

MAÍRA SANTOS SEVERO

**DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA POR
MEIO DE AMOSTRAS DE CONJUNTIVA OCULAR, HUMOR
AQUOSO, MEMBRANA SINOVIAL, LÍQUIDO SINOVIAL E
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO**

RECIFE-PE

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

MAÍRA SANTOS SEVERO

**DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA POR
MEIO DE AMOSTRAS DE CONJUNTIVA OCULAR, HUMOR
AQUOSO, MEMBRANA SINOVIAL, LÍQUIDO SINOVIAL E
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós- graduação em
Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida da Gloria Faustino

Co-orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE-PE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA POR
MEIO DE AMOSTRAS DE CONJUNTIVA OCULAR, HUMOR
AQUOSO, MEMBRANA SINOVIAL, LÍQUIDO SINOVIAL E
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO**

Tese de Doutorado elaborada por
MAÍRA SANTOS SEVERO

Aprovada em:...../...../.....

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Aparecida da Gloria Faustino
Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária

Prof. Dr. Leucio Camara Alves
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Jamile Prado dos Santos
CPCE - Universidade Federal do Piauí

Dra. Nair Silva Cavalcanti de Lira

Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos

"A Deus, pelas oportunidades na vida e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais, que me ajudaram a concluir esta etapa. À minha família, fonte de inspiração e do meu amor pela vida."

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por estar a todo instante comigo, mostrando o caminho certo a seguir. Obrigada por mais esta bênção, senhor!

A minha grande e amada mãe, pelos exemplos e inspiração, e pela incansável e imensurável dedicação. Sem seu amor e incentivo, hoje eu nada seria!

Ao meu amado pai, por sempre torcer pelo sucesso e vitória das filhas e pelos exemplos de força, trabalho e carinho.

A minha irmã Maiara, personificação da coragem e dedicação àquilo que faz. Sempre decidida, dá exemplos a todos à sua volta, do quanto o ser humano pode crescer e conquistar sonhos e objetivos. Orgulho imenso, eu tenho de você.

Ao meu noivo André, pelo amor, zelo, cumplicidade, e por me mostrar que "querer é conseguir". Obrigada pelo apoio, pela confiança e por caminhar ao meu lado me fazendo feliz.

À professora Maria Aparecida da Gloria Faustino, pela confiança em mim depositada ao me aceitar como sua orientada. Obrigada pela oportunidade de aprendizado e pelos exemplos de simplicidade, força, dedicação e carinho. Deus continue te abençoando....sempre!

Ao gigante professor Leucio Câmara Alves. Difícil encontrar palavras para agradecê-lo, não só pelo imenso apoio e disponibilidade, mas pelas lições de convivência, carinho e dedicação. Obrigada pelo incentivo, pela ajuda em tempo "record" e por me fazer acreditar que tudo daria certo. Levarei comigo, o exemplo de união entre trabalho e amor ao próximo. Sua equipe não é constituída apenas por estagiários e pós-graduandos, mas sim por uma família solidária e prestativa.

Agradeço especialmente aos amigos Vinícius, Marília e Neurisvan (Bodocó) pela disponibilidade e pela imensa e preciosa ajuda para que este trabalho pudesse ser concluído.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, pelo convívio, ajuda e carinho.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, em especial ao professor Marco Antônio Lemos de Oliveira, por me integrar ao Programa de Pós-Graduação ao me aceitar, inicialmente, como sua orientada.

Ao funcionário Tom, secretário da Pós-Graduação em Ciência Veterinária, por sempre estar disposto a me ajudar quando precisei.

Aos amigos Marcela e Duda pela convivência e ajuda durante minha permanência em Recife para a execução deste trabalho.

Aos amigos professores Eduardo Caldas, Moacir Bezerra, Luciana Franco e Rita de Cássia, pelos momentos de descontração no decorrer desta jornada.

À minha querida cadela Malu, pelo amor desmedido e único, e pelos sorrisos e alegrias que me proporciona todos os dias ao chegar em casa, mesmo após uma rotina de trabalho e preocupações.

A todos os animais utilizados nos meus experimentos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado. Ofereço meu respeito e sinceros agradecimentos.

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina. O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher. O saber se aprende com os mestres. A sabedoria, só com o corriqueiro da vida”.

Cora Coralina

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose sistêmica grave, causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Leishmania infantum*. Os cães são considerados os principais reservatórios da doença e podem desenvolver desde a infecção assintomática, a uma variedade de sinais clínicos, tais como linfadenopatia periférica, perda de peso, letargia, lesões ulcerativas de pele e febre. Alterações oculares, ortopédicas e neurológicas também podem ser observadas associadas à LVC, tais como ceratoconjuntivite, uveíte, convulsões, alterações comportamentais, artralgia e claudicação. Tal fato inclui a doença no diagnóstico diferencial das afecções oftálmicas, osteoarticulares e neurológicas, principalmente em áreas consideradas endêmicas para a infecção. O objetivo deste trabalho foi realizar o diagnóstico da leishmaniose visceral canina utilizando amostras de conjuntiva, humor aquoso, líquido sinovial, membrana sinovial e líquido cefalorraquidiano (LCR). O teste ELISA foi aplicado em amostras de LCR, líquido sinovial e humor aquoso; e avaliações histológica e imunohistoquímica foram realizadas na conjuntiva e na membrana sinovial. As amostras foram coletadas de 20 cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral. Através do Ensaio Imunoenzimático foi possível detectar anticorpos IgG anti-*Leishmania* em uma das amostras de LCR e de humor aquoso, e em seis amostras de líquido sinovial. A imunohistoquímica apresentou marcação positiva de formas amastigotas de *L. infantum* em cinco membranas sinoviais e cinco conjuntivas estudadas. Diante dos resultados, conclui-se que formas amastigotas de *Leishmania sp.* são encontradas parasitando a membrana sinovial e a conjuntiva de cães sorologicamente positivos para a doença, bem como anticorpos IgG específicos no humor aquoso, no LCR e no líquido sinovial desses animais.

Palavras-chave: *Leishmania sp.*, cães, humor aquoso, LCR, líquido sinovial.

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a severe systemic zoonosis caused by the obligate intracellular protozoan *Leishmania infantum*. The dogs are the major reservoir of the disease and may develop since asymptomatic infection to a variety of clinical signs, such as peripheral lymphadenopathy, weight loss, lethargy, ulcerative lesions of the skin and fever. Ocular, orthopedic and neurological disorders can also be seen associated with CVL, such as keratitis, seizures, behavioral changes, joint pain and lameness. This fact includes the disease in the differential diagnosis of ophthalmic disorders, osteoarticular and nervous system, especially in endemic areas to infection. The aim of this study was the diagnosis of canine visceral leishmaniasis using samples of conjunctiva, aqueous humor, synovial fluid, synovial membrane and cerebrospinal fluid (CSF). The ELISA test was applied to samples of CSF, synovial fluid and aqueous humor, and histological and immunohistochemical evaluations were performed in the conjunctiva and in the synovial membrane of these animals. The samples were collected from 20 dogs serologically positive for visceral leishmaniasis. Through the immunoenzymatic assay could detect anti-*Leishmania* IgG antibodies in a sample of CSF and aqueous humor, and six samples of synovial fluid. Immunohistochemistry showed positive staining of amastigotes of *L. infantum* five synovial membranes and connective five studied. From the results, we conclude that amastigotes of *Leishmania* sp. are found parasitizing the synovial membrane and the conjunctiva of dogs serologically positive for the disease, as well as specific IgG antibodies in aqueous humor, CSF and synovial fluid of these animals

Key words: *Leishmania* sp., dogs, aqueous humor, cerebrospinal fluid, synovial fluid.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Histórico.....	12
2.2. Epidemiologia.....	13
2.3. Agente etiológico, vetores e transmissão.....	13
2.4. Hospedeiros vertebrados susceptíveis.....	14
2.5. Ciclo biológico.....	15
2.6. Leishmaniose Visceral Canina.....	15
2.7. Resposta imune na leishmaniose visceral canina.....	16
2.8. Manifestações clínicas.....	18
2.9. Diagnóstico.....	19
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
 CAPÍTULO I - Estudo imunohistoquímico e histológico da membrana sinovial de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>.....	
	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
1. Introdução.....	39
2. Material e métodos.....	40
3. Resultados e discussão.....	41
4. Conclusão.....	43
5. Referências bibliográficas.....	44
 CAPÍTULO II – Detecção de anticorpos IgG anti-L. Infantum no humor aquoso e líquido sinovial de cães com infecção natural.....	
	50
RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	52
1. Introdução.....	53
2. Material e métodos.....	53
3. Resultados e discussão.....	54
4. Conclusão.....	56

5. Referências bibliográficas.....	57
CAPÍTULO III – Alteração estrutural e do parasitismo da conjuntiva de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>.....	61
ABSTRACT.....	62
RESUMO.....	63
1. Introdução.....	64
2. Material e métodos.....	64
3. Resultados e discussão.....	65
4. Conclusão.....	66
5. Referências bibliográficas.....	67
CAPÍTULO IV – Detecção de anticorpos IgG anti-<i>Leishmania</i> no líquido cefalorraquidiano de cães com infecção natural.....	71
RESUMO.....	72
ABSTRACT.....	73
1. Introdução.....	74
2. Material e métodos.....	74
3. Resultados e discussão.....	75
4. Conclusão.....	76
5. Referências bibliográficas.....	77
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	79

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a Leishmaniose Visceral (LV) encontra-se urbanizada (GONTIJO e MELO, 2004; COSTA, 2008), apresentando diferentes perfis epidemiológicos na dependência da presença do vetor, e dos reservatórios silvestres e domésticos (LAINSON e RANGEL, 2005; MARCONDES et al., 2011).

A doença tem como agente causal o protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (MAURICIO et al., 2000), o qual se encontra inserido no complexo *Leishmania donovani* (ASHFORD, 2000; FEITOSA, 2006), sendo transmitido para os hospedeiros susceptíveis por insetos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, por ocasião do repasto sanguíneo (NOLI, 1999).

Contudo, alguns fatores epidemiológicos têm sido apontados como fatores preponderantes na ocorrência da LV no Brasil, particularmente aqueles relacionados com alterações geográficas tais como desmatamento e o crescimento desordenado das cidades (COSTA, 2008), nas quais as ações antrópicas favorecem a destruição de ecótopos silvestres, contribuindo para a migração de vetores e animais sinantrópicos infectados para o peri e intradomicílio (LAINSON e RANGEL, 2005).

Neste sentido, várias espécies de mamíferos têm sido encontradas naturalmente infectadas por *L. infantum*, particularmente os canídeos silvestres (VIANNA, 2001) e marsupiais (VAN WYNSBERGHE et al., 2009), que constituem um importante elo na cadeia epidemiológica na interface dos ciclos silvestres e urbanos da LV no Brasil (LAINSON e RANGEL, 2005). Não obstante, os canídeos domésticos têm sido apontados como o principal reservatório urbano da infecção (SILVA et al., 2005; QUINNELL e COURTENAY, 2009).

A semelhança da LV, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem sido detectada em vários estados do Brasil com diferentes taxas de prevalência (NUNES et al., 2001; DANTAS-TORRES, 2006; CAMARGO et al., 2007), notadamente na região nordeste (MONTEIRO et al., 1994).

Considerada uma infecção crônica e muitas vezes fatal com sintomatologia variada (FERRER, 2002a), a LVC é caracterizada por emagrecimento progressivo (KOUTINAS et al., 1992), onicogribose (CIARAMELLA et al., 1997), oftalmopatias (BRITO et al., 2006) hepatoesplenomegalia (REIS et al., 2006), além de sinais inespecíficos como febre e anemia (BLAVIER et al., 2001; REIS et al., 2006). Em função da atividade exagerada de linfócitos B,

ocorre formação de imunocomplexos (GOTO e LINDOSO, 2004; ALVES e FAUSTINO, 2005), que se depositam nas paredes de vasos sanguíneos e órgãos (NOLI, 1999), favorecendo o desenvolvimento de vasculites, uveítes (GARCIA-ALONSO et al., 1996), poliartrites (SLAPPENDEL e FERRER, 1990; McCONKEY et al., 2002), glomerulonefrites (NIETO et al., 1992) e meningites (VIÑUELAS et al., 2001).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi a avaliar a presença de anticorpos IgG anti- *L. infantum* no humor aquoso, líquido sinovial e líquido cefalorraquidiano, além da detecção de formas amastigotas na conjuntiva ocular e membrana sinovial de cães com infecção natural por *L. infantum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

A leishmaniose visceral (LV) foi descrita, primeiramente, na Grécia em 1835, sendo denominada “ponos” ou “hapoplinakon”. Somente em 1869, na Índia, recebeu o nome “kala-jwar” que significa febre negra ou “kala-azar” que significa pele negra, em virtude do discreto aumento da pigmentação cutânea ocorrido durante a doença (MARZOCHI et al., 1981).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em 1934, por Penna, que encontrou formas amastigotas de *Leishmania sp.* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela (BADARÓ e DUARTE, 1996; REY, 2001; BRASIL, 2006).

Por outro lado a descoberta da Leishmaniose Visceral Canina aconteceu na Tunísia por Nicolle e Comte em 1908, demonstrando o papel dos cães como reservatórios da doença. Em 1920, no Mediterrâneo, Adler e Theodore descreveram com detalhes a correlação e similaridade da doença em humanos e cães. Somente em 1924, foi esclarecida a transmissão da *Leishmania donovani* ao homem pela picada do *Phlebotomum argentipes*, fechando assim o ciclo de transmissão (NICOLE, 1908; ASHFORD et al., 1998; REY, 2001).

2.2. EPIDEMIOLOGIA

A Leishmaniose Visceral (LV) apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo, podendo apresentar-se como zoonose, antroponose ou antroponose, estas duas últimas, quando o homem atua como reservatório no ciclo de transmissão do parasito (MONTEIRO et al., 2005).

