

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MARCO ANTÔNIO GRANJA BARBOSA

PREVALÊNCIA, AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DE  
CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758) NATURALMENTE  
INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA &  
CHAGAS, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE TAMANDARÉ,  
REGIÃO LITORAL SUL DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

RECIFE

2010

Ficha catalográfica

B238p      Barbosa, Marco Antônio Granja  
Prevalência, avaliação clínica e imunológica de cães  
(*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados  
por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (Cunha & Chagas,  
1937) provenientes do município de Tamandaré, região  
litoral sul do Estado de Pernambuco, Brasil / Marco Antônio  
Granja Barbosa. -- 2010.  
107 f. : il.

Orientador: Lêucio Câmara Alves.  
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina  
Veterinária, Recife, 2010.  
Inclui referências e anexo.

1. Leishmaniose visceral canina 2. Epidemiologia  
3. Resposta imune 4. Distribuição espacial I. Alves, Lêucio  
Câmara, orientador II. Título

CDD 636.089444

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MARCO ANTÔNIO GRANJA BARBOSA

**PREVALÊNCIA, AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DE  
CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758) NATURALMENTE  
INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA &  
CHAGAS, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE TAMANDARÉ,  
REGIÃO LITORAL SUL DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência  
Veterinária do Departamento de  
Medicina Veterinária da  
Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como parte dos  
requisitos à obtenção do título de  
Doutor em Ciência Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE

2010

MARCO ANTÔNIO GRANJA BARBOSA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DE CÃES (*Canis familiaris*)  
(LINNAEUS, 1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR  
*Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)  
PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE TAMANDARÉ, REGIÃO  
LITORAL SUL DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

EXAMINADORES:

---

Profa. Dr Miriam Nogueira Teixeira

---

Profa. Dra. Norma Vollmer Labarthe

---

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia

---

Profa. Dra. Gílcia Aparecida de Carvalho Silva

---

**DEDICO ESTE TRABALHO**

***A Deus....***

***Ao meu pai, Osmar Gomes Barbosa, que foi um exemplo de homem para mim em todos os momentos da minha vida, tenho certeza que onde quer que esteja torce por mim***

***À minha mãe, Sônia Granja, que me deu força sem a qual não realizaria este sonho.***

***A todos os meus professores e amigos que sempre me apoiaram nestes anos da minha vida.***

***Aos animais, pois sem eles, o que seria do homem?***

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus pela força de vontade, saúde, pela superação, sem sua ajuda divina nada teria se concretizado.

A minha mãe, pelo amor incondicional, pelo apoio em todas à horas, muitas vezes pela ajuda financeira, a quem tenho certeza que tem grande responsabilidade na realização desta tese.

Ao Professor Doutor, Orientador, Pai, Amigo, Leucio Câmara Alves, por estar presente todos esses anos na minha vida acadêmica. Orientando, ajudando, em todos os sentidos, pela responsabilidade, pela dedicação incansável, por abrir portas ao mundo. Meu mais sincero obrigado.

A Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes pela orientação, pela ajuda, compreensão, carinho, amizade e atenção, nunca me deixando faltar nada durante o tempo em que passei em Lisboa. Pela oportunidade que me deu de conhecer um outro país, um grande centro de pesquisa, e conhecimento que me passou.

A professora Maria Aparecida da Glória Faustino, a quem sempre tive carinho e respeito, e que muitas vezes esteve presente na minha formação, pela pessoa generosa e atenciosa em todos os momentos.

Ao Professor Doutor Frederico Celso Lyra Maia, pela amizade, pelo conhecimento que transmitiu todos esses anos.

Ao Professor Doutor Flávio Ribeiro de Araújo, pela oportunidade de conhecer um grande centro de pesquisa no Brasil, a Embrapa, e pela consideração para comigo no período em que passei em Campo Grande-MS.

A todos os amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRPE: Danillo, Rafael, Mariana Galindo, Mariana França, Edna Michelly, Alessandra D'Alencar, Márcia Paula, Ivana, Andréa, Antônio Amélia, Marília, Hévila, George, pessoas que conviveram comigo todos esses anos e que dividimos momentos de trabalho e lazer.

A Guiomar, pelo carinho e consideração durante todos esses anos.

Aos Colegas do Hospital Harmonia, pela compreensão em todos os momentos difíceis e pela amizade.

Aos amigos do Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa: Marta, às Sophias, Nuno Miguel, às Mônicas, Carla, Karina, Manoel, Ana Farinha, Cláudia Marques, Olivia Rodrigues, aos funcionários do Instituto José Manoel e João Ramada, pela amizade e carinho com o qual me acolheram em Portugal.

Ao amigo Carlos Ramos, pela ajuda na realização de parte dos teste em Campo Grande, pois sem sua ajuda, não teria conseguido.

Aos funcionários da Secretária de Saúde do Muncípio de Tamandaré, especialmente o Dr. Renato, Alexandre Lins e Gilberto que foram importantes na realização deste trabalho.

À Capes pela bolsa concedida durante o meu doutorado, pela bolsa do estágio no exterior.

A Pós-Graduação em Ciência Veterinária, pela contribuição à Medicina Veterinária, pela minha formação como futuro docente.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco a qual me dediquei 14 anos, incansáveis, de muita luta, superação, e alegrias.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**CVL** – Canine Visceral Leishmaniasis

**CO** – Cut-off

**CPqAM** – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

**DMV** – Departamento de Medicina Veterinária

**DNA** – Ácido Desoxirribonucléico

**DO** – Densidade Ótica

**EIE-LVC** – EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos

**ELISA** - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz

**FUNASA** – Fundação Nacional de Saúde

**GPS** - Global Positioning System

**GIS** – Geographical information system

**IC** – Intervalo de Confiança

**IFI** – Imunofluorescência Indireta

**INF** – Interferon

**LV** – Leishmaniose Visceral

**LVC** – Leishmaniose Visceral Canina

**LVH** – Leishmaniose Visceral humana

**PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase

**RS** – Remote sensing

**S** – Sensibilidade

**TNF** – Tumor of Necrosis Factor

**UFRPE** – Universidade Federal Rural de Pernambuco

**VL** – Visceral Leishmaniasis

**WHO** – World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO II

Figure 1 - General distribution of Canine Visceral Leishmaniasis prevalence (red dots – positive cases and yellow dots negative cases) in Tamandaré County in relation to vegetation (green) and hydrology (blue) **PÁG. 61**

### CAPÍTULO III

Figure 1 - Levels of IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 expressed by leucocytes isolated from peripheral blood of healthy, asymptomatic, symptomatic and treated dogs.  $*(p<0.05)$  indicates statistically significant differences in comparison to healthy dogs.

**PÁG. 90**

Figure 2 - Levels of IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 expressed by lymph nodes (A) and bone marrow (B) of healthy, asymptomatic, symptomatic and treated dogs.  $*(p<0.05)$  indicates statistically significant differences in comparison to healthy dogs.

**PÁG. 91**

## SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	3
1- Revisão de Literatura	4
2- Etiologia	7
3- Leishmaniose Visceral Canina	8
3.1 Inquéritos soropidemiológicos	8
4. Imunologia	10
4.1 Papel dos neutrófilos e macrófagos	10
4.2 Linfócitos T	11
4.3 Linfócitos B	13
4.4- Papel das imunoglobulinas na imunidade da Leishmaniose Visceral canina	13
4.5- Citocinas	15
5- Sinais clínicos	18
6- Diagnóstico	20
7- Referências	22
8 -Objetivos	40
8.1- Objetivo Geral	40
8.2- Objetivos específicos	40

**9. CAPÍTULO I - PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758) INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) Chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO TAMANDARÉ, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL. 41**

Resumo	42
Abstract	43
1- Introdução	44
2 -Material e métodos	46
2.1- Área estudada	46
2.2- Animais	46
2.3- Avaliação Clínica	47
2.4- Obtenção do plasma para exame sorológico	47
2.5- Teste Sorológico – ELISA	47
2.6- Análise estatística	48
3 - Resultados e discussão	48
4 - Conclusão	51
5 - Referências	51

**10. CAPÍTULO II - Spatial correlation between Canine Visceral Leishmaniasis and environmental factors in Tamandaré municipality, Pernambuco State, Brazil.**

<b>Short communication</b>	<b>57</b>
Abstract	58

**11. CAPÍTULO III - Balance of cytokine expression in tissues of dogs where *Leishmania infantum* /*chagasi* usually persists** 66

Abstract	67
1 - Introduction	68
2 - Material e methods	71
2.1- Local	71
2.2- Animals	71
2.3- Biological Samples	72
2.4- Immunologic tests	73
2.5- Hematological and Biochemical parameters	73
2.6- RNA straction	74
2.7- Realtime PCR analysis	74
2.8- Primers Sequences	75
2.9- Statistical analysis	75
3- Results	76
3.1- Clinical examination and laboratorial findings	76
3.2- Humoral responses	77
3.3- Levels of cytokine expressed by peripheral blood leucocytes	77
3.4- Levels of cytokine expressed by lymph nodes and bone marrow	77
4- Discussion	78

5- References	84
---------------	----

**12. CAPÍTULO IV - Levels of *Leishmania chagasi* specific IgG2 in symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected using CPX2** 92

Abstract	93
----------	----

1- Introduction	94
-----------------	----

2- Material and methods	95
-------------------------	----

2.1- Animals	95
--------------	----

2.2- Clinical and serological examination	95
---	----

2.3- Parasites, antigens and ELISA using CPX2 protein	96
---	----

2.4- Statistical analysis	97
---------------------------	----

3- Results and discussion	97
---------------------------	----

4- Conclusion	99
---------------	----

5- References	99
---------------	----

13- Conclusões Gerais	103
-----------------------	-----

14- Anexos	105
------------	-----

14.1- Anexo 1- Ficha de identificação animal	106
--	-----

14.2- Anexo 2- Termo de consentimento livre e esclarecido	107
---	-----

## Resumo

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) no Brasil é causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi* a qual é relatada em várias regiões. O objetivo desta pesquisa foi verificar a prevalência, analisar a correlação espacial entre a Leishmaniose Visceral Canina e fatores ambientais, avaliar e comparar os níveis de citocinas (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4) expressões por PCR em tempo real em diferentes tecidos/órgãos, determinar os padrões bioquímicos e hematológicos em cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum / chagasi* e também avaliar os níveis de IgG2 específicos para *Leishmania chagasi* em cães sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados utilizando-se a proteína CPX2. Cães do Município de Tamandaré, Pernambuco, Brasil, foram investigados quanto aos sinais clínicos relacionados à Leishmaniose Visceral Canina. Os soros foram analisados pelo teste ELISA para anticorpos anti-Leishmania, e de acordo com a sorologia, para os cães positivos e negativos foram atribuídas coordenadas através da utilização de um GPS portátil. Os pontos foram registrados no município e analisados no ArcGIS utilizando-se a "Correlação Espacial de Moran's ", para distinguir agrupamento com base nas variáveis da vegetação e hidrologia. A avaliação dos níveis de citocinas (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4) foi feita por PCR em tempo real em diferentes tecidos/órgãos de cães adultos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum/chagasi*, e foram determinados os parâmetros bioquímicos e hematológicos em cães sintomáticos e assintomáticos com LVC. O inquérito sorológico apresentou 20,40% dos animais positivos sendo que 80,1% dos cães positivos eram assintomáticos. Por outro lado, as correlações entre todos os pontos e fatores ambientais, tipo de vegetação e hidrologia que foram



agrupados apresentaram menos de 1% de probabilidade, não mostrando relação. Os animais sintomáticos apresentaram expressão aumentada de IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4, quando comparado com cães do grupo controle, enquanto que animais assintomáticos e os cães tratados para LVC revelaram aumento significativo de IL-4. A expressão da IL-12 e IL-2 foi significativamente aumentada nos linfonodos de cães assintomáticos. Os animais tratados apresentaram níveis significativamente mais altos de IL-12 na medula óssea quando comparados com cães do grupo controle, infectados sintomáticos ou assintomáticos. A determinação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em cães sintomáticos e assintomáticos mostrou que, os cães do grupo sintomático além dos sinais clínicos também apresentavam anemia normocítica e normocrômica, hipergamaglobulinemia e azotemia. O resultado do teste ELISA utilizando a proteína CPX2 mostrou positividade para anticorpos IgG2 em 41,01% dos cães, contudo foi observada reação cruzada com outras doenças infecciosas. Como o cão é o principal reservatório no Brasil e a infecção canina precede os casos em humanos, os resultados aqui observados indicam que medidas de controle devem ser aplicadas na população canina no município de Tamandaré a fim de evitar casos humanos.

## Abstract

Canine Visceral Leishmaniasis (CanL) in Brazil is caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and it has been reported in some cities. The goal of this research was to verify the prevalence, analyze the spatial correlation between CanL and environmental factors, evaluate and compare the levels of cytokine (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4) expressions by Realtime-PCR in different tissues/organs and also determination of hematological and biochemical patterns in dogs naturally infected by *L. (L.) infantum/chagasi* and also evaluate the levels of *Leishmania chagasi* specific IgG2 antibodies in symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected using CPX2. First of all the dogs from Tamandare county, Pernambuco, Brazil were investigated for clinical signs related to Canine Visceral Leishmaniasis (CanL) and sera were analyzed by ELISA test for anti-*Leishmania* antibodies. According to serology, the positive and negative cases in were each assigned coordinates through the use of a handheld GPS. The cases were plotted throughout the county, and the points were loaded into arcGIS and the layers were analyzed using "Moran's I Spatial Autocorrelation" to distinguish clustering based on the variables vegetation and hydrology. Later the evaluation of cytokine levels (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4) was made by Realtime-PCR in different tissues/organs from adult dogs naturally infected by *L. (L.) infantum/chagasi*, and determination of hematological and biochemical parameters in symptomatic and asymptomatic dogs and after of CanL was performed. The serological survey showed 20.40% of animals were positive to serological test and 80.1% of positive dogs were asymptomatic animals. On the other hand the correlations between all points and environmental factors, such vegetation and hydrology were found to be

clustered with less than 1% likelihood due to random chance. Symptomatic animals showed increased expression of IL-12 IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 when compared with healthy dogs. Asymptomatic animals and dogs that had been subject to treatment against CanL revealed significant augments of IL-4. Significantly increased in lymph nodes of IL-12 and IL-2 expression was observed in asymptomatic dogs. Treated animals showed significant high levels of IL-12 in bone marrow when compared with healthy, symptomatic and asymptomatic dogs. The determination of hematological and biochemical parameters in symptomatic and asymptomatic dogs and after of CanL showed that dogs of symptomatic group exhibited not only clinical signs compatible with leishmaniasis but also normocytic and normochromic anaemia, hypergammaglobulinemia and increase of blood urea. The results of the CPX2 ELISA showed 41.01%) of dogs were positive to IgG2 antibodies, but cross reaction with non-leishmaniasis disease was observed. As the dogs is the reservoir in Brazil and the canine infection precedes the human cases, these findings indicate that control measures must be apply in dog population from Tamandaré County in order to prevent human cases.

## 1. Revisão de Literatura

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose que está presente em mais de 72 países e que 90% dos casos em todo mundo estão presentes em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (OLIVEIRA et al., 2006).

A número de óbitos da doença é estimado em 59.000 por ano, em todo o mundo, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um grave problema para a saúde pública (SILVA et al., 2008).

No Brasil, sabe-se que a doença ocorre em 19 dos 27 estados da federação (NAVEDA et al., 2006, ANDRADE et al., 2007, JULIÃO et al., 2007, NUNES et al., 2007), com exceção dos estados da região sul (NAVEDA et al. 2006, KRAUSPENHAR et al., 2007), sendo a maior concentração de casos humanos registrados na Região Nordeste (LANGONI et al., 2005, ANDRADE et al., 2007, SILVA et al., 2008).

O inseto implicado como vetor da LV na América Latina e no Brasil é o *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ E NEIVA, 1912) díptero, flebotomíneo, também denominado flebótomo (SILVA, 2007).

A transmissão se dá através da picada do inseto infectado (SILVA e BRAGA, 2008). Outras formas de transmissão incluem as vias sanguínea (OTERO et al., 2000, OWENS et al., 2001) , placentária (MASUCCI et al., 2003, DUBEY et al., 2005) e via sêmen (DINIZ et al., 2005) sem, entretanto importância do ponto de vista epidemiológico.

Os hospedeiros silvestres da *L. chagasi* até agora conhecidos são as raposas e os marsupiais. Duas espécies de raposas foram encontradas naturalmente infectadas e são implicadas como reservatórios nas áreas não

urbanas: raposa do campo (*Lycalopex vetulus*) e a raposa (*Cerdocyus thous*) (SILVA, 2007, LUPPI et al., 2008) além de marsupiais do gênero *Didelphis*. O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos, poderia promover a ligação entre os ciclos silvestres e domésticos (GONTIJO e MELO, 2004).

Silva, (2007) afirma que existem também relatos indicando roedores como reservatórios da LV em áreas rurais e peri-urbanas e que outros animais podem compor o cenário epidemiológico da LV em áreas endêmicas, pois, mesmo com a retirada de todos os cães soropositivos, o ciclo de transmissão da doença ainda pode existir.

O cão doméstico (*Canis familiaris*) desempenha grande importância na epidemiologia da LV em áreas endêmicas, pois é o único reservatório doméstico da LV em áreas urbanas (SILVA et al., 2005, SILVA, 2007).

Do ponto de vista epidemiológico, a infecção canina é mais importante que a infecção humana, pois a precede, além de ser mais prevalente e apresentar grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitos na derme (BONATES, 2003).

Sendo assim, em áreas urbanas endêmicas para LV, os cães domésticos representam o principal reservatório para a infecção por *Leishmania* sp. (PARANHOS-SILVA et al., 1996, TAFURI et al., 1996, SAVANI et al., 2003, BARBOSA DE DEUS et al., 2002, BARROUIM-MELO et al., 2004, CANELA et al., 2004, LANGONE et al., 2005, DANTAS-TORRES, 2006, MOREIRA et al., 2007, SILVA et al., 2008).

## 2. Etiologia

A Leishmaniose Visceral tem como agente etiológico um protozoário dimórfico, (POCAI et al., 1998), da ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, e gênero *Leishmania* (POCAI et al., 1998, WILSON et al., 2005, KRAUSPENHAR et al., 2007, COSTA et al., 2007, TAVORA et al., 2007), espécie *Leishmania chagasi/Leishmania infantum* (QUINNELL et al., 2001, LANGONI et al., 2005, STRAUSS-AYALI et al., 2005, DANTAS-TORRES, 2006, SHAW, 2006, LAGE et al., 2007, STRAUSS-AYALI et al., 2007).

No passado considerava-se *L. infantum* e *L. chagasi* como duas espécies diferentes (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2004, SHAW, 2006), apesar de ainda existirem controvérsias em relação a sua real classificação (SILVA, 2007), estas espécies atualmente são consideradas sinónimas e não subespécies, devido ao fato de não haver diferenças na biologia molecular destas (GONTIJO e MELO, 2004, WILSON et al., 2005, DANTAS-TORRES, 2006, SILVA, 2007),

A *L. infantum/chagasi* é um parasito intracelular obrigatório (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2004), possui ciclo biológico heteroxênico, necessitando assim de dois hospedeiros, um vertebrado (KAMHAWI, 2006), representado por canídeos silvestres ou domésticos, além de roedores e humanos, e de um invertebrado representado pelo inseto vetor (KAMHAWI, 2006, SILVA, 2007).

### **3. Leishmaniose Visceral Canina**

#### **3.1 Inquéritos soroepidemiológicos**

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença sistêmica crônica, presente na Europa, Ásia, Norte da África e América do Sul (TRAVI et al., 2002, LIMA et al., 2003, CARDOSO et al., 2007).

Na Espanha, França, Itália e Portugal, estima-se que 2,5 milhões de cães estejam infectados por *Leishmania* sp, não existindo nas Américas estimativas da infecção (ALMEIDA et al., 2009).

No Brasil, recentes estudos mostram que a doença tem adquirido, características peri-urbanas devido ao êxodo rural, que teve com consequência o aumento da população sem condições financeiras, degradação de florestas e assentamentos da população nestas regiões (SILVA et al., 2008 e LANGONI et al., 2005, RONDON et al., 2008).

Na região Centro Oeste, Almeida et al., (2009) e Azevedo et al., (2008) observaram prevalência de 3,4% em bairros de Cuiabá (MT) e 7,8% na população canina proveniente de em Poxoreó (MT) respectivamente, sendo observado fatores como presença de cães na região peridomiliar, moradias em proximidades a terrenos baldios e presença de outros animais domésticos como galinhas..

No sudeste brasileiro, particularmente no estado de Minas Gerais, a soroprevalência variou de 1,4% em Pedro Leopoldo utilizando-se RIFI, 3% na cidade de Bom Sucesso, 5% em Monte Claros até 64% na cidade de Belo Horizonte, na dependência da cidade e tipo de teste diagnóstico utilizado (NAVEDA et al., 2006; SILVA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2001).

Já no estado de São Paulo, Savani et al., (2003) determinaram ser de 0,57% (12/2104) a prevalência da infecção em cães da cidade de São José do Rio Preto utilizado-se o RIFI, e 9% em Araçatuba –SP sendo a maior concentração em bairros de periferia onde a reposição de animais após eliminação dos casos positivos ocorre com grande frequência (ANDRADE et al., 2007). Em Barra Mansa no Rio de Janeiro foi verificada soropositividade de 10,5% utilizando-se RIFI e ELISA (Figueiredo et al., 2009), já no município de Barra de Guaratiba-Rio de Janeiro, Silva et al., (2005) observaram durante o período de 2001 a 2002, prevalência superior a 25%.

À semelhança da leishmaniose visceral, a LVC registra o maior número de casos na região Nordeste. Em São José de Ribamar (MA) a soroprevalência variou de 21 até 25% (GUIMARÃES et al., 2005); em Fortaleza, o primeiro estudo soroepidemiológico realizado por Alves et al. (1998) registrou 1,59 de positividade, já em 2008 a soroprevalência observada foi 26,2%, período onde foram eutanaziados 1136 cães (RONDON et al., 2008); Na cidade de Mossoró-RN, considerada área endêmica, com prevalência de 33,7% até 2004, foi verificada soroprevalências de 45% e 34% na zona urbana e rural respectivamente (AMORÁ et al., 2006); Já na Bahia há uma grande variação da soroprevalência sendo em Feira de Santana – BA 0,6% (OLIVEIRA e ARAÚJO 2003) e Camaçari , 21,7% (JULIÃO et al., 2007). Acredita-se que o aumento desta soroprevalência esteja associado a fatores como migração populacional do homem, ocupação desordenada, falta de saneamento básico, degradação do ambiente e adaptação do parasita ao novo nicho ecológico (AMORÁ et al., 2006, RONDON et al., 2008)

No estado de Pernambuco, a frequência da infecção foi observada no município de São Vicente de Ferrer, agreste Pernambucano, onde a prevalência



variou de 4,8% a 33%, utilizando-se métodos sorológicos e moleculares respectivamente (CARVALHO et al., 2005). No município de Itamaracá as taxas de prevalência variaram de 27,78% (MARINHO, 1996) a 9,09% (SANTOS, 2006) e 40,3% na cidade de Paulista, Região Metropolitana do Recife.

## **4. Imunologia**

### **4.1 Papel dos neutrófilos e macrófagos**

Awashi et al., (2004) afirmaram que na infecção pela *Leishmania major* as células polimorfomucleares (neutrófilos) possuem papel contraditório.

Estas células são as primeiras a chegarem ao local da infecção e desempenham papel importante na fagocitose do parasito, o que implica na secreção de quemoquinas que recrutam mais neutrófilos para o local de infecção, porém não recrutam outras células como as natural killer (NK) e monócitos, o que pode ser um fator importante para a manutenção da infecção (VAN ZANDBERGEN et al., 2002)

Os neutrófilos desempenham a função de secretar substâncias quimiotáticas para o início de atividade anti-leishmania de células T (VAN ZANDBERGEN et al., 2002, AWASTHI et al., 2004).

*Leishmania* spp parasitam e replicam-se nos macrófagos na pele, no local da infecção, podendo ser disseminados via linfática ou sanguínea, infectando desta forma macrófagos da medula óssea, linfonodos, fígado, baço, rins e trato intestinal de cães (LAGE et al., 2007).

Após a infecção os linfócitos T induzem a produção de citocinas que ativam macrófagos para eliminar estes parasitas intracelulares (PINELLI et al., 2000), ocorrendo então, produção de algumas substâncias antimicrobianas como oxigênio reativo intermediário (ORI), juntamente com nitrogênio reativo intermediário (NRI), hidrolases lisossomais, peptidases neutras e o óxido nítrico (ON) (PINELLI et al., 2000, AWASTHI et al., 2004), sendo esta última a mais importante substância leishmanicida (PINELLI et al., 2000).

Não obstante, uma variedade de estímulos pode induzir mudanças funcionais, morfológicas e bioquímicas dos macrófagos ativados, que produzem citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18, IL-12 e IFN- $\gamma$ , que são adjuvantes efetivos e pré-requisitos para a resposta Th1 nas infecções (MUNDER et al., 1998, AWASTHI et al., 2004). Sendo assim a sobrevivência da *Leishmania* spp intracelular dependem da habilidade desta em escapar destes mecanismos (COSTA-VAL et al., 2007).

Apesar dos macrófagos serem responsáveis pelo controle da replicação de parasitos, podem causar injúrias nos hepatócitos devido à liberação de substâncias anti-leishmania (WILSON e WEINSTOCK, 1996, GOMES-PERERIRA et al., 2004).

## **4.2 Linfócitos T**

Na leishmaniose visceral humana e experimental em animais, a imunidade mediada pelos linfócitos T é predominante (GOTO e LINDOSO, 2004).

Existem evidências clínicas e experimentais que a resolução da infecção pela *Leishmania* spp está relacionada com a resposta às células T, mediada por

macrófagos ativados e citocinas derivadas destas células (SANTOS-GOMES et al., 2002).

Sendo assim, indivíduos que tem capacidade de controlar a infecção possuem uma resposta Th1 com produção específica de citocinas do eixo Th1 enquanto pacientes com LV mostram resposta Th1 deficiente e produção de IL-10 (LAGE et al., 2007).

Na LVC, animais assintomáticos tem sido associados com resposta proliferativas e produção de citocinas específicas Th1, além de baixos títulos de anticorpos, ao contrário, animais doentes apresentam depressão na resposta mediada por células e altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* spp (SANTOS-GOMES et al., 2002, LAGE et al., 2007).

Os primeiros estudos com ratos BALB/6 mostraram a importância dos linfócitos T e das células T CD4+ e CD8+ na proteção do hospedeiro contra a *Leishmania* spp e na formação de granulomas hepáticos (GOTO e LINDOSO, 2004) e esplênicos (WILSON e WEINSTOK, 1996).

Em estudos experimentais, observou-se em ratos infectados com *L. donovani*, um sincronismo dos linfócitos T CD4+ com a ativação dos CD8+, possivelmente devido à produção de IL-2 pelas células T CD4+ e produção de IFN- $\gamma$ , e que os linfócitos CD8+ estão envolvidos com resistência a doença (GOMES-PEREIRA et al., 2004). Em cães assintomáticos, experimentalmente infectados com *L. infantum*, linfócitos CD8+ são detectados, porém não são encontrados em animais sintomáticos (GOMES-PEREIRA et al., 2004).

Sendo assim, os linfócitos T CD8+ podem desempenhar papel importante na imunidade primária tanto contra a *L. major* quanto a *L. donovani*, estando

relacionado com a produção de linfocinas para ativação de macrófagos, INF- $\gamma$  em tecidos linfóides e na imunidade de memória contra reinfecção por *L. major* (MULLER et al., 1993).

### **4.3 Linfócitos B**

A ativação de células B policlonais pode ser observada na leishmaniose visceral humana e experimental, porém o papel das células B na imunidade da LV ainda é pouco esclarecido. Sabe-se, entretanto que a resistência à doença está relacionada com a depleção destas células enquanto a susceptibilidade está relacionada ao aumento destas (GOTO e LINDOSO, 2004).

### **4.4 Papel das imunoglobulinas na imunidade da Leishmaniose Visceral Canina**

Atualmente, considera-se a LVC como uma enfermidade imunomediada, (SLAPPENDEL E FERRER, 1990, LOPEZ et al., 1996, STRAUSS-AYALI et al., 2005, FERRER, 2002; FERRER, 2003). Numa infecção por *Leishmania sp*, as células do sistema fagocítico mononuclear infectadas, atuam como células apresentadoras de antígenos, estimulando os linfócitos T (SLAPPENDEL e FERRER, 1990, FERRER et al., 1995, LOPEZ et al., 1996, NOLI, 1999).

Segundo Mathias et al., (2001) na LV ocorre hipergamaglobulinemia, devido à ativação de linfócitos B policlonais, como conseqüência do desequilíbrio na regulação de linfócitos T (LOPEZ et al., 1996; SLAPPENDEL e FERRER, 1990), com conseqüente geração de anticorpos anti-*Leishmania* os quais, não são primariamente importantes para a proteção, e sim, envolvidos com a patogênese (MATHIAS et al., 2001), em função da grande quantidade de anticorpos, ocorrerá assim a formação de complexos antígeno anticorpo circulantes, que se depositam nas paredes dos vasos sanguíneos, principalmