, M. N., Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas, **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Minas Gerais, vol. 7, n.3, p. 338-349, 2004.
- GOSSAGE, S. M., ROGERS, M. E., BATES, P. A., Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle, **International Journal of Parasitology**, vol. 33, p. 1027-1034, 2003.
- GOTO, H., LINDOSO, J. A., Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis, **Brazilian Journal Medical Biological Research**, Ribeirão Preto. v. 37, n. 4, p. 615-623, 2004.
- 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 parasites to macrophages, **Cell Microbiology**, vol. 10, p. 100-111, 2008.
- HALL, L. R., TTUS, R. G., Sand fly vector selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania* major and nitric oxide production, **Journal of Immunology**, vol. 155, p. 3501-3506, 1995.
- IKEDAGARCIA, F. A., CIARLINIL, P. C., LOPES, R. S., MARQUES, F. J., BONFIM, S. R. M., LIMA, V. M. F., PERRIL, S. H. V., MARCONDES, M., Hematological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, supl. 1, 2008.
- KALRA, N. L., BANG, Y. H., Manual on entomology in visceral leishmaniasis, **New Delhi: World Health Organization**, 88p., 1988.
- KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L., **Clinical biochemistry of domestic animals**, Academic Press, San Diego, 5ª ed., 983 p., 1997.
- KIERNAN, J. A., Histological and Histochemical Methods, **Theory and Practice**, 3ª Ed., Arnold, London, p. 502, 2004.
- KIMA, P. E., The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist, **International Journal of Parasitology**, vol. 37, p. 1087-1096, 2007.
- KISHORE, K., KUMAR, V., KESARI, S., DINESH, D. S., KUMAR, A. J., DAS, P., BHATTACHARYA, S. K., Vector control in leishmaniasis, **The Indian Journal of Medical Research**, vol. 123, p. 467-472, 2006.
- KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A.A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil, **Ciência Rural**, vol. 37, 2007.
- LAINSON, R., SHAW, J. J., Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R., **The leishmaniasis in biology and medicine**, Londres, v.1, p.1-120, 1987.

- LAINSON, R., SHAW, J. J., New World leishmaniasis. In: COX, F. E. G., KREIER, J. P., WAKELIN, D., Microbiology and Microbial Infections, Parasitology, **Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology, and immunity**, Sydney, Austrália, p. 313-349, 2005.
- LANOTTE, G., RIOUX, J. A., PERIERS, J., VOLHARDT, Y., Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France, Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine, Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique, **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, França, vol. 54, p. 277-95, 1979.
- LAUFS, H., MULLER, K., FLEISCHER, J., REILING, N., JAHNKE, N., JENSENIUS, J. C., SOLBACH, W., LASKAY, T., Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors, **Infection and Immunity**, vol. 70, p. 826-835, 2002.
- LECLERQ, V., LEBASTARD, M., BELKAID, Y., LOUIS, J., MILON, G., The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice – a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. **Journal of Immunology** vol. 157, p. 4537–4545, 1996.
- LEONG, A. S.-Y., WRIGHT, J., The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis, **Histopathology**, v. 11, n. 12, p. 1295-1305, 1987.
- LI, J., HUNTER, C. A., FARREL, J. P., Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production, **Journal of Immunology**, vol. 162, n. 2, p. 974-979, 1999.
- LIEW, F. Y., Functional heterogeneity of CD4+ T cells in leishmaniasis. **Immunology Today**, Reino Unido, vol. 10, n. 2, p. 40-45, 1989.
- LIEW, F. Y., LI, Y., MOSS, D., PARKINSON, C., ROGERS, M. V., MONCADA, S., Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, vol. 21, p. 3009-3014, 1991.
- LIMA, W. G., MICHALICK, M. S. M., MELO, M. N., TAFURI, W. L., TAFURI, W. L., Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes, **Acta tropica**, vol. 92, p. 43-53, 2004.
- LIMA, H. C., TITUS, R. G., Effect of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice, **Infection and Immunity**, vol. 64, p. 5442-5445, 1996.
- LLERA, J. L., LÓPEZ-GARCÍA, M. L., MARTÍN, R. E, DE VIVAR, G. R., Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniasis and ehrlichiosis, **Veterinary Parasitology**, vol. 109, p. 185-190, 2002.
- LOPES, S. T. A., CUNHA, C. M. S., BIONDO, A. W., FAN, L. C., Manual de Patologia clínica veterinária, (**Apostila**), Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Santa Maria, 1996.
- LOPEZ, R., LUCENA, R., NOVALES, M., GINEL, P. J., MARTIN, E., MOLLEDA, J. M., Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis, **Journal of Veterinary Medicine**, Berlim, v. 43, n. 8, p. 469-474, 1996.
- LUVIZOTTO, M. C. R., Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: 1º Fórum Sobre Leishmaniose Visceral Canina, **Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral Canina**, Jaboticabal, São Paulo, p. 15-22, 2006.

- MACHADO, R. Z., MONTASSIER, H. J., PINTO, A. A., LEMOS, E. G., MACHADO, M. R. F., VALADÃO, I. F. F., BARCI, L. G., MALHEIROS, E. B., An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle, **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 1, p.17-26, 1997.
- MANCIANTI, F., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., PIERI, S., Studies on canine leishmaniasis control I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonil treatment, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 82, p. 566–567, 1988.
- MARCONDES, C. B., Entomologia Médica e Veterinária, **Atheneu**, São Paulo, 432p, 2001.
- MARCONDES, C. B., PIRMEZ, C., SILVA, E. S., LAURENTINO-SILVA, V., STEINDEL, M., SANTOS, A. J., SMANIOTTO, H., SILVA, C. F. B., SCHUCK NETO, V. F., DONETTO, A., Levantamento de leishmaniose visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 36, n. 4, p. 499-501, 2003.
- MAROLI, M., PENNISI, M. G., DI MUCCIO, T., KHOURY, C., GRADONI, L., GRAMICCIA, M., Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*, **Veterinary Parasitology**, vol. 145, p. 357–360, 2007.
- MASUCCI, M., DE MAJO, M., CONTARINO, R. B., BORRUTO, G., VITALE, F., PENNISI, M. G., Canine Leishmaniasis in the Newborn Puppy, **Veterinary Research Communications**, Netherlands, vol. 27, supl. 1, p. 771–774, 2003.
- MAURICIO, I. L., STOTHARD, J. R., MILES, M. A., The Strange case of *Leishmani chagasi*, **Parasitology today**, Reino Unido, vol. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.
- MBOW, M. L., BLEYENBER, J. A., HALL, L. R., TITUS, R. G., Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but upregulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*, **Journal of Immunology**, vol. 161, p. 5571-5577, 1998.
- MCCVONVILLE, M. J., TURCO, S. J., FERGUSON, M. A., SACKS, D. L., Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage, **The EMBO journal**, vol. 11, p. 3593-3600, 1992.
- MICHALICK, M. S. M., GENARO, O., Leishmaniose Visceral Americana. In: 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.
- MOORE, K. J., MATLASHEWSKI, G., Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis, **Journal of Immunology**, vol. 152, p. 2930-2937, 1994.
- MOSSER, D. M., VLASSARA, H., EDELSON, P. J., CERAMI, A., *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 165, p. 140-145, 1987.
- MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A., COFFMAN, R. L., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, vol. 136, p. 2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T. R., COFFMAN, R. L., TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, **Annual Review of Immunology**, vol. 7, p. 145-173, 1989.
- MOSSER, D. M., BRITTINGHAM, A., *Leishmania*, macrophages and complement: A tale of subversion and exploitation. **Parasitology**, vol. 115, p. 9- 23, 1997.

- MOSSER, D. M., VLASSARA, H., EDELSON, P. J., CERAMI, A., *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation end products, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 165, p. 140-145, 1987.
- MULLER, K., VAN ZANDBERGEN, G., HANSEN, B., LAUFS, H., JAHNKE, N., SOLBACH, W., LASKAY, T., Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice, **Medical microbiology and immunology**, vol. 190, p. 73-76, 2001.
- MURRAY, H. W. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, vol. 174, cap.8, p. 4916-4923, 2005.
- MURRAY, H. W., NATHAN, C. F., Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 189, n. 4, p. 741-746, 1999.
- MURRAY, H. W., RUBIN, B. Y., ROTHERMEL, C. D., Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine, **Journal of Clinical Investigation**, New York, United States, vol. 72, p. 1506-1510, 1983.
- NIETO, C. G., NAVARRETE, I., HABELA, M. A., SERRANO, F., REDONDO, E., Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection, **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1-2, p. 33-47, 1992.
- NOLI, C., Leishmaniosis canina, **Waltham Focus**, vol. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.
- NUNES, C. M., DIAS, A. K. K., GOTTARDI, F. P., PAULA, H. B. DE, AZEVEDO, M. A. A. DE, LIMA, V. M. F. DE, GARCIA, J. F., Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.
- OLIVIER, M., TANNER, C. E., Susceptibilities of macrophage populations to infection in vitro by *Leishmania donovani*, **Infection and Immunity**, vol. 55, p. 467-471, 1987.
- OLIVEIRA, T. M. F. S., FURUTA, P. I., DE CARVALHO, D., MACHADO, R. Z., A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.
- OPPERDOES, F. R., The glycosomes of the kinetoplastida. In: COOMBS, G. H., NORTH, M. J., **Biochemical protozoology**, Reino Unido, vol. único, cap. 11, p. 134-144, 1991.
- ORDEIX, L., SOLANO-GALLEGO, L. FONDEVILLA, D., FERRER, L., FONDATI, A., Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. Infection in dogs with parasite-specific cellular immune response, **Veterinary Dermatology**, vol. 16, p. 187-191, 2005.
- OWENS, S. D., OAKLEY, D. A., MARRYOT, K., HATCHETT, W., WALTON, R., NOLAN, T. J., NEWTON, A., STEURER, F., SCHANTZ, P., GIGER, U., Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol. 15, p. 1076-1083, 2001.
- PAIVA, B. R., SECUNDINO, N. F., NASCIMENTO, J. C., PIMENTA, P. F., GALATI, E. A., JUNIOR, H. F., MALAFRONTI, R. S., Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR, **Acta Tropica**, vol. 99, p. 252-259, 2006.



PETERSEN, A.C. BARR, S. C., Canine Leishmaniasis in North America: Emerging or Newly Recognized?, **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, vol. 39, n. 6, p. 1065-1074, 2009.

PEIXOTO, P. V., BARROS, C. S. L., A importância da necropsia em medicina veterinária, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, vol.18, n. 3-4, 1 p., 1998.

PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BENADINA, W., DEL REAL, G., RUITENBERG, J., Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*, **Infection and Immunity**, vol. 62, p. 229-235, 1994.

POCAI, E. A., FROZZA, L., HEADLEY, S. A., GRAÇA, D. L., Leishmaniose Visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, **Ciência Rural**, Rio Grande do Sul, vol. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.

POLI, A., ABRAMO, F., MANCIANTI, F., NIGRO, M., PIERI, S., BIONDA, A., Renal involvement in canine leishmaniasis. A lightmicroscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study, **Nephron Basel**, v. 57, p. 444-452, 1991.

PUNTES, S. M., DA SILVA, R. P., SACKS, D. L., HAMMER, C. H., JOINER, K. A., Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9, **Journal of Immunology**, vol. 145, p. 4311-4316. 1990.

PUNTES, S. M., SACKS, D. L., DA SILVA, R. P., JOINER, K. A., Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 167, p. 887-902, 1988.

QUEIROZ, N. M. G. P., ASSIS, J., OLIVEIRA, T. M. F. S., MACHADO, R. Z., NUNES, C. M., STARKE-BUZETTI, W. A., Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

QUINNELL, R. J., KENNEDY, L. J., BARNES, A., COURTENAY, O., DYE, C., GARCEZ, L. M., SHAW, M. A., CARTER, S. D., THOMSON, W., OLLIER, W. E. R., Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism, **Immunogenetics**, United Kingdom, vol. 55, p. 23-28, 2003.

REBÊLO, J. M. M., ARAÚJO, J. C., CARVALHO, M. L., Flebótomos (*Lutzomyia*, Phlebotominae) da Ilha de São Luís, zona do Golfão Maranhense, Brasil, **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.247-253, 1999.

REIS, A. B., MARTINS-FILHO, O. A., CARVALHO, A. T., CARVALHO, M. G., MAYRINK, W., FRANÇA-SILVA, J. C., GIUNCHETTI, R. C., GENARO, O., CORRÊA-OLIVEIRA, R., Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis, **Research in Veterinary Science**, vol. 81, p. 68-75, 2006.

RIBEIRO, J. M. C., VACHEREAU, A., MODI, G. B., TESH, R. B., A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*, **Science**, vol. 243, p. 212-214, 1989.

RITTIG, M. G., BOGDAN, C., *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views, **Parasitology today**, vol. 16, p. 292-297, 2000.

RITTIG, M. G., SCHROPPEL, K., SEACK, K. H., SANDER, U., N'DAYNE, E. N., MARIDONNEAU-PARINI, I., SOLBACH, W., BOGDAN, C., Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells, **Infection and Immunity**, vol. 66, p. 4331-4339, 1998.

- RODGERS, M. R., POPPER, S. J., WIRTH, D. F., Amplification of kinetoplast DNA as tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*, **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.
- ROMAO, P. R. T., DIAS R. O., CRUZ, K. K., MARQUES, S. F. C., MONTEIRO, M. C., Leishmaniose: resposta imune e mecanismos de escape, Santa Catarina, **Revista Pesquisa e Extensão em Saúde**, vol. 3, n. 1, 9 p., 2007.
- ROSS, R., Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, Inglaterra, vol. 2, n. 2237, p. 1261–1262, 1903.
- SACKS, D., KAMHAWI, S., Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis, **Annual Review of Microbiology**, vol. 55, p. 453-483, 2001.
- SACKS, D., SHER, A., Evasion of innate immunity by parasitic protozoa, **Nature immunology**, vol. 3, p. 1041-1047, 2002.
- SANTA ROSA, I. C. A., OLIVEIRA, I. C. S., Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente, **Clinica Veterinária**, vol. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.
- SANTOS-GOMES, G. M., CAMPINO, L., ABRANCHES, P., Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes, (**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**), vol. 95, p. 193-198, 2000.
- SANTOS-GOMES, G. M., ROSA, R., LEANDRO, C., CORTES, S., ROMÃO, P., SILVEIRA, H., Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 88, p. 21–30, 2002.
- SAVANI, E. S. M. M. Aspectos da transmissão de leishmanioses no assentamento Guaicurus, Planalto da Bodoquera, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2002- 3. Infecção natural em animais domésticos e vetores. **Tese (doutorado)** - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo-SP; s.n., p. 177, 2004.
- SCAPINI, P., LAPINET-VERA, J. A., GASPERINI, S., CALZETTI, F., BAZZONI, F., CASSATELLA, M. A., The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunology Review, Journal of Clinical Investigation**, Verona, Itália, vol. 177, p. 195-203, 2000.
- SCHARTON, T. M., SCOTT, P., Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 178, n. 2, p. 567-577, 1993.
- SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission, **Parasitology Today**, vol. 9, p. 255-257, 1993.
- SHARMA, U., SINGH, S., Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control – review articles, **Journal of Vector Borne Diseases**, India, vol. 45, p. 255-272, 2008.
- SHERLOCK, I. A., MIRANDA, J. C., SADIGURSKY, M., GRIMALDI JUNIOR, G., Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil, (**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**), Rio de Janeiro, vol. 79, p. 511, 1984.
- SILVA, A. R. S. da, MACEDO, A. A., MOROZ, L. R., FERNANDES, R. R., RODIGHERIS, S. M., GOMES, A. A. D., Caso alóctone de leishmaniose visceral canina, no município de Campo Mourão, Paraná, Brasil, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, vol. 33, n. 2, p. 769-774 2012 .
- SILVA, A. V. M. DA, PAULA, A. A. DE, CABRERA, M. A. A., CARREIRA, J. C. A., Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos, **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, Brasil, vol. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

- SILVA, F. L., Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com *Leishmania chagasi* e soroconversão de cadelas acasaladas com cães portadores, **Tese (Doutorado em Ciência Animal)**, Belo Horizonte, 47 p., 2007.
- SILVA, F. L., OLIVEIRA, R. G., SILVA, T. M. A., XAVIER, M. N., NASCIMENTO, E. F., SANTOS, R., Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis, **Veterinary Parasitology**, Minas Gerais, Brazil, vol. 160, p. 55-59, 2009.
- SINGH, S., New developments in diagnosis of leishmaniasis, **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, India, vol. 123, n. 311, p. 311-330, 2006.
- SINGH, S., DEY, A., SIVAKUMAR, R., Applications of molecular methods for *Leishmania* control, **Expert Review of Molecular Diagnosis**, India, vol.5, n. 2, p. 251-265, 2005.
- SLAPPENDEL, R. J., FERRER, L., Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat, Philadelphia, **Saunders**, p. 450-458, 1990.
- SOUZA, A. I., JULIANO, R. S., GOMES, T. S., DINIZ, S. A., BORGES, A. M., TAFURI, W. L., SANTOS, R. L., Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog, **Veterinary Parasitology**, vol. 129, p. 51-54, 2005.
- STRAUSS AYALI, D., BANETH, G., JAFFE, C. L., Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis, **Veterinary Research**, vol. 38, p. 547-564, 2007.
- STUART, K., FEAGIN, J. J., Mitochondrial DNA of kinetoplastids, **International Review of Cytology**, vol. 141, p. 65-88, 1992.
- TAFURI, W. L., OLIVEIRA, M. R., MELO, M. N., TAFURI, W. L., Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil, **Veterinary Parasitology**, vol. 96, p. 203-212, 2001.
- TAFURI, W. L., SANTOS, R. L., ARANTES, R. M., GONÇALVES, R., DE MELO, M. N., MICHALICK, M. S., TAFURI, W. L., An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues, **Journal of Immunological Methods**, vol. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.
- TITUS, R. G., RIBEIRO, J. M., The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease, **Parasitology Today**, vol. 6, p. 157-160, 1990.
- TITUS, R. G., THEODOS, C. M., SHANKAR, A. H., HALL, L. R., Interactions between *Leishmania major* and macrophages, **Immunology Series**, Massachusetts, vol.60, p. 437-459, 1994.
- TRAVI, B. L., FERRO, C., CADENA, H., MONTOYA-LERMA, J., ADLER, G. H., Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas, **Research in Veterinary Science**, vol. 72, p. 83-86, 2002.
- TRINCHIERI, G., GEROSA, F., Immunoregulation by interleukin-12, **Journal of Leukocyte Biology**, Estados Unidos, vol. 59, n.4, p. 505-511, 1996.
- URBANO, M., PORTELA, F., PONTES, J. M., BARROSO, M., FERNANDES, G., CALHAU, C. A., GOUVEIA, H., LEITAO, M., FREITAS, D., Citologia de aspirados por agulha fina ecoendoscopicamente guiada na avaliação de massas pancreáticas suspeitas de malignidade, **Jornal Português de Gastroenterologia**, vol. 12, p. 17-21, 2005.
- URQUHART, G. M., ARMOUR, J., DUNCAN, J. L., DUNN, A. M., JENNINGS, F. W., **Parasitologia Veterinária**, 2ª Ed, Ed Guanabara Koogan, p. 190-192, 1996.

- VAN ZANDBERGEN, G., HERMANN, N., LAUFS, H., SOLBACH, W., LASKAY, T., *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes, **Infection and Immunity**, vol. 70, p. 4177-4184, 2002.
- VIADANNA, P. H. O., MEDEIROS, A. A., SZABÓ, M. J. P., MUNDIM, A. V., SOARES, N. P., LIMONGI, J. E., PAULA, M. B. C., Relationship Between Blood-borne Parameters and Gross Lesions in *Leishmania chagasi* Seroreagents Dogs, **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, vol. 4, n. 3, p. 207-213, 2011.
- VIDAL, I. F., MARTINS, I. V., LIRA, R. A., TEIXEIRA, M. N., FAUSTINO, M. A. G., ALVES, L. C., Níveis séricos da gama-glutamyltransferase em cães com e sem infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 749-751, 2009.
- VIÑUELAS, J., GARCIA-ALONSO, M., FERRANDO, L., NAVARRETE, I., MOLANO, I., MIRÓN, C., CARCELÉN, J., ALONSO, C., NIETO, C. G., Menigial leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs, **Veterinary Parasitology**, vol.101, p. 23-27, 2001.
- XAVIER, S.C., CHARELLI, I.M., LIMA, W.G., GONÇALVES, R., TAFURI, W.L., Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 58, p. 994-1000, 2006.
- XU, G., LIU, D., FAN, Y., YANG, X., KORNER, H., FU, Y, UZONNA, J. E., Lymphotoxin  $\alpha\beta 2$  (Membrane Lymphotoxin) Is Critically Important for Resistance to *Leishmania major* Infection in Mice, **Journal of Immunology**, Maryland, p. 5358-5366, 2007.
- YAO, C., CHEN, Y., SUDAN, B., DONELSON, J. E., WILSON, M. E., *Leishmania chagasi*: Homogenous metacyclic promastigotes isolated by buoyant density are highly virulent in a mouse model, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 118, p. 129-133, 2008.
- YOUNG, D., DUNCAN, M., Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae), **(Memoirs of the American Entomological Institute)**, vol. 54, 881 p., 1994.
- WALTERS, L. L., IRONS, K. P., CHAPLIN, G., TESH, R. B., Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), **Journal of Medical Entomology**, vol. 30, p. 699-718, 1993.
- WALTERS, L. L., MODI, G. B., CHAPLIN, G. L., TESH, Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States, vol. 41, I. 3, p. 295-317, 1989.
- WEBSTER, P., RUSSEL, D. G., The flageller pocket of trypanosomatids, **Parasitology Today**, Estados Unidos, vol. 9, n. 6, p. 201-205, 1993.
- WHO, Expert Committee of the Control of the Leishmaniasis. **World Health Organization Technical Report Series**, Suíça, vol. 793, 158p., 1990.
- WIJEYRATNE, P. M., JONES ARSENAULT, L. K., MURPHY, C. J., Endemic disease and development: The leishmaniasis, **Acta Tropica**, v. 56, p.349-364, 1994.
- ZILBERSTEIN, D., SHAPIRA, M., The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites, **Annual Review of Microbiology**, vol. 48, p. 449-470, 1994.
- ZULUETA, A. M., VILLARROEL, E., RODRIGUEZ, N., FELICIANGELI, M. D., MAZZARRI, M., REYES, O., RODRIGUEZ, V., CENTENO, M., BARRIOS, R. M., ULRICH, M., Epidemiologic

aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 61, p. 945-950, 1999.