A doença, causada pela *Leishmania infantum/chagasi*, acomete tanto humanos quanto uma variedade de animais domésticos e selvagens em áreas endêmicas da bacia Mediterrânea, Ásia, e América (KUHLS et al., 2008; CARRILO & MORENO, 2009), acometendo mais de 350 milhões de pessoas em diversos países (DIAS et al., 2011; HOSSAIN & JAMIL, 2011).

O Brasil enfrenta a expansão e urbanização da Leishmaniose Visceral, em decorrência de alterações ambientais antropogênicas e da rápida e intensa migração de populações rurais às periferias urbanas (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; LAURENTI, 2009; COLOMBO et al., 2011). A falta de saneamento e infra-estrutura adequados, associada à simultânea interação e mobilização de reservatórios silvestres e cães infectados, acarretaram no aumento do número de casos humanos e um elevado número de cães positivos em várias estados do país (GONTIJO & MELO, 2004).

A doença é considerada endêmica em 21 estados, destacando-se aqueles da região Nordeste, responsáveis por 50% dos casos anuais do país (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; AGUIAR, et al., 2007), sendo os estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí os mais acometidos (MENDES et al., 2002; COSTA, 2008; ALBUQUERQUE et al., 2009). Em cidades como Santarém (PA), São Luiz (MA), Teresina (PI), Natal (RN), Aracaju (SE) e Corumbá (MS), verdadeiras epidemias têm sido observadas (LAURENTI, 2009). Aproximadamente 10% da população que vive em áreas endêmicas apresentam risco de contrair a doença (CVE, 2010; COLOMBO et al. 2011).

2.3. AGENTE ETIOLÓGICO, VETORES E TRANSMISSÃO

A LV é causada por um protozoário heteroxênico, intracelular obrigatório, da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* (LIMA et al, 2010; COLOMBO et al., 2011), espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (MAURICIO et al., 2000), a qual se encontra inserida no complexo *Leishmania donovani* (ASHFORD, 2000;

FEITOSA, 2001), sendo transmitida para os hospedeiros susceptíveis por insetos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, por ocasião do repasto sanguíneo (NOLI, 1999).

A ausência de flebotomíneos em determinadas áreas onde a LV é enzoótica (TORRES et al., 2010) e o baixo grau de infecção da *L. longipalpis* pela *L. infantum* ($\leq 0,5\%$) (MONTROYA-LERMA, et al., 2003) sugere a existência de outras formas de transmissão da doença (DANTAS-TORRES, 2006; PAZ et al., 2010). Meios alternativos de transmissão incluem transfusão sanguínea (FREITAS et al., 2006; SHAW, 2007), via transplacentária (ROSYPAL et al., 2005; SILVA et al., 2009; SPADA et al., 2011), mordedura de cães, ingestão de vísceras contaminadas, coito (SILVA et al., 2009) ou picada de outros artrópodes, tais como pulgas e carrapatos (McKENZIE, 1984; COUTINHO e LINARDI, 2007; COUTINHO et al.; 2011).

2.4. HOSPEDEIROS VERTEBRADOS SUSCEPTÍVEIS

Existe uma variedade de hospedeiros vertebrados susceptíveis a infecção por *Leishmania infantum*, sendo denominados hospedeiros reservatórios aqueles que constituem uma fonte de infecção para o homem, permitindo a multiplicação ilimitada do parasita, podendo existir ainda hospedeiros considerados acidentais (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006).

Várias espécies de mamíferos têm sido encontradas naturalmente infectadas por *L. infantum*, particularmente os canídeos silvestres (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) (VIANNA, 2001) e marsupiais (*Didelphis marsupialis*), que constituem um importante elo na cadeia epidemiológica na interface dos ciclos silvestres e urbanos da LV no Brasil (LAINSON e RANGEL, 2005). Não obstante, áreas com criação de animais domésticos, (BORASCHI e NUNES, 2007), particularmente os cães (COSTA et al., 1990), resquício de vegetação primária e baixos índices de saneamento básico, associado ao acúmulo de resíduos sólidos nas cidades favorecem a domiciliação das espécies vetoras da LV (MISSAWA e LIMA, 2005).

Nestas condições os canídeos domésticos são apontados como os mais importantes reservatórios urbanos da infecção (DEANE e DEANE, 1955; SILVA et al., 2005; VERÇOSA et al., 2008) com taxas de prevalência da doença variando de 1,9 a 35 % (FRANÇA-SILVA et al., 2003), representando importante função Na manutenção do ciclo de transmissão do parasita ao homem (CARRILO e MORENO, 2009; QUEIROZ et al., 2009).

Os hospedeiros acidentais de *Leishmania* incluem o urso, o porco-espinho, o guaxinim, o esquilo, o rato-negro, a vaca, a ovelha e a cabra (ROZE, 2005), além os gatos domésticos (POLI et al., 2002; SIMÕES-MATOS et al, 2005;) e eqüinos (ROLÃO et al., 2005; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006).

2.5. CICLO BIOLÓGICO

A *Leishmania* é um parasita difásico, com ciclo de vida heteroxeno, ou seja, que se completa em dois hospedeiros: o flebotomíneo vetor, que abriga o parasita na forma promastigota extracelular flagelada; e o hospedeiro mamífero, onde a forma amastigota intracelular se desenvolve (TOMÁS e ROMÃO, 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

A forma primária de transmissão do parasita ocorre através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas (DANTAS-TORRES, 2009). A infecção do vetor ocorre quando o inseto realiza uma refeição sanguínea e ingere macrófagos com as formas amastigotas de *Leishmania*, que se transformam em promastigotas, multiplicam-se, e diferenciam-se no intestino do inseto. O ciclo de vida é completado, aproximadamente uma semana após, quando a forma infectante, promastigota metacíclica, migra para a probóscide e são inoculadas na pele do hospedeiro, no próximo repasto sanguíneo (PEARSON e SOUSA, 1996). A saliva do inseto *Lutzomyia longipalpis* possui um potente peptídeo vasodilatador, denominado maxadilan, que é liberado na pele do hospedeiro, quando o inseto realiza o repasto sanguíneo (LERNER et al., 1991, LERNER e SHOEMAKER, 1992).

2.6 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Do ponto de vista epidemiológico, a infecção canina é mais importante que a infecção no homem, pois a precede, além de ser mais prevalente e apresentar grande contingente de animais assintomáticos que albergam parasitos na derme (BONATES, 2003).

No cão a infecção por *L. infantum* é considerada uma enfermidade crônica, presente em vários continentes (TRAVI et al., 2002, LIMA et al., 2003, CARDOSO et al., 2007), representando um grande problema de saúde pública, particularmente pela a presença de animais assintomáticos (COSTA, 2008).

Dependendo da resposta imune do animal, o período de incubação ou pré-patente em animais naturalmente infectados pode variar de três meses a sete anos, levando a diferentes apresentações clínicas da doença (SLAPPENDEL e FERRER 1990; GENARO, 1993).

2.7 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O desenvolvimento da infecção por *Leishmania infantum* depende de vários fatores relacionados tanto a espécie do parasita, quanto à genética e status imunológico do hospedeiro (MARCONDES et al., 2011). Dentre estes fatores, destacam-se a carga parasitária, a resposta imune celular e humoral do hospedeiro, o subpopulações de células e a ação de inúmeras citocinas produzidas. A atividade destes fatores no organismo de cada indivíduo e as relações existentes entre eles resultam no aparecimento da doença com formas clínicas variadas (VANLOUBBEECK e JONES, 2004; AWASTHI et al., 2004; REIS et al., 2010; MARCONDES et al., 2011).

Logo após a inoculação do parasito na pele, ocorre uma resposta inflamatória local, sendo inicialmente encontrados neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células “natural killer” (NK) e posteriormente linfócitos (DAY, 1999). As células NK desempenham papel fundamental na resistência da infecção pelo hospedeiro, pois ainda na pele, produzem rapidamente interferon gama (IFN- γ) e interleucina (IL-12), importantes indutores da produção de óxido nítrico pelos macrófagos. A produção de óxido nítrico e superóxido são os mecanismos mais eficientes de destruição do parasita (BELKAID, 2001; CASTELLANO, 2005; BARBIÉRI, 2006; EL-ON, 2009).

O estabelecimento de uma resposta imune efetiva ou não, exige também antígenos apropriados presentes nas células, a indução e a proliferação de células T e a ativação de macrófagos eficientes no controle da infecção (BELKAID, 2001). Os macrófagos (células fagocíticas) têm o importante papel de apresentar a *Leishmania* sp ao organismo, quando as formas promastigotas ligam-se a receptores específicos e são internalizadas por fagócitos em um processo crucial para o estabelecimento da infecção no hospedeiro (DUNNING, 2009). Tais formas transformam-se em amastigotas e se multiplicam no interior dos macrófagos, provocando sua ruptura. Tanto parasitas intactos, quanto frações antigênicas destes são então capturados por células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e de Langerhans) que

os transferem para células T específicas (CD4+ e CD8+) (AWASTHI et al., 2004; EL-ON, 2009).

As subpopulações de células T que expressam a molécula de CD4 (células T auxiliares: T helper = Th) podem ser subdivididas em linhagens Th1 e Th2, e são distinguíveis pelas citocinas produzidas e pelos efeitos imunológicos que elas comandam (DAY, 1999; NOLI, 1999; PINELLI et al., 1999; BELKAID, 2001).

As células Th1 produzem principalmente as interleucinas 2 (IL-2) e 12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- γ (IFN- γ) que podem iniciar a imunidade celular mediada e citotoxicidade, induzindo a ativação de macrófagos e a resposta mediada por células (AWASTHI et al., 2004; EL-ON, 2009; REIS et al., 2010; SELVAPANDIYAN et al., 2012), associada à resistência (SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002; de FREITAS et al., 2012).

Já as células Th2 mediam a imunidade humoral, através da produção predominante das interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13, e apresentam comportamento antagonista às células Th1, fornecendo maior ajuda à resposta mediada por anticorpos (COFFMAN et al., 1988; BACELLAR et al., 2000), associada à susceptibilidade e manifestações clínicas severas (SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002; de FREITAS et al., 2012).

O tipo de resposta imune produzida (Th1 ou Th2) é determinado principalmente pelas citocinas produzidas após o encontro dos macrófagos com o antígeno (DAY, 1999; NOLI, 1999; PINELLI et al., 1999; BELKAID, 2001). De acordo com Ferrer (2002b) a citocina IL-4 é a mais importante a este respeito, pois ela regula a produção da IL-12, e esta influencia na atuação das células NK.

A infecção por *Leishmania* sp também acarreta na produção de anticorpos anti-*Leishmania* do tipo IgG. Alguns autores utilizam as subclasses IgG1 e IgG2 como indicador do status imunológico do hospedeiro infectado, correlacionando diretamente os elevados níveis de anticorpos IgG1 à doença com sintomatologia clínica; e a presença de anticorpos da subclasse IgG2 à doença assintomática (NIETO et al., 1999; BARBIÉRI, 2006).

2.8 SINAIS CLÍNICOS

A LVC caracteriza-se pela grande variedade de sinais clínicos, relacionados basicamente a fatores individuais associados ao tipo de resposta imunológica desenvolvida, grau de infecção, tempo de evolução da doença e órgãos acometidos (EZQUERRA, 2001; MARCONDES *et al.*, 2011). De acordo com os sinais clínicos observados, os animais podem ser classificados em assintomáticos ou sintomáticos (BLAVIER *et al.*, 2001) sendo que os assintomáticos representam importante papel como reservatório da doença (BARBIÉRI, 2006).

Classicamente, os animais com LVC apresentam sinais inespecíficos, como linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia (CIARAMELLA *et al.*, 1997; FERRER, 1999; LIMA *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2004; LANGONI *et al.*, 2005; LINHARES *et al.*, 2005; PIMENTEL *et al.*, 2008), alterações dermatológicas (BLAVIER *et al.*, 2001; FEITOSA, 2001; CIARAMELLA e CORONA, 2003; FEITOSA, 2006; FIGUEIREDO, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2011), onicogribose e emagrecimento (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; STRAUSS e BANETH, 2001; PAIVA-CALVACANTE *et al.*, 2005). Outros sinais como febre irregular, apatia (SLAPPENDEL, 1988), diarreia (BLAVIER *et al.*, 2001; CIARAMELLA e CORONA, 2003; SILVA *et al.*, 2005; LUVIZOTTO, 2006), lesões oculares (GARCIA-ALONSO *et al.*, 1996; CIARAMELLA e CORONA, 2003; FULGÊNCIO *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2006; EUGÊNIO *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2010), epistaxe (MORENO *et al.*, 1998; LUNA *et al.*, 2000) e anemia (KOUTINAS *et al.*, 1999) têm sido descritos.

Quadros atípicos da doença, com manifestações osteoarticulares, têm sido relatados (FEITOSA *et al.*, 2000; FEITOSA, 2001; BLAVIER *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2005; RIBEIRO, 2005; FEITOSA, 2006). Anormalidades na locomoção, aumento de volume articular e dor à palpação de uma ou mais articulações podem ser observadas (BLAVIER *et al.*, 2001; McCONKEY *et al.*, 2002) e normalmente estão associadas ao desenvolvimento de poliartrites (AGUT *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2012). Geralmente as poliartrites não são erosivas e podem ou não estar associadas a sinovites, com presença de aumento de volume articular acompanhada de artralgia e, ocasionalmente, atrofia muscular (BLAVIER *et al.*, 2001; AGUT *et al.*, 2003).

Manifestações clínicas relacionadas ao sistema nervoso central são consideradas raras na LVC. Entretanto, podem ser observados quadros de alteração comportamental, convulsões, sinais clínicos sugestivos de meningite ou lesões compressivas, além de vasculites e hemorragias espinhais (VIÑUELAS *et al.*, 2001; FONT *et al.*, 2004; GUTTADAURO, 2004;

CAUDURO et al., 2011). A inflamação granulomatosa decorrente da presença do parasita, a vasculite e o depósito de imuno-complexos nas meninges têm sido associados ao desenvolvimento dos sintomas (SARIDOMICHELAKIS, 2009).

2.9 DIAGNÓSTICO

Atualmente, diversas metodologias estão disponíveis para o diagnóstico da LVC. O diagnóstico laboratorial pode ser feito pelo exame parasitológico direto, por meio de testes imunológicos, como imunofluorescência indireta (RIFI) ou ensaios imunoenzimáticos (ELISA), por método de imunohistoquímica e, mais recentemente, através de métodos moleculares de amplificação do ácido nucléico (PCR e PCR-Real Time) (MOREIRA et al., 2007; QUEIROZ et al., 2010; SOLCÁ et al., 2012).

O diagnóstico parasitológico baseia-se na identificação microscópica direta de formas amastigotas do protozoário em esfregaços de aspirado de linfonodos, medula óssea, baço e fígado (FEITOSA, 2001; MOREIRA et al., 2007; MARCONDES et al., 2011). Apesar da presença de uma única forma amastigota ser confirmatória para o diagnóstico da LVC, esta técnica tem a sensibilidade de apenas 50%, nos aspirados de medula óssea, e 30%, nos aspirados obtidos de linfonodos (FERRER, 1999), além de ser um método invasivo, com probabilidade de riscos para o animal (SUNDAR e RAI, 2002).

A imunohistoquímica combina técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, e consiste na detecção de antígenos “*in situ*” por meio da utilização de um anticorpo policlonal ou monoclonal primário e específico, e de um sistema de enzima e substrato cromógeno que se deposita no local da reação antígeno-anticorpo, possibilitando sua visualização. Na LVC, o diagnóstico depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e tamanho compatíveis com formas amastigotas (RAMOS-VARA, 2005).

Os métodos imunológicos são úteis para a triagem de casos, particularmente em inquéritos epidemiológicos (REY, 2001). Os testes mais largamente utilizados são a RIFI, o ELISA, o teste de aglutinação indireta (DAT) e o Western blotting (GRIMALDI et al., 2012), sendo a RIFI e o ELISA (BRASIL, 2006; MARCONDES et al., 2011), as técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários.

A RIFI é amplamente utilizada no diagnóstico da LVC, apresentando elevadas taxas de sensibilidade, mesmo quando se utilizam como antígeno outras espécies de *Leishmania*, tais como *L. Mexicana* e *L. Braziliensis* (COSTA, 2004). No entanto, pode haver resultados falso positivos em alguns cães saudáveis resistentes que entraram previamente em contato com o parasito, além de resultados falso negativos em cães afetados que não produziram anticorpos (fase pré-patente) (FEITOSA, 2001). A especificidade deste teste torna-se prejudicada pela presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, como o da doença de Chagas e os da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (COSTA e VIEIRA, 2001; ALVES e BEVILACQUA, 2004).

O teste ELISA é um método clássico utilizado na detecção de anticorpos para *Leishmania* não apresentando limitações quanto à necessidade de condições laboratoriais e técnicas específicas. O diagnóstico baseado neste teste permite o uso de um grande número de amostras, com altos níveis de sensibilidade e especificidade, a depender do antígeno utilizado. Antígenos solúveis derivados a partir da fase promastigota de espécies diferentes de *Leishmania* são os mais comumente usados no diagnóstico da LVC, apresentando sensibilidade e especificidade de 80 para 100% e 85 a 95%, respectivamente (LAURENTI et al., 2009; SANTARÉM et al., 2010; MARCONDES et al., 2011). Extratos totais do parasita têm sido descritas como sensíveis para a detecção de infecções clínicas e subclínicas em cães, demonstrando entretanto baixa especificidade (SOUSA et al., 2011). Objetivando ampliar a especificidade no diagnóstico da LVC, alguns antígenos recombinantes purificados de *Leishmania* têm sido propostos, tais como a proteína rHSP70, a LicTXNPx e a rK39 (SILVESTRE et al., 2008; SANTARÉM et al., 2010; de SOUZA et al., 2012).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método molecular que permite a amplificação do DNA do parasito. A extração do DNA pode ser realizada a partir de amostras de tecidos do paciente, incluindo sangue, aspirado de medula óssea, linfonodo, baço, fígado, além de biópsias cutâneas. A sensibilidade e especificidade atingem patamares próximos a 100% (FERRER, 1999; LUVIZOTTO, 2005).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, P.H.P. et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 8, n. 4, p. 283-294, 2007.

AGUT, A. et al. Clinical and radiografic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Veterinary Record*, v. 153, p. 648-652, 2003.

ALBUQUERQUE, et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Revista Panamericana de Salud Publica*, v. 26, n. 4, p. 330-333, 2009.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belom Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Caderno de Saúde Pública*, v. 20, n. 01, p. 259-265, 2004.

ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose visceral canina. *Manual da Schering-Plough*, 2005, 14 p.

ASHFORD, D. A. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal of Medice and Hygiene*, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal of Parasitology*, v.30, n.12-13, p.1269-1281, 2000.

AWASTHI, A et al. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*, v. 119, p. 238-258, 2004.

BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*, v.12, p.1228-1231, 2000.

BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESE, R.; FOCACCI, R. *Tratado de Infectologia*, v. 2. São Paulo: Atheneu, 1996, p.1234-1259.

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

BELKAID, Y. et al. The role of Interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *Journal of Experimental Medicine*, v.194, n.10, p.1497–1506, 2001.

BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, v. 162, p. 108–120, 2001.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). *Veterinary News*, ano 10, n. 61, p. 04-05, 2003.

BORASCHI, C.S.S.; NUNES, C.M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. *Revista Clínica Veterinária*, v. 71, n. 1, p. 44-48, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRITO, F. L. C. et al. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina – revisão. *Clínica Veterinária*, n. 64, p. 68-74, 2006.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; ORTIZ, J. P. D.; et al. Uveitis associated by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda City, Pernambuco, Brazil. *Ciência Rural*, v.34, p. 925-929, 2004.

CAMARGO, J. B. et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle, Brasil. *Clínica Veterinária*, n. 7, p. 86-92, 2007

CARDOSO, L. et al. Anti-*Leishmania* humoral and cellular response in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Immunopathology*, v.117, p. 35-41, 2007.

CARRILO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, p. 67-70, 2009.

CASTELLANO, L. R. C. Resposta immune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. *VITAE – Academia Biomédica Digital*, n. 5, p. 01-08, 2005.

CAUDURO, A. et al. Paraparesis caused by vertebral canal leishmaniotic granuloma in a dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 25, p.398–399, 2011.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinaria*, v. 25, n. 5, p. 358-368, 2003.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, n.141, p.539-543, 1997.

COFFMAN, R. L. et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunology Revista*, v.102, p.5-28, 1988.

COLOMBO, F.A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research* (2011). doi: 10.1007/s00436-010-2247-6

COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, n.12, p. 2959- 2963, 2008.

COSTA, C.H.N. et al. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Revista de Saúde Pública*, v. 24, p. 361-371, 1990.

COSTA, C.H.N. et al. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.34, p. 223-228, 2001.

COSTA, K. G. N. Identificação de casos de leishmaniose visceral canina através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em Maceió – Alagoas. 2004. 22p. *Monografia* (Graduação em Farmácia). Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2004.

COUTINHO, C.E.R. et al. Evaluation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* strain isolated from dogs originating from two visceral leishmaniasis-endemic areas in Brazil using multilocus enzyme electrophoresis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 5, p. 572-575, 2011.

COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v.128, n.1-2, 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*, v. 147, p. 320-325, 2007.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (2010). Site: <http://www.cve.saude.sp.gov.br> Acesso em: 05 out 2011

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, v. 2, n. 1, p. S1, 2009

DANTAS-TORRES, F. Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*. v. 40, p. 537-541, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral do Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n.4, p. 352-356, 2006.

DAY, M. J. Clinical immunology of the dog and cat. London: Manson Publishing / *The Veterinary Press*, p.288, 1999.

DE FREITAS, J. C. C. et al. Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical Picture in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* (2012), doi: 10.1016/j.rvsc.2011.12.009

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex ventulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. *O Hospital*, v. 48, p. 61-76, 1955.

DUNNING, N. *Leishmania* vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. *Bioscience Horizons*, v. 2, n. 1, p. 73-82, 2009.

EL-ON, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *Israel Medical Association Journal*, v. 11, p. 623-628, 2009.

EUGÊNIO, F. R. et al. Lesões macro e microscópicas da terceira pálpebra causadas por *Leishmania* spp. In: I FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal, *Anais...* Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 49.

EZQUERRA, L. P. A. Las leishmaniasis: La biología al control. Philadelphia: W.B. Saunders. (2ª Ed) 2001. Cap. 6, p. 157-159.

FEITOSA, M. M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1, 2006, Jaboticabal. *Anais...*Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006, p. 9 - 14.

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. *Revista Intervet Pet*, p.1-15, 2001.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária*, n.28, p.36-44, 2000.

FERNANDÉZ-BOLLON, H. et al. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Veterinary Parasitology*, v. 135, n. 02, p. 181-185, 2006.

FERRER, L. Canine leishmaniosis: *Evaluation of the Immunocompromised Patient*. Barcelona, Spain. In: WSAVA Congress Chooses, Granada, 2002a. Disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=PR0265>. Acesso em: 22 de agosto de 2011.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona. *Proceedings...* Barcelona, 1999. p. 6-10. 1999.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: Proceedings of Second International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Salamanca: Intervet International, 2002b. p. 21-24.

FIGUEIREDO, M.M. Análise histológica, parasitológica e morfométrica da pele da orelha sã de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2009, 101f. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FONT, A. et al. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, v. 45, p. 199-201, 2004.

FRANÇA-SILVA, J.C. 2003. Distribuição espacial e temporal da Leishmaniose Visceral Canina em relação à densidade vetorial e ao controle de cães infectados em Porteirinha - Minas Gerais (1998-2002), PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FREITAS, E. et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, v. 137, p. 159-167, 2006.

FULGÊNCIO, G. O. et al. Uveíte em cinco cães, naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, atendidos em Belo Horizonte – MG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v.13, suplemento I, p. 235, 2004.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Presence of antibodies in the aqueous humor and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunology*, v. 18, p. 539-546, 1996.

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. 1993. 202p. Tese (Doutorado em parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, n.4, p.615-623, 2004.

GRIMALDI JR, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 106, p. 54-59, 2012.

GUTTADAURO, S. Intracranial granuloma in a leishmaniasis-affected dog. In: Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis. Naples, Italy, *Societa Culturale Italiana Veterinari per Animali de Compagnia*, p. 84, 2004.

HOSSAIN, M.; JAMIL, K. M. Geographical Distribution of Kala-Azar in South Asia. *Kala Azar in South Asia*, v. 1, p. 3-9, 2011

KOUTINAS, A. F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 35, p. 376-383, 1999.

KUHLS, K. et al. Differentiation and Gene Flow among European Populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS- Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 7, p. 1-18, 2008.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of american visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n.8, p. 811-827, 2005.

LANGONI, H. et al. American visceral leishmaniasis: a case report. *The Journal of Venomous animals and toxins including tropical diseases*, v. 11, p. 361-372, 2005.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.

LEITE, R. S. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology*, v. 170, p. 201–206, 2010.

LERNER, E. A. et al. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 17, p. 11234-11236, 1991.

LERNER, E. A.; SHOEMAKER, C. B. Maxadilan: cloning and functional expression of the gene encoding thipotent vasodilator peptide. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 2, p.1062- 1066, 1992.

LIMA, V. M. F. et al. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rk39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 173, p. 330-333, 2010.

LIMA, V. M. F. et al. Anti-*leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 485-489, 2003.

LIMA, W. G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*, v. 92, p. 43-53, 2004.

LINHARES, G. F. C. et al. Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. *Revista de Patologia Tropical*, v. 34, p. 69-72, 2005.

LUNA, R. et al. Decreased lipid fluidity on the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. *Journal of Comparative Pathology*, v. 122, p. 213-216, 2000.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: I Fórum sobre leishmaniose visceral canina, 2006, Jaboticabal, *Anais...Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 2006. p. 15 – 22.

LUVIZOTTO, M. C. R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. In: ___ *Leishmune Manual Técnico Leishmaniose Visceral*, Fort Dodge, seção 3, p. 28-29, 2005.

MAIA-ELKHOURY, A. N. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Caderno de Saúde Pública*, v. 24, p. 2941–2947, 2008.

MARCONDES, M. et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 175, p. 15-19, 2011.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose Visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.

MAURICIO, I. L. et al. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

McCONKEY, S. E. et al. Leishmanial polyarthritis in a dog. *Canadian Veterinary Journal*, v. 43, p. 607-609, 2002.

McKENZIE, K. K. A study of the transmission of canine leishmaniasis by the tick *Rhipicephalus sanguineus*, and an ultrastructural comparison of the promastigote. PhD Dissertation, Oklahoma State University.

MENDES, W. S. et al. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luís, Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. 2005. Levantamento dos vetores das leishmanioses no município de Várzea Grande, estado do Mato Grosso, no ano de 2004. *Caderno de resumos do XVI Encontro de Biólogos do CRBio-1*, Campo Grande, MS, p. 104

MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MONTEIRO, P. S. et al. Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 27, p. 67, 1994.

MONTOYA-LERMA, J. et al. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. Longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica*, v. 85, n. 01, p. 19-29, 2003.

MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, v. 145, p. 245, 2007.

MORENO, P. et al. Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. *Veterinary Record*, v. 142, p. 81-83, 1998.

NICOLE, C. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie. *Archives du Institute Pasteur de Tunisia*, v. 3, p. 1-26, 1908.

NIETO, C. G. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, v. 45, p. 33-47, 1992.

NIETO, C. G. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 67, p. 117-130, 1999.

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

NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; NUNES, D. B. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 3, 2001.

PAIVA-CAVALCANTE, M. et al. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. *Clínica Veterinária*, n. 58, p. 36-42, 2005.

PAZ, G. F. et al. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, v. 6, p. 523-528, 2010.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 22, n. 1, p. 1-11, 1996.

PIMENTEL, D. S., et al. Alterações estruturais hepáticas e esplênicas em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937). *Medicina Veterinária*, v. 2, n. 2, p. 23-27, 2008.

PINELLI, E. et al. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In: International Canine Leishmaniasis Forum, 1999, Barcelona, Spain. *Proceedings...*Barcelona, Spain, 1999. p.60-64.

POLI, A. et al. Feline leishmaniosis due *Leishmania infantum* in Italy, *Veterinary Parasitology*, v. 106, p. 181-191, 2002.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Veterinary Parasitology*, v. 178, p. 1-8, 2011.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneas em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, p. 34-40, 2010.

QUEIROZ, P. V. S. et al. Canine visceral leishmaniasis in rural and urban áreas of Northeast Brazil. *Research in Veterinary Science*, v. 86, p. 267-273, 2009.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, v. 136, p. 1915–1934, 2009.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, v. 26, p. 341-349, 2010.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, v. 81, p. 68–75. 2006.

REY, L. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2001, 424p.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose Visceral Canina: Nossos cães devem morrer? *Cães & Gatos*, p. 66-70, 2005.

ROLÃO, N. et al. Equine leishmaniasis in Portugal: first report. *Proceedings of Third World Congress in Leishmaniasis*, p. 200, 2005.

ROSYPAL, A. C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology*, v. 91, p. 970-972, 2005.

ROZE, M. Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *European Journal of Companion Animal Practice*, v. 15, p. 39-52, 2005.

SACKS, D., NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in the mice. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 845-858, 2002.

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

SANTARÉM, N. et al. Application of an improved enzyme-linked immunoabsorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, p. 1866-1874, 2010.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 471-489, 2009.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, Article id 631460, 12 pages, 2012. Doi: 10.1155/2012/631460

SHAW, J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SILVA, A. V. M. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

SILVA, F. L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 160, p. 55-59, 2009.

SILVESTRE, R. et al. Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. *Veterinary Parasitology*, v. 158, p. 23-30, 2008.

SIMÕES-MATOS, L. et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, v. 127, p. 199-208, 2005.

SLAPPENDEL, R. J., et al. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, n. 10, p. 1-16, 1988.

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Philadelphia: W.B. Saunders Co., p.450-458, 1990.

SOLANO-GALLEGO, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 165, p. 1-18, 2009.

SOLCÁ, M. D. S. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 184, p. 133-140, 2012.

SOUSA, S. et al. Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Tropica*, v. 120, p. 82-87, 2011.

SOUZA, A. I. et al. Feline leishmaniasis due *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 128, p. 41-45, 2005.

SOUZA, C. M. et al. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite Immunology*, v. 34, p. 1-7, 2012.

SPADA, E. et al. First report of the use of meglumine antimoniate for treatment of canine leishmaniasis in a pregnant dog. *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 47, n. 1, p. 67-71, 2011.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine visceral leishmaniasis. In: CARMICHAEL, L. (Ed.). *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, New York: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Infect_DIS_Carmichael/baneth/chapter_frm.asp. Acesso: 01 julho. 2011.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, p. 951-958, 2002.

TOMÁS, A. M.; ROMÃO, S. F. Biologia do parasita. In: Santos-Gomes, G. & Fonseca, I. P. (Eds.), *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira. 2008, p. 7-26.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sang flies from nonendemic areas. *Research in Veterinary Science*, v. 72, n. 1, p. 83-86, 2002.

VAN WYNSBERGHE, N. R. et al. Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, México. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 51, p. 87-94, 2009.

VANLOUBBEECK, Y.; JONES, D. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. *Annals of New York Sciences*, v. 1026, p. 267-272, 2004.

VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitismo of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Veterinary Research*, v. 4, p. 45, 2008.

VIANNA, M. S. R. Sobre a transmissão da leishmaniose visceral. *Saúde-Rio: Secretaria Municipal de Saúde*, Rio de Janeiro, 19 dez. 2001. Disponível em: <file:///A:\Saude-Rio.SecretariaMunicipaldeSaudeDoRiodeJaneiro.htm>. Acesso em: 14 nov. 2011.

VIÑUELAS, J. et al. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 101, p. 23-27, 2001.

CAPÍTULO I

**PERFIL HISTOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DA MEMBRANA SINOVIAL
DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) infantum***

PERFIL HISTOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DA MEMBRANA SINOVIAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) infantum*

HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PATTERNS OF THE SINOVIAL MEMBRANE OF DOGS NATURALLY INFECTED BY *Leishmania (Leishmania) infantum*

Maíra Santos Severo¹, Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira², Leucio Câmara Alves³, Maria Aparecida da Gloria Faustino³

Abstract

Canine visceral leishmaniasis is a severe systemic zoonosis, widely distributed on four continents, caused by intracellular protozoan *Leishmania infantum*. Dogs are considered the main reservoirs of infection which transmission occurs through the bite of female sandflies of *Lutzomyia longipalpis* species. A large number of clinical signs related to disease can be observed, such as enlarged lymph nodes, hepatosplenomegaly, skin diseases, and osteoarticular, gastrointestinal, ocular and neurological disorders. For diagnosis, parasitological methods, immunological and molecular techniques may be used. The aim of this study was to determine the immunohistochemical profile of the synovial membrane of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*, from Petrolina city, Pernambuco State, Brazil. We examined 40 samples of synovial membrane obtained from 20 cadavers of dogs serologically positive for visceral leishmaniasis, euthanized at the Centro de Controle de Zoonoses de Petrolina, PE. The fragments were processed by routine technique of embedding in paraffin, 4µm microtomed, submitted to specific immunohistochemistry marking and examined by light microscopy. Histiolinfoplasmocitic infiltrates, mostly perivascular, were observed in the synovial membranes of three animals (five samples). Five samples were positive by immunohistochemistry test. The results showed that the synovial membrane of dogs is a structure that can be parasitized by amastigotes of *L. infantum*, founded inside macrophages, associated or not with histiolinfoplasmocitic infiltrators.

Key words: *Leishmania infantum*, dogs, immunohistochemistry, histopathology, synovial membrane.

Resumo

A leishmaniose visceral canina é uma zoonose sistêmica severa, de larga distribuição nos quatro continentes, causada pelo protozoário intracelular *Leishmania infantum*. Os cães são considerados os principais reservatórios da infecção cuja transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Um grande número de sinais clínicos relacionados à doença podem ser observados, tais como linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, e dermatopatias, além de alterações osteoarticulares, gastrointestinais, oculares e neurológicas. Para o diagnóstico, métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares podem ser utilizados. Objetivou-se, com este estudo, determinar o perfil imunohistoquímico da membrana sinovial de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, provenientes do município de Petrolina, Estado de Pernambuco, Brasil. Foram examinadas 40 amostras de membrana sinovial obtidas de 20 cadáveres de cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral, eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses de Petrolina, PE. Os fragmentos foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, microtomizados a 4µm, submetidos à marcação imunohistoquímica específica e examinados em microscópio de luz. Foram observados infiltrados histiolinfoplasmocitários, em sua maioria perivascularares, nas membranas sinoviais de três animais (cinco amostras). Em cinco amostras analisadas, o resultado da imunohistoquímica mostrou-se positivo. Os resultados permitiram concluir que a membrana sinovial de cães constitui uma estrutura parasitada por formas amastigotas de *L. infantum*, encontradas no interior de macrófagos, associadas, ou não, a infiltrados histiolinfoplasmocitários.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, cães, imunohistoquímica, histopatologia, membrana sinovial.

Introdução

A leishmaniose visceral é uma enfermidade de caráter infeccioso e crônico, difundida em todo o mundo, causada por um protozoário heteroxênico, intracelular obrigatório denominado *Leishmania infantum*. É considerada uma importante antroponose, onde homens e cães podem agir como hospedeiros (LIMA et al., 2010; COLOMBO, et al., 2011), possibilitando a transmissão da doença para uma variedade de animais domésticos e selvagens (MARCONDES et al., 2011), podendo levar a um grande número de sintomas e sinais clínicos (AGUIAR et al., 2007; EL-ON, 2009). Os insetos flebótomos fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis* são responsáveis pela transmissão natural da doença nas Américas (LIMA et al., 2010; PAZ et al., 2010), enquanto os cães (*Canis familiaris*) representam o principal reservatório doméstico da *Leishmania infantum* (CARRILO e MORENO, 2009; QUEIROZ et al., 2009).

A leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta uma variedade de apresentações clínicas, relacionadas à virulência do parasita e à resposta imune do hospedeiro (PARPAGLIA et al., 2007). Classicamente, os animais apresentam sinais inespecíficos como febre, perda de peso, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, além de dermatopatias (FEITOSA, 2001; CIARAMELLA e CORONA, 2003; PAIVA-CAVALCANTE et al., 2005) e oftalmopatias (CIARAMELLA e CORONA, 2003; BRITO et al., 2006).

Mesmo sendo incomuns, sinais osteoarticulares também podem ser observados em animais infectados por *Leishmania infantum* (SANTOS et al., 2006). Anormalidades na locomoção, aumento de volume articular e dor à palpação de uma ou mais articulações podem estar presentes (BLAVIER et al., 2001; McCONKEY et al., 2002) e normalmente estão associadas ao desenvolvimento de poliartrites (AGUT et al., 2003; SOUZA et al., 2005). Geralmente as poliartrites não são erosivas e podem ou não estar associadas a sinovites, com presença de aumento de volume articular acompanhada de artralgia e, ocasionalmente, atrofia muscular (BLAVIER et al., 2001; AGUT et al., 2003).

Duas teorias têm sido propostas para a patogênese das poliartrites por *Leishmania* (BLAVIER et al., 2001): a presença do parasita, induzindo uma inflamação granulomatosa da sinóvia, ou a deposição de imuno-complexos na membrana sinovial, desenvolvendo uma reação de hipersensibilidade do tipo III (SLAPPENDEL e FERRER, 1990; McCONKEY et al., 2002) com posterior inflamação, migração de neutrófilos e destruição articular por enzimas hidrolíticas (SANTOS et al., 2006). O líquido sinovial pode apresentar aumento das

proteínas totais e da celularidade, com predominância de neutrófilos e linfócitos. Formas amastigotas de *L. infantum* podem ser encontradas parasitando macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células endoteliais ou fibroblastos (RODRIGUEZ et al., 1996). Em decorrência da inflamação, a membrana sinovial pode apresentar grande número de infiltrados de plasmócitos, linfócitos, macrófagos e fibroblastos, muitas vezes parasitados pelo protozoário (McCONKEY et al., 2002).

Diferentes técnicas podem ser empregadas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (GONTIJO e MELO, 2004). Métodos parasitológicos (SUNDAR e RAI, 2002), imunológicos (MOREIRA et al., 2002; MARCONDES et al., 2011) e moleculares (TAVARES et al., 2003) têm sido bastante utilizados. A demonstração do agente etiológico mediante exames citológicos, histopatológicos e imunohistoquímicos de amostras de órgãos linfóides, representa uma alternativa diagnóstica, possibilitando a análise estrutural do tecido parasitado, além da identificação direta do protozoário.

Objetivou-se, com este trabalho, determinar o perfil histológico e imunohistoquímico da membrana sinovial de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, provenientes do município de Petrolina, Estado de Pernambuco, Brasil.

Material e métodos

Foram coletadas 40 amostras de membrana sinovial provenientes de 20 animais eutanasiados pelo Centro de Controle de Zoonoses do estado de Pernambuco, como parte do programa de controle da LV em função da positividade nos testes de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e/ou exame parasitológico. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Previamente à eutanásia, todos os animais foram submetidos a uma avaliação clínica e ortopédica completa, e os dados registrados em fichas individuais. Logo após a eutanásia, através de abordagem crânio-lateral às articulações fêmuro-tibio-patelar direita e esquerda de cada animal, conforme Piermattei (1999), fragmentos de membrana sinovial de aproximadamente 1,5 cm foram coletados e fixados em solução tamponada de formalina a 10% e acondicionados em frascos plásticos de polietileno com tampas durante 24 a 48 horas. Após a fixação, as amostras foram submetidas a processamento histológico de rotina e coradas por hematoxilina e eosina (HE), ou processados para imuno-deteção de amastigotas

de acordo com a metodologia descrita por Tafuri et al. (2004), com a utilização de soro hiperimune de cão como anticorpo primário e sistema de detecção à base de estreptavidina-biotina-peroxidase disponível comercialmente (LSAB+ kit, Dako USA). A marcação foi revelada com diaminobenzidina (DAB).

Resultados e discussão

Ao exame físico, todos os animais apresentavam três ou mais sinais clínicos da leishmaniose visceral canina, dentre eles hiperpigmentação escrotal, hipotricose, lesões de pele ulcerativas e descamativas, conjuntivite, linfadenopatia e onicogribose. A presença de ectoparasitas (pulgas e carrapatos) também foi evidenciada em todos os animais. Ao exame ortopédico, foi observado que apenas um animal apresentava crepitação nas articulações coxofemorais e nos joelhos. Em nenhum deles foi detectada claudicação, artralgia ou aumento de volume articular.

As membranas sinoviais coletadas não apresentaram nenhuma alteração macroscópica evidente. Alterações microscópicas foram identificadas nas membranas sinoviais de três animais; apenas um deles apresentava sintomatologia ortopédica (crepitação articular). As alterações histopatológicas encontradas foram presença de infiltrados histiocíticos ou histiolinfoplasmocitários (Figura 1a) nas camadas íntima e/ou subíntima da membrana sinovial, sendo observadas de formas amastigotas de *L. infantum* parasitando macrófagos (Figura 1b).

O exame histopatológico da membrana sinovial esquerda do animal que apresentava crepitação articular revelou a presença de infiltrados histiolinfoplasmocitários moderados, multifocais, em boa parte perivascularares, além da proliferação de fibroblastos (Figura 2a e 2b).

A avaliação imunohistoquímica das membranas sinoviais coletadas revelou a imunomarcação de formas amastigotas parasitando macrófagos nas amostras de membrana sinovial coletadas de três animais (Figura 3a e 3b). Em um dos animais, apenas a membrana sinovial direita foi positiva e nenhum deles apresentava sintomas de doença articular. No animal que apresentava crepitação articular, a imunohistoquímica foi negativa.

Sintomas ortopédicos, tais como claudicação, dor e aumento de volume articular são considerados menos comuns, sendo poucos os relatos sobre doenças osteoarticulares relacionadas à leishmaniose visceral canina. McConkey e colaboradores (2002) descreveram um caso de poliartrite por LVC, com manifestações importantes, tais como artralgia, aumento de volume articular e claudicação, possivelmente relacionada a sinovite, decorrente da presença de formas amastigotas intra-articulares. Entretanto, nos animais deste estudo, a evidência de formas amastigotas na membrana sinovial, tanto na imunohistoquímica, quanto no exame histopatológico, não foi suficiente para desencadear um processo inflamatório capaz de provocar qualquer sintomatologia ortopédica. Para desencadear uma doença articular importante, é necessário que a presença do protozoário desencadeie uma inflamação granulomatosa; ou que imuno-complexos sejam depositados na articulação, o que cursaria com um processo inflamatório da sinóvia, segundo Santos e colaboradores (2006). Nenhum dos dois eventos ocorreu nos animais com imunomarcção positiva neste estudo.

As alterações histopatológicas encontradas nas membranas sinoviais estudadas, foram observadas nos cães que apresentaram imunomarcção positiva para *L. infantum*, e em um animal com imunomarcção negativa. Nas regiões onde foram observados infiltrados histiolinfoplasmocitários nos animais positivos, macrófagos parasitados por formas amastigotas de *L. infantum* também foram evidenciados. Entretanto, mesmo em regiões que não correspondiam a infiltrados inflamatórios, macrófagos parasitados também foram encontrados. No animal negativo, foram observados infiltrados perivasculares, moderados e multifocais, contendo macrófagos, plasmócitos e linfócitos. O fato de terem sido observados infiltrados inflamatórios com as mesmas características nas membranas sinoviais tanto com imunomarcção positiva quanto negativa, sugere tratar-se de uma alteração inflamatória inespecífica, ou seja, o processo inflamatório nesse caso não foi desencadeado necessariamente por *Leishmania*. As articulações do joelho correspondem a uma região de constantes impactos e sobrecarga de peso, altamente susceptível a inflamações inespecíficas e, portanto, macrófagos parasitados poderiam eventualmente ser atraídos para focos com inflamação prévia.

Evidências de crepitações ou “clicks”, na avaliação da saúde articular, podem relacionar-se a lesões da cartilagem articular ou meniscos, que caracterizam as osteoartroses (PIERMATTEI, 1999). Esta última pode desenvolver-se em decorrência de doenças degenerativas, imunomediadas e infecciosas crônicas, que eventualmente podem induzir a deposição de imuno-complexos capazes de destruir a articulação (SANTOS et al., 2006;

FOSSUM, 2005). Neste caso, a crepitação das articulações coxofemorais e dos joelhos de um dos animais avaliados, provavelmente não apresentou relação com a leishmaniose visceral canina, visto que não foram encontradas formas amastigotas parasitando a membrana sinovial do animal. Associando a sintomatologia ortopédica às alterações histopatológicas observadas, sugere-se uma osteoartrose de etiologia indeterminada.

Conclusão

Com base nos resultados, pode-se concluir que a membrana sinovial de cães constitui uma estrutura parasitada por formas amastigotas de *L. infantum*. Estas são encontradas dentro de macrófagos associadas, ou não, a infiltrados histiolinfoplasmocitários.

Referências bibliográficas:

AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D. A. D.; COSTA, R. L. G.; JULIÃO, F. S.; SANTOS, W. L. C.; BARROUIN-MELO, S. M. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 8, n. 4, p. 283-294, 2007.

AGUT, A.; CORZO, N.; MURCIANO, J.; LAREDO, F.G.; SOLER, M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Veterinary Record*, v. 153, p. 648-652, 2003.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, PH.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J. L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, v. 162, p. 108–120, 2001.

BRITO, F. L. C. et al. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina – revisão. *Revista Clínica Veterinária*, n. 64, p. 68-74, 2006.

CARRILO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, p. 67-70, 2009.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinaria*, v. 25, n. 5, p. 358-368, 2003.

COLOMBO, F. A.; ODORIZZI, R. M. F. N.; LAURENTI, M. D.; GALATI, E. A. B.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research* (2011). doi: 10.1007/s00436-010-2247-6

EL-ON, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *Israel Medical Association Journal*, v. 11, p. 623-628, 2009.

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. *Revista Intervet Pet*, p. 1-15, 2001.

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

LIMA, V. M. F.; FATTORI, K. R.; MICHELIN, A. de F.; NETO, L. da S.; VASCONCELOS, R. de O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rk39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 173, p. 330-333, 2010.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: I FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal, *Anais...Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 2006. p. 15 – 22.

MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; GOMES, A.A.D.; SILVA, A.R.S.; VIEIRA, R.F.C.; CAMACHO, A.A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Veterinary Parasitology* v. 175, p. 15–19, 2011.

McCONKEY.S.E.; LÓPEZ, A.; SHAW, D.; CALDER, J. Leishmanial polyarthritis in a dog. *Canadian Veterinary Journal*, v. 43, p. 607-609, 2002.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; NUNES, C.M.; SILCA, T.C.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Application of direct immunofluorescence technic for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in lymph nodes aspirate. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v. 39, n. 2, p. 103-106, 2002.

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

PAIVA-CAVALCANTE, M. et al. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. *Revista Clínica Veterinária*, n. 58, p. 36-42, 2005.

PARPAGLIA, M. L. P.; VERCELLI, A.; COCCO, R.; ZOBBA, R.; MANUNTA, M. L. Nodular lesions of the tongue in canine leishmaniosis. *Journal of Veterinary Medicine serie A*, v. 54, p. 414–417, 2007.

PAZ, G. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MICHALSKY, E. M.; LIMA, A. C. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, v. 6, p. 523-528, 2010.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. *Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais*. 3. ed. São Paulo: Manole, 1999. 649p.

QUEIROZ, P. V. S.; MONTEIRO, G. R. G.; MACEDO, V. P. S.; ROCHA, M. A. C.; BATISTA, L. M. M.; QUEIROZ, J. W.; JERÔNIMO, S. M. B.; XIMENES, M. F. F. M. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Research in Veterinary Science*, v. 86, p. 267-273, 2009.

RODRIGUEZ, J. H.; MOZOS, E.; MENDEZ, A.; PEREZ, J.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C. *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts in vivo. *Veterinary Pathology*, v. 33, p. 469–473. 1996

SANTOS, M.; MARCOS, R.; ASSUNÇÃO, M.; MATOS, A. J. F. Polyarthrititis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Veterinary Parasitology*, v. 141, p. 340-344, 2006.

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Philadelphia: W.B. Saunders Co., p. 450-458, 1990.

SOUZA, A. I.; BARROS, E. M. S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M. N.; MARIN, G. R. B.; NUNES, V. L. B. Feline leishmaniasis due *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 128, p. 41-45, 2005.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, p. 951-958, 2002.

TAFURI, W. L., et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunologic Methods*, v.292, p. 17- 23, 2004.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N.; Molecular diagnosis of Leishmaniasis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 3, p. 657-667, 2003.

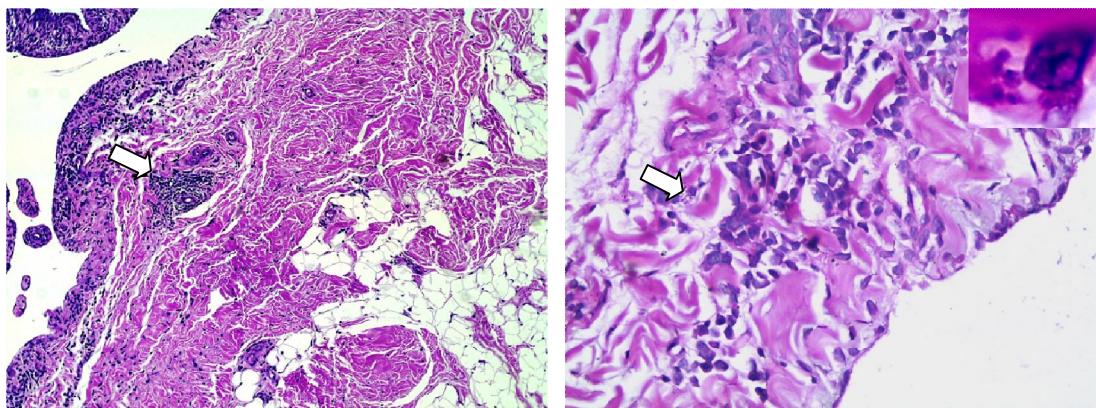


Figura 1. Membrana sinovial de cão naturalmente infectado por *L. infantum*. A: infiltrado histiolinfoplasmocitário na camada subíntima (seta). HE. Aumento de 100X. B: formas amastigotas de *L. infantum* parasitando macrófagos (seta). HE. Aumento de 400X. Detalhe: macrófago parasitado com formas amastigotas de *Leishmania* intracitoplasmáticas.

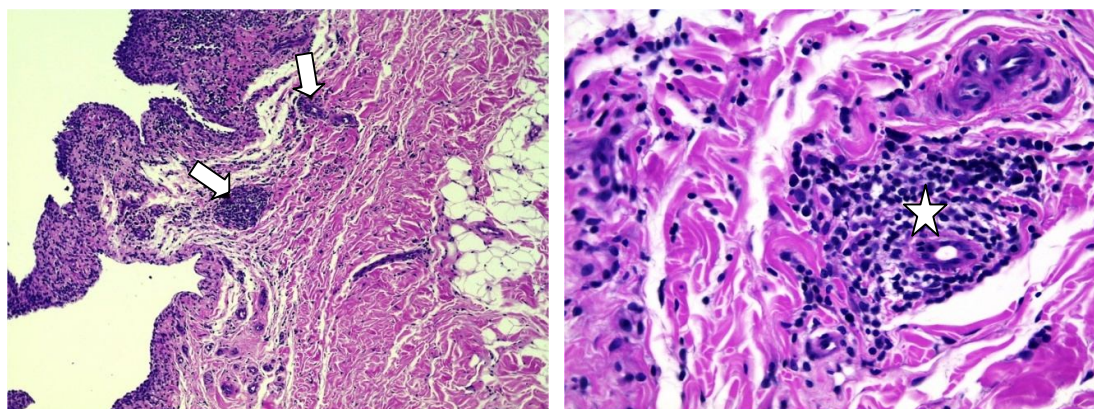


Figura 2. Membrana sinovial de cão naturalmente infectado por *L. infantum*. A: infiltrados histiolinfoplasmocitários perivasculars na camada subíntima (setas). HE. Aumento de 100X. B: infiltrado histiolinfoplasmocitário perivascular (estrela). HE. Aumento de 400X.

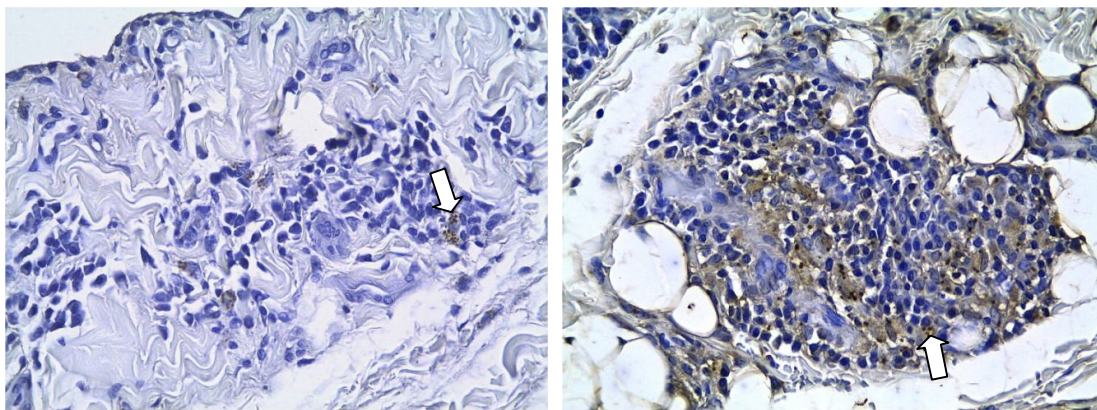


Figura 3. Membrana sinovial de cão naturalmente infectado por *L. infantum*. Imunomarcção de formas amastigotas de *Leishmania* sp no citoplasma de macrófagos (setas) (A e B). Complexo estreptavidina-peroxidase. Aumento de 400x.

CAPÍTULO II

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI- *Leishmania (Leishmania) infantum* NO
HUMOR AQUOSO E LÍQUIDO SINOVIAL DE CÃES COM INFECCÃO NATURAL**

DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Leishmania (Leishmania) infantum* NO HUMOR AQUOSO E LÍQUIDO SINOVIAL DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL

DETECTION OF IgG ANTIBODIES ANTI-*Leishmania (Leishmania) infantum* IN AQUEOUS HUMOR AND SYNOVIAL FLUID OF DOGS WITH NATURAL INFECTION

Maíra Santos Severo; Marília de Andrade Santana; Leucio Câmara Alves; Maria Aparecida da Gloria Faustino

Abstract

In Brazil, canine visceral leishmaniasis (CVL) is a chronic disease caused by intracellular protozoan *Leishmania infantum* and transmitted through the bite of female sandflies of the *Lutzomyia longipalpis*. In regions where disease is endemic, infected animals may present asymptomatic, oligosymptomatic or develop severe generalized disease. A large number of clinical signs and symptoms can be observed, such as lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, and skin diseases, and osteoarticular changes, gastrointestinal, ocular and neurological disorders. The aim of this study was to detect IgG antibodies anti-*Leishmania infantum* in the aqueous humor and synovial fluid of dogs naturally infected by *L. infantum*. We used 20 animals from the Center for Zoonosis Control in the city of Petrolina. Samples of synovial fluid (n = 40), and aqueous humor (n = 40) were analyzed for the presence of anti-*Leishmania* antibodies, using the test-linked immunosorbent assay (ELISA). A sample of aqueous humor and seven synovial fluid samples were positive for the test, possibly due to the spread intra-ocular and intra-articular of the parasite, resulting in the effective formation of antigen-anti-*Leishmania* antibodies complexes. The results showed that anti-*Leishmania* antibodies can be detected in the aqueous humor and synovial fluid of dogs naturally infected by *L. infantum* using the ELISA test.

Keywords: *Leishmania* sp., dogs, eyes, joint

Resumo

No Brasil, a leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica, causada pelo protozoário intracelular *Leishmania infantum* e transmitida através da picada de flebotomíneos fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Em regiões onde a doença é endêmica, os animais infectados podem apresentar-se assintomáticos, oligossintomáticos ou desenvolver doença generalizada severa. Um grande número de sintomas e sinais clínicos pode ser observado, tais como linfadenomegalia, hepato-esplenomegalia, e dermatopatias, além de alterações osteoarticulares, gastrointestinais, oculares e neurológicas. Objetivou-se, com este estudo, detectar anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* no humor aquoso e líquido sinovial de cães com infecção natural por *L. infantum*. Foram utilizados 20 animais provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Petrolina. Amostras de líquido sinovial (n=40) e de humor aquoso (n=40) foram analisadas para a presença de anticorpos anti-*Leishmania*, mediante a utilização do teste de Imunoadsorção Enzimática (ELISA). Uma amostra de humor aquoso e sete amostras de líquido sinovial apresentaram resultado positivo para o teste, possivelmente em decorrência da disseminação intra-ocular e intra-articular do protozoário, acarretando na efetiva formação de complexos antígenoanticorpos anti-*Leishmania*. Os resultados permitiram concluir que anticorpos anti-*Leishmania* podem ser detectados no humor aquoso e no líquido sinovial de cães naturalmente infectados por *L. infantum* através do teste ELISA.

Palavras-chave: *Leishmania* sp., cães, olhos, articulações

Introdução

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* e os cães têm sido considerados os principais reservatórios da infecção (SILVA et al., 2011; SECUNDINO et al., 2012).

Os animais infectados podem desenvolver uma sintomatologia clínica variada, caracterizada por dermatopatias, linfadenomegalia, perda de peso, onicogrifose (DANTAS-TORRES, 2009) e lesões oculares, particularmente, quadros de blefarite, uveíte, edema de córnea, conjuntivite e coriorretinite e úlceras de córnea (ANDRADE et al., 2006a; ANDRADE et al., 2006b, BRITO et al., 2006).

Anormalidades no sistema locomotor têm sido descritas e associadas a depósitos de imunocomplexos intra-articulares (SOUZA et al., 2005; LUVIZOTTO, 2006; MACHADO et al., 2007), onde os animais podem apresentar desde quadros de algias nas articulações dos membros, rigidez articular, e periostite proliferativa, até o aumento anormal da convexidade anterior da coluna vertebral (FEITOSA et al., 2000; SOUZA et al., 2005; SILVA, 2007; SILVA et al, 2007).

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral em cães baseia-se na detecção de formas amastigotas de *L infantum* em material provenientes da biopsia de pele, fígado, baço, linfonodo e medula óssea, além de métodos sorológicos (LAURENTI, 2009) e moleculares (MARTÍNEZ et al., 2011). Contudo, em áreas endêmicas, a análise do líquido sinovial e humor aquoso de pacientes com sintomatologia ocular e locomotora pode se tornar uma ferramenta complementar no diagnóstico.

Objetivou-se, com este estudo, detectar anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* no humor aquoso e líquido sinovial de cães com infecção natural.

Material e métodos

Foram utilizados 20 cães, de raça e idade variadas, sintomáticos para LVC, provenientes do município de Petrolina, Estado de Pernambuco. Os animais utilizados no presente estudo foram eutanasiados pelo Centro de Controle de Zoonoses do estado de Pernambuco, como parte do programa de controle da LV em função da positividade nos testes de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e/ou exame parasitológico. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Antes da coleta do líquido sinovial e humor aquoso, todos os animais foram submetidos à avaliação clínica, oftálmica e ortopédica, segundo Feitosa (2008), visando identificar alterações relacionadas à LV. A coleta do humor aquoso foi realizada mediante paracentese da câmara anterior, na porção límbica lateral de cada um dos olhos, com o auxílio de seringas e agulhas hipodérmicas descartáveis. As amostras foram, em seguida, acondicionadas em tubos de polipropileno do tipo *ependorf* devidamente identificados, e armazenadas à temperatura de -20°C até a realização dos testes. Mediante a punção das articulações escápulo-umeral ou fêmuro-tíbio-patelar direita e esquerda de cada animal com auxílio de seringas e agulhas hipodérmicas descartáveis, amostras de líquido sinovial foram coletadas, identificadas e armazenadas da mesma maneira do humor aquoso (PIERMATTEI, 2001).

Resultados e discussão

Alterações oculares foram observadas em 45% (9/20) dos animais avaliados neste estudo. Tal frequência foi baixa quando comparada aos resultados obtidos por Molleda et al. (1993), ao observar lesões oculares em 80,5% dos 41 cães com leishmaniose visceral. Já Peña et al. (2000) encontraram uma frequência de 24,4% dos casos de cães infectados por *L. infantum* apresentando distúrbios oftálmicos. Tal divergência de resultados ocorre, provavelmente, devido à patogenicidade da cepa de *Leishmania* envolvida, ou duração e tipo de resposta imune desenvolvida pelo animal.

A única alteração ocular observada nos animais deste estudo foi a conjuntivite, diferentemente do que fora relatado por Peña et al. (2000), ao observarem o desenvolvimento de mais de uma lesão em 74,28% dos cães estudados, após infecção natural. Já Brito (2004) verificou que lesões únicas eram mais frequentes. Segundo Molleda et al. (1993) e Slappendel et al. (1988), as desordens oculares que se manifestam na LVC normalmente envolvem a conjuntiva, podendo ou não se apresentar de forma isolada.

Observou-se, neste estudo, a apresentação bilateral da conjuntivite, dado ao envolvimento sistêmico da doença. Molleda et al. (1993) referiram acometimento unilateral na fase inicial, no entanto admitiram como factível o envolvimento bilateral nos estágios mais avançados. Brito (2004) verificou que a manifestação bilateral era a mais prevalente na infecção natural, representando 89,47%.

O humor aquoso de apenas 5% (1/20) dos animais deste estudo apresentou anticorpos IgG anti-*Leishmania* ao teste ELISA. O referido animal apresentava quadro de conjuntivite bilateral. Segundo Garcia-Alonso et al. (1996) a presença de níveis específicos de anticorpos anti-*Leishmania* no humor aquoso sugere a participação direta da resposta imunomediada, com depósitos de imunocomplexos no segmento anterior do olho, o que pode estar relacionado à inflamação da conjuntiva observada.

As conjuntivites também podem desenvolver-se em decorrência da extensão direta de lesões cutâneas (EL HASAN et al., 1998), ou ainda por via hematogena (SLAPPENDEL et al., 1988; BRITO, 2004). Tal fato explicaria a presença de tal oftalmopatia nos oito animais que apresentaram o teste ELISA do humor aquoso negativo.

Dias (1998) detectou anticorpos anti-*Leishmania* (IgM e IgG) no humor aquoso e vítreo, utilizando a técnica de ELISA, enquanto Brito (2006) demonstrou que o ELISA, utilizando o peptídeo S7, foi capaz de detectar anticorpos anti-*Leishmania*, expressados em densidade óptica, no humor aquoso de cães naturalmente infectados. Entretanto, no presente estudo, o humor aquoso foi analisado pela mesma técnica, obtendo resultados negativos na maioria das amostras de humor aquoso analisadas.

A LVC é uma afecção sistêmica que acarreta o desenvolvimento de oftalmopatias, dermatopatias, distúrbios osteoarticulares, linfadenomegalia, perda de peso entre outros sinais clínicos (CIAMARELLA et al., 1997; BLAVIER et al., 2001; NARANJO et al., 2005). As manifestações oculares sucedem, em casos de infecção natural, entre 16 e 80,49% dos animais (KOUTINAS et al., 1999; PEÑA et al., 2000; BRITO, 2004) num período que varia de um mês a sete anos (SLAPPENDEL e GREENE, 1990).

Dos 20 animais estudados, apenas um apresentou sintomatologia ortopédica, caracterizada somente pela crepitação articular. Segundo Blavier et al. (2001) sinais osteoarticulares são incomuns, sendo, segundo Saridomichelakis (2009) normalmente representados pelas poliartrites.

Das amostras de líquido sinovial analisadas, 17,5% (7/40) revelaram presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum* através do teste ELISA. Segundo Ciaramella e Corona (2003) e Silva et al. (2007), a resposta imunomediada por anticorpos pode estar relacionada à presença do protozoário intra-articular, visto que é possível isolar formas amastigotas de *L. infantum* a partir do líquido sinovial e de material de biópsia óssea. Entretanto, a infecção sinovial, segundo Saridomichelakis (2009), induz uma resposta inflamatória do tipo granulomatosa que, além do depósito de imunocomplexos, está associada ao desenvolvimento

das poliatrites. Entretanto, neste estudo, dos animais que apresentaram líquido sinovial positivo para IgG anti-*Leishmania*, nenhum apresentou sintomas relacionados a tal afecção.

Conclusão

Anticorpos anti-*Leishmania* podem ser detectados no humor aquoso e no líquido sinovial de cães naturalmente infectados por *L. infantum* através do teste ELISA. A resposta direta imunomediada por anticorpos pode relacionar-se à detecção de IgG anti-*Leishmania* nestes fluidos, não acarretando, necessariamente, no desenvolvimento de sintomatologia oftálmica ou ortopédica.

Referências bibliográficas

ANDRADE, A. L. et al. Envolvimento da *Leishmania* spp. em ceratite ulcerativa em cão. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1, 2006, Jaboticabal. *Anais...Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 2006a, p. 51.

ANDRADE, A. L., EUGENIO, F. R., LUVISOTTO, M. C. R. Lesões macro e microscópicas da terceira pálpebra causadas por *Leishmania* spp. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1, 2006, Jaboticabal. *Anais...Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 2006b, p. 49.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, Ph.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical Forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, v.162, p.108-120, 2001.

BRITO, F. L. C. *Alterações oculares e análise do humor aquosode cães (Canis familiaris LINNAEUS, 1758) infectados naturalmente por Leishmania chagasi (CUNHAS & CHAGAS, 1937)*. 2004. 42f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.

BRITO, F. L. C. *Patologia, resposta imune humoral e diagnóstico em cães com oftalmopatias decorrentes da infecção natural por Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2006. 52f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BRITO, F. L. C. et al. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina – revisão. *Clínica Veterinária*, n. 64, p. 68-74, 2006.

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

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, n.141, p.539-543, 1997.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmanioses in South America. *Parasites e Vectors*, v. 2, n. 1, p. 01- 08, 2009.

DIAS, J. C. P. Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 14, n.2, p.19-37, 1998.

EL-HASSAN, A. M. et al. Post-kalazar ocular leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n. 2, p. 177-179, 1998.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária*, n.28, p.36-44, 2000.

FEITOSA, F. L. F. Semiologia Veterinária: a Arte do Diagnóstico. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008, 454p.

GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, C. G.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humor and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunology*, v. 18, p. 539-546, 1996.

KOUTINAS, A. F., et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 35, p. 376-383, 1999.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1, 2006, Jaboticabal. *Anais...Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 2006, p. 15-22.

MACHADO J. G., HOFFMANN J. L., LAGONI H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. *Clínica Veterinária*, n. 71, p. 50-58, 2007.

MARTINEZ-SUBIELA S.; STRAUSS-AYALI D.; CERÓN J. J. e BANETH G. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 7, p. 23-26, 2011.

MOLLEDA, J. M. et al. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, n.48, p.173-178, 1993.

NARANJO, C. et al. Characterization of lacrimal glands lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 133, p. 37-47, 2005.

PEÑA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*, n.3, p.35-41, 2000.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 471-489, 2009.

SECUNDINO, N. F. C.; de FREITAS, V. C.; MONTEIRO, C. C.; PIRES, A. C. A. M.; DAVID, B. A.; PIMENTA, P. F. P. The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. *Parasites e Vectors*, v. 5, n. 20, p. 01-13, 2012.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v.1, n.1, p. 20- 31, 2007.

SILVA, A. R. S. et al. Osteoartrite por *Leishmania* sp. em um cão pit bull. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, n. 2, p. 545-546, 2007.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; de SOUZA, C. M.; FIGUEIREDO, F.B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Veterinary Parasitology*, v. 179, p. 257-261, 2011.

SLAPPENDEL, R.J.; GREENE, C.E. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. Infectious Diseases of the Dog and Cat, USA: W.B. Saunders Co., 1990, p.769-777.

SLAPPENDEL, R.J. et al. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, The Hague, n. 10, p. 1-16, 1988.

SOUZA, A. I.; BARROS, E. M. S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M. N.; MARIN, G. R. B.; NUNES, V. L. B. Feline Leishmaniasis due *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 128, p. 41-45, 2005.

CAPÍTULO III

**ALTERAÇÃO ESTRUTURAL E DO PARASITISMO DA CONJUNTIVA DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) infantum***

**ALTERAÇÃO ESTRUTURAL E DO PARASITISMO DA CONJUNTIVA DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) infantum***

**STRUCTURAL CHANGES AND OF THE PARASITISM OF CONJUNCTIVA
FROM DOGS WITH NATURAL INFECTION OF *Leishmania (Leishmania) infantum***

Maíra Santos Severo, Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira, Leucio Câmara Alves, Maria Aparecida da
Gloria Faustino

Abstract

Visceral *Leishmaniasis* is a chronic anthrozoosis, distributed in over 88 countries, thus having great importance in public health. It is caused by *Leishmania infantum* in Latin America and the transmission to humans and animals occurs through the bite of female insects of the *Lutzomyia longipalpis* species. Dogs are considered the main reservoirs of the disease, whose main symptoms are weight loss, loss of appetite, dermatopathies, lymphadenopathy, onychogryposis and ophthalmopathies. The aim of this study was to investigate the parasitism and histological changes of the conjunctiva of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*, from Petrolina municipality, Pernambuco State, Brazil. We examined 40 samples of conjunctiva obtained from 20 cadavers of dogs serologically positive for visceral leishmaniasis, euthanized at the Center for Zoonosis Control of Petrolina, PE. The fragments were processed by routine technique of paraffin embedding, the microtomed, submitted to specific immunohistochemistry marking and examined by light microscopy. In five samples, the results of immunohistochemistry were positive. The results showed that the conjunctiva is a structure parasitized by amastigotes of *L. infantum*, found inside macrophages, usually associated with histiolinfoplasmocitic infiltrates.

Keywords: *Leishmania* sp., dogs, immunohistochemistry, histopathology, conjunctiva.

Resumo

A Leishmaniose Visceral é uma antropozoonose de caráter crônico, distribuída em mais de 88 países, possuindo assim grande importância na saúde pública. É causada pela *Leishmania infantum* na América Latina e sua transmissão ao homem e aos animais ocorre através da picada de fêmeas hematófagas de insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Os cães são considerados os principais reservatórios da doença, cujos principais sintomas são emagrecimento, perda do apetite, dermatopatias, linfadenomegalia, onicogrifose, além de lesões oculares. Objetivou-se, com este estudo, investigar o parasitismo e as alterações histológicas da conjuntiva de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, provenientes do município de Petrolina, Estado de Pernambuco, Brasil. Foram examinadas 40 amostras de conjuntiva, obtidas de 20 cadáveres de cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral, eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses de Petrolina, PE. Os fragmentos foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, microtomizadas a 4µm, submetidos à marcação imunohistoquímica específica e examinada em microscópio de luz. Em cinco das 40 amostras analisadas, o resultado da imunohistoquímica mostrou-se positivo. Os resultados permitiram concluir que a conjuntiva de cães constitui uma estrutura parasitada por formas amastigotas de *L. infantum*, encontradas no interior de macrófagos, geralmente associadas a infiltrados histiolinfoplasmocitários.

Palavras-chave: *Leishmania* sp., cães, imunohistoquímica, histopatologia, conjuntiva.

Introdução

A leishmaniose visceral canina (LVC) tem sido considerada, clinicamente, uma enfermidade de caráter imunomediado (SLAPPENDEL e FERRER, 1998; STRAUSS-AYALI e BANETH, 2001; FERRER, 2002). Classicamente, os animais infectados desenvolvem sinais inespecíficos como febre, perda de peso, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, (FEITOSA, 2001; CIARAMELLA e CORONA, 2003; PAIVA-CAVALCANTE et al., 2005; SOUSA et al., 2012).

Contudo, apesar da natureza viscerotrópica do protozoário, as lesões oculares particularmente blefarites, conjuntivites e ceratoconjuntivites têm sido relacionadas à LVC (CIARAMELLA e CORONA, 2003; BRITO et al., 2006; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Os mecanismos envolvidos na patogênese da doença ocular relacionada à infecção por *L. infantum* incluem o desenvolvimento de reação inflamatória associada à presença do protozoário, a formação de imuno-complexos, além de manifestações sistêmicas da LVC com repercussões oculares (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NIETO et al., 1999; PEÑA et al., 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Segundo Garcia-Alonso et al. (1996), a deposição de imuno-complexos em diferentes componentes do olho, pode suscitar a lise celular e conseqüente lesão ocular.

Em virtude da importância das lesões oculares associadas à LVC na clínica de pequenos animais, objetivou-se, neste estudo, investigar o parasitismo e as alterações histológicas da conjuntiva de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*.

Material e métodos

Foram utilizados fragmentos de tecido conjuntival provenientes de ambos os olhos de 20 cães, totalizando 40 amostras. Os animais apresentavam diagnóstico positivo para leishmaniose visceral nos testes de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e/ou exame parasitológico, tendo sido eutanasiados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Petrolina, estado de Pernambuco, como parte do programa de controle da LV em função da positividade nos testes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Previamente, os animais foram submetidos à avaliação clínica e oftálmica, segundo Feitosa (2008) e, posteriormente fragmentos de conjuntiva (1,5cm) foram coletados, fixados em solução tamponada de formalina 10% e acondicionados em frascos plásticos de polietileno, com tampas, durante 24 a 48 horas. Após a fixação, as amostras foram submetidas a processamento histológico de rotina, coradas por hematoxilina e eosina (HE), e processadas também para imuno-deteção de amastigotas de acordo com a metodologia descrita por Tafuri et al. (2004).

Resultados e discussão

Inicialmente, todos os animais deste estudo apresentaram três ou mais sinais clínicos considerados específicos de LVC, dentre eles hiperpigmentação escrotal, hipotricose, lesões de pele ulcerativas e descamativas, linfadenopatia e onicogribose. Ao exame oftálmico, foi observada, como única alteração ocular, a conjuntivite bilateral em 45% dos cães (9/20). A frequência aqui observada foi inferior aos resultados obtidos por Molleda et al. (1993), ao observarem lesões oculares em 80,5% dos animais com LVC e inferior à frequência de 24,4% observada por Peña et al. (2000).

Diferentemente de Peña et al. (2000) e Brito (2004), que detectaram mais de um sinal clínico oftálmico em cães com infecção natural por *L. infantum*, neste estudo foi observado apenas a conjuntivite como alteração ocular.

Com relação à conjuntivite bilateral, deve-se ter em mente que a grande maioria das conjuntivites em cães quase sempre apresenta uma causa predisponente (GELATT, 2001), e sua natureza bilateral encontra-se associada ao período de evolução da doença, particularmente infecções crônicas como a LVC (MOLLEDA et al., 1993; BRITO, 2004), à cepa do protozoário envolvida, ao tropismo do parasita, além da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado (GARCIA-ALONSO et al., 1996).

Ainda neste sentido, Garcia-Alonso et al. (1998) afirmaram que a presença de oftalmopatia na LVC pode não ter relação com os sinais sistêmicos da enfermidade e, na maioria dos casos, se apresenta de forma bilateral.

À análise histológica, alterações microscópicas foram identificadas em 12,5% (5/40) das conjuntivas examinadas, sendo observada presença de infiltrados histiolinfoplasmocitários

subepiteliais (Figura 1a), ocorrendo de forma discreta a moderada. Plasmócitos e macrófagos foram evidenciados geralmente ao redor dos vasos conjuntivais, notadamente naqueles mais superficiais, caracterizando quadro de perivasculite. Formas amastigotas de *L. infantum* também foram evidenciadas parasitando macrófagos (Figura 1b).

Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário tem sido relatado em diferentes segmentos do olho (MOLEDA et al., 1993; GARCIA-ALONSO et al., 1998; NARANJO et al., 2005; BRITO, 2006). A conjuntiva apresenta um importante papel como órgão linfóide, apresentando, segundo EICHENBAUM et al. (1987), o *conjunctival associated lymphoid tissue* (CALT) como área especializada apta a receber e apresentar antígenos. O predomínio de células inflamatórias nessa região poderia, então, estar relacionado à resposta imune específica conjuntival.

É importante salientar que os fragmentos de conjuntiva que apresentaram alterações estruturais pertenciam a 33.3% (3/9) dos cães portadores de conjuntivite, entretanto, nos demais animais que apresentaram tal oftalmopatia, não foi observada nenhuma alteração histológica na mucosa conjuntival. Segundo El Hasan et al. (2000), este achado pode ser explicado em função da conjuntivite poder desenvolver-se em decorrência da extensão direta de lesões cutâneas, podendo, inclusive, advir da via hematogena (SLAPPENDEL et al., 1988; BRITO, 2004).

A avaliação do parasitismo por *L. infantum* no tecido conjuntival através da técnica de imunohistoquímica revelou a presença formas amastigotas em 12,5% (5/40) dos fragmentos examinados (Figura 2a e 2b). Assim como observado por Tafuri et al. (2004) e Diniz et al., (2005), a imunohistoquímica possibilitou a marcação de formas amastigotas em fragmentos de conjuntiva, permitindo a fácil visualização dos parasitas marcados.

Conclusão

Formas amastigotas de *L. infantum* podem ser encontradas parasitando a conjuntiva de cães naturalmente infectados. A presença de conjuntivite isoladamente em animais com LVC não constitui um achado clínico importante, contudo em áreas endêmicas a utilização da técnica de imunohistoquímica pode servir como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da LVC, particularmente nos animais que não apresentarem sinais sistêmicos da doença.

Referências bibliográficas

- BRITO, F. L. C. *Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (Canis familiaris LINNAEUS, 1758) infectados naturalmente por Leishmania chagasi (CUNHA e CHAGAS, 1937)*. 2004. 42f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.
- BRITO, F. L. C. *Patologia, resposta imune humoral e diagnóstico em cães com oftalmopatias decorrente da infecção natural por Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2006. 52f. Tese de doutorado – Universidade Paulista, Jaboticabal, 2006
- BRITO, F. L. C. et al. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina – revisão. *Revista Clínica Veterinária*, n. 64, p. 68-74, 2006.
- CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinaria*, v. 25, n. 5, p. 358-368, 2003.
- DINIZ, S. A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M.; et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Veterinary Pathology*, v. 42, p. 650-658, 2005.
- EICHENBAUM, J.D. et al. Immunology of the ocular surface. *Immunology*, v. 9, n. 11, p. 99-106, 1987.
- EL HASSAN, A.M. et al. Post kala-azar ocular leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n. 2, p. 177-179, 2000.
- FEITOSA, F. L. F. *Semiologia Veterinária: a Arte do Diagnóstico*. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008, 454p.
- FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. *Revista Intervet Pet*, p. 1-15, 2001.

FERRER, L. Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In: World Small Animal Veterinary Association Congress, 2002, Granada. *Anais eletrônico...* Granada, 2002. Disponível em: <http://www.avepa.org/granada2002>. Acesso em: 12 dez. 2011.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 18, p. 617-623, 1996.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Patología ocular asociada a leishmaniosis canina. *Consulta de Difusión Veterinaria*, v. 6, n. 54, p. 49-53, 1998.

MOLLEDA, J. M. et al. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, n. 48, p. 173-178, 1993.

NARANJO, C. et al. Detection of *Leishmania* spp. And associated infiltrate in extraocular and adnexal smooth and striated muscles in dogs with leishmaniasis. In: ECVO/ESVO (European College of Veterinary Ophthalmologists and European Society of Veterinary Ophthalmology). *Annual Meeting*: Oporto, Portugal, June, 2005.

NIETO, C.G. et al. Analysis of the humoral response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 67, p. 117-130, 1999.

PAIVA-CAVALCANTE, M. et al. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. *Revista Clínica Veterinária*, n. 58, p. 36-42, 2005.

PEÑA, M.T. et al. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*, n. 3, p. 35-41, 2000.

PEÑA, M.T.; NARANJO, C.; KLAUSS, G.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.-ROURAY, X.; DAVIDSONZ, M.G.; DUBIELZIGY, R.R. Histological features of ocular leishmaniosis in the dog. *Journal of Comparative Pathology*, v. 138, p. 32-39, 2008.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 471-489, 2009.

SLAPPENDEL, R.J. et al. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, n. 10, p. 1-16, 1988.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. *Infectious diseases of the dog ad cat*. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1998. Cap.73, p.450-458.

SOUZA, C.M. et al. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite Immunology*, v. 34, p. 1-7, 2012.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine visceral leishmaniasis: In: *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, Camichael L. Ithaca, NY, 2001. Disponível em: <http://www.ivis.com.br>. Acesso em 22 nov 2011.

TAFURI, W.L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunologic Methods*, v.292, p. 17- 23, 2004.

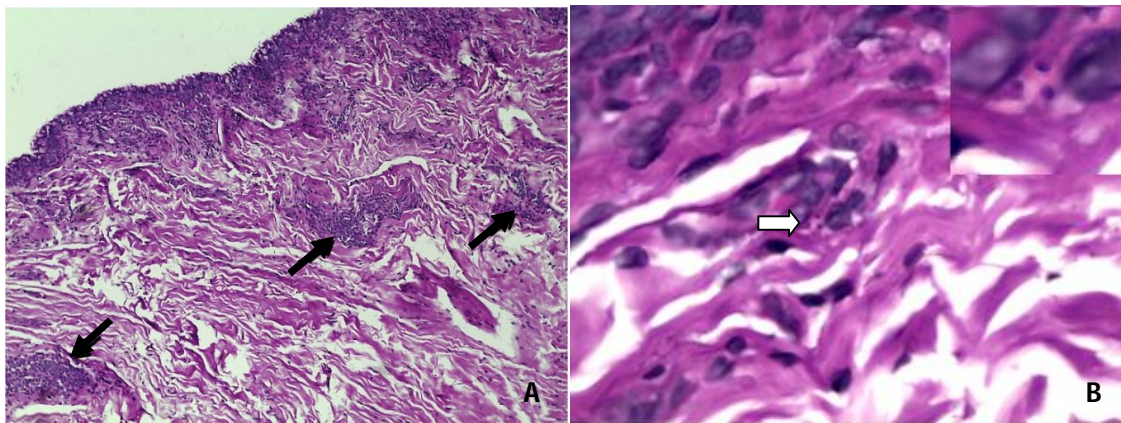


Figura 1. Conjuntiva de cão naturalmente infectado por *L. infantum*. A: infiltrados histiolinfoplasmocitários perivascularares na camada subepitelial (setas). HE. Aumento de 100X. B: Presença de formas amastigotas de *L. infantum* no interior de macrófago. HE. Aumento de 1000X. Detalhe: macrófago parasitado com formas amastigotas de *Leishmania* intracitoplasmáticas.

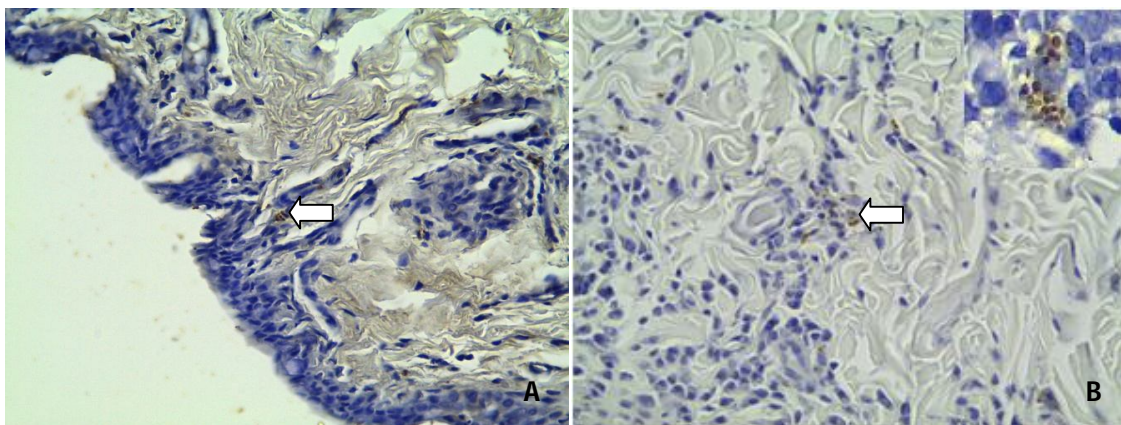


Figura 2. Conjuntiva de cão naturalmente infectado por *L. infantum*. A. Notar Formas amastigotas de *L. infantum* no interior de macrófagos (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Aumento de 400X. B. Formas amastigotas no interior de macrófago (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Aumento de 400X. Detalhe: Macrófago parasitado com formas amastigotas de *L. Infantum*.

CAPÍTULO IV

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Leishmania (Leishmania) infantum* NO
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Leishmania (Leishmania) infantum* NO
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE CÃES COM INFECCÃO NATURAL**

**DETECTION OF IgG ANTIBODIES ANTI-*Leishmania (Leishmania) infantum* IN
CEREBROSPINAL FLUID OF DOGS WITH NATURAL INFECTION**

Maira Santos Severo, Marília de Andrade Santana, Neurisvan Ramos Guerra, Leucio Câmara Alves, Maria
Aparecida da Gloria Faustino

Abstract

The canine visceral leishmaniasis, caused by the intracellular protozoan *Leishmania infantum*, is an important zoonosis transmitted through the bite of insects of the species *Lutzomyia longipalpis*. Dogs are considered the main reservoirs of the disease, and may develop a specific clinical signs such as lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, weight loss, fever, eyes and skin damage, and more rarely, neurological symptoms. Most infected animals develop active disease, characterized by high titres of anti-*Leishmania* antibodies and reduced lymphoproliferative ability. The aim of this study was to investigate the presence of anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid (CSF) samples of naturally infected dogs for *L. infantum*. We used 20 aliquots of CSF obtained from 20 cadavers of dogs serologically positive for visceral leishmaniasis, euthanized at the Center for Zoonosis Control of Petrolina, PE. The samples were subjected to ELISA S7 test, and IgG antibodies anti-*L. infantum* were identified in one of them. The results showed that *Leishmania infantum* can cause breakdown of filtration barriers allowing the transfer of antibodies from the blood to the cerebrospinal fluid compartment, even without neurological symptoms.

Keywords: *Leishmania* sp., dogs, CSF, ELISA.

Resumo

A leishmaniose visceral canina, causada pelo protozoário intracelular *Leishmania infantum*, é uma importante zoonose transmitida através da picada de insetos flebótomos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Os cães, considerados os principais reservatórios da doença, podem desenvolver sinais clínicos diversos, tais como linfadenopatias, hepato-esplenomegalia, perda de peso, febre, lesões oculares e de pele, e mais raramente, sintomas neurológicos. A maior parte dos animais infectados desenvolve a doença ativa, caracterizada por elevados títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e reduzida habilidade linfoproliferativa. Objetivou-se, a partir deste estudo, investigar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Foram utilizadas 20 alíquotas de LCR obtidas de 20 cadáveres de cães sorologicamente positivos para a doença, eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses de Petrolina, PE. As amostras foram submetidas ao teste ELISA S7, e anticorpos IgG anti-*Leishmania* foram identificados em uma delas. Os resultados mostraram que a *Leishmania infantum* pode causar falha nas barreiras de filtração, possibilitando a transferência de anticorpos do sangue para o compartimento do LCR, mesmo na ausência de sintomas neurológicos.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, cães, LCR, ELISA.

Introdução

O envolvimento do sistema nervoso central na LVC é considerado raro, podendo relacionar-se a quadros de alteração comportamental, convulsões, sinais clínicos sugestivos de meningite ou lesões compressivas, além de vasculites e hemorragias espinhais (VIÑUELAS et al., 2001; FONT et al., 2004; GUTTADAURO, 2004; CAUDURO et al., 2011). A inflamação granulomatosa decorrente da presença do parasita, a vasculite e o depósito de imuno-complexos nas meninges têm sido associados ao desenvolvimento dos sintomas (SARIDOMICHELAKIS, 2009). *Leishmania (Leishmania) infantum* também pode ser encontrada livre ou parasitando macrófagos do sistema nervoso central, sem a presença de reação inflamatória tecidual (PUGLIESE et al., 2006).

Anticorpos anti- *L. infantum* já foram evidenciados no líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães sintomáticos naturalmente infectados (GARCIA-ALONSO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001; LIMA et al., 2003). Sugere-se que o protozoário seja capaz de provocar a quebra da barreira hematoencefálica de filtração, acarretando na transferência de anticorpos e antígenos do sangue para o compartimento do LCR (GARCIA-ALONSO et al., 1996; BLAVIER et al., 2001; LIMA et al., 2003).

Objetivou-se neste trabalho detectar a presença de anticorpos IgG anti- *L. infantum* no Líquido Cefalorraquidiano (LCR) de animais com LVC.

Material e métodos

Foram utilizadas amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) provenientes de 20 cães com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral, nos testes de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) e/ou exame parasitológico. Os animais utilizados no presente estudo foram eutanasiados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Petrolina, estado de Pernambuco, como parte do programa de controle da LV em função da positividade nos testes de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) e/ou parasitológico. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Previamente à coleta das amostras de LCR, os animais foram submetidos a exame clínico, obtendo-se inicialmente dados referentes à anamnese, tais como estado geral do animal, sexo, idade, porte, evolução do processo e local de procedência. Em seguida,

avaliação física e neurológica foram realizadas, visando identificar sintomas relacionados à LVC.

A coleta do LCR foi realizada mediante a punção da cisterna magna com agulha hipodérmica estéril de dimensões 40cm x 12cm. Três mililitros de LCR foram coletados de cada animal, e em seguida acondicionados em tubos de polipropileno do tipo eppendorf e armazenados a temperatura de -20° C, até a realização do teste. Para a detecção de anticorpos anti-*L. infantum* nas amostras, foi utilizado o kit ELISA-S7 (Biogene Indústria e Comércio) com antígeno concentrado (3x), visando ampliar a sensibilidade do teste. Controles positivos e negativos foram incluídos na placa. Diante da concentração reduzida de anticorpos no LCR, as amostras foram diluídas na proporção 1:2 para serem submetidas ao teste ELISA.

Resultados e discussão

Todos os animais avaliados apresentavam sinais específicos da LVC, tais como dermatopatias, linfadenomegalia, perda de peso, oftalmopatias e onicofribose. Estes sinais clínicos são concordantes com outras pesquisas que os descrevem como clássicos para LVC (NOLI, 1999; FERRER, 1999; CIARAMELA e CORONA, 2003; CORTADA et al., 2004).

Não foi observado qualquer sinal clínico relacionado ao sistema nervoso. As manifestações neurológicas associadas à LVC são consideradas raras (BLAVIER et al., 2001), e podem estar ausentes mesmo na presença de degeneração neuronal (GARCIA-ALONSO et al., 1996).

À avaliação física, as amostras de líquido coletadas mostraram-se incolores, não sendo observado nenhuma alteração digna de nota, concordando com Gama et al. (2005), que asseguram a transparência destes fluidos.

Apenas uma das amostras analisadas apresentou positividade ao teste ELISA. Tal resultado difere dos achados de Viñuelas et al. (2001) e Lima et al. (2003) ao reportarem a presença de elevados títulos de IgG anti- *L. infantum* no LCR de cães infectados.

O resultado positivo obtido, concorda com os achados de Garcia-Alonso et al. (1996), Blavier et al. (2001) e Lima et al. (2003), ao citarem que a *Leishmania* sp. é capaz de provocar a quebra da barreira hematoencefálica de filtração, acarretando na transferência de anticorpos e antígenos do sangue para o compartimento do LCR.

A ausência de sintomas neurológicos nos animais deste estudo pode estar relacionada à baixa frequência de detecção de anticorpos no LCR. Segundo Lima et al. (2003), IgG anti-*L. infantum* pode ser identificado através do teste ELISA em animais apresentando sintomas neurológicos tais como convulsão, ataxia e paralisia.

Segundo Nieto et al. (1996), formas amastigotas do parasita podem ser evidenciadas parasitando o plexo coróide de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, e no interior de macrófagos em animais com quadro de meningite por *Leishmania* sp. Tal fato sugere que os anticorpos detectados em uma das amostras de líquido deste estudo podem estar relacionados à possível presença do protozoário no compartimento do LCR.

Além disso, a possibilidade da produção intratecal de anticorpos não pode ser excluída, visto que já foi evidenciada em casos de malária (FINLEY et al., 1982).

Conclusão

Anticorpos anti- *L. infantum* são encontrados no LCR de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, utilizando-se o teste ELISA. A reduzida frequência de cães com amostra de LCR obtidas neste estudo pode ser explicada pela ausência de sinais neurológicos nos animais estudados.

Referências bibliográficas

BLAVIER, A.; KEROAK, S.; DENEROLLE, Ph.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J. L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis - review. *The Veterinary Journal*, v. 162, p. 108-120, 2001.

CAUDURO, A.; FAVOLE, P.; LORENZO, V.; SIMONETTO, L.; BARDA, B.; CANTILE, C.; ASPERIO, R.M. Paraparesis caused by vertebral canal leishmaniotic granuloma in a dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 25, p.398–399, 2011.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinaria*, v. 25, n. 5, p. 358-368, 2003.

CORTADA, V.C.M.L.; DOVA, M.E.C.; SOUZA-LIMA,M.A.A.; OSHIRO, E.T.; MENEZES, C.R.V.; ABREUSILVA,A.L.; CUPOLILO, E.; SOUSA, C.S.F.; CARDOSO, F.O.; ZAVERUCHA-DO-VALE, T.; BRAZIL, R.P.;CALABERSE, K.S.; GONÇALVES-DA-COSTA, S.C. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State Brazil. *Veterinary Research*, v. 28, p. 365-474, 2004.

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

FINLEY, R.W. et al. Virulent *P. bergeri* malaria: prolonged survival and decreased cerebral pathology in T cell deficient nude mice. *Journal of Immunology*, v. 129, p. 2313-2318, 1982.

FONT, A.; MASCORT, J.; ALTIMIRA, J.; CLOSA, J.M.; VILAFRANCA, M. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, v. 45, p. 199-201, 2004.

GAMA, F. G. V.; NISHIMORI, C. T.; SOBREIRA, M. R.; SANTANA, A. E. Caracteres físico-químicos e citológicos do líquido de cães em diferentes fases da cinomose. *Ciência Rural*, v. 35, n. 3, p. 596-601, 2005.

GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, C.G.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humor and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunology*, v. 18, p. 539-546, 1996.

GUTTADAURO, S. Intracranial granuloma in a leishmaniasis-affected dog. In: Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis. Naples, Italy, *SCIVAC*, p. 84, 2004.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 485-489, 2003.

NEVES, I. V.; TUDURY, E. A.; DA COSTA, R. C. Fármacos utilizados no tratamento das afecções neurológicas de cães e gatos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 3, p. 745-766, 2010.

NIETO, C.G.; VIÑUELA, J.; BLANCO, A.; GARCIA-ALONSO, M.; VERDUGO, S.G.; NAVARRETE, I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. *Veterinary Record*, v. 139, p. 346-347, 1996.

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

PUGLIESE, A.; DI PIETRO, S; GIUD, E. Clinical and diagnostic patterns of leishmaniasis in the dog. *Veterinary Research Communications*, v. 30, n. 1, p. 39-43, 2006.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: eoidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 471-489, 2009.

VIÑUELAS, J.; GARCÍA-ALONSO, M.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRÓN, C.; CARCELÉN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 101, p. 23-27, 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

- Anticorpos IgG anti- *L. Infantum* são encontrados, através do teste ELISA S7, no LCR, no humor aquoso e no líquido sinovial de cães naturalmente infectados. Tal resultado pode estar relacionado à resposta imunomediada específica associada à presença do parasita no compartimento do LCR e nos ambientes intra-ocular e intra-articular

- Formas amastigotas de *L.infantum* podem ser encontradas parasitando a conjuntiva e a membrana sinovial de cães naturalmente infectados, sendo evidenciadas dentro de macrófagos associadas, ou não, a infiltrados histiolinfoplasmocitários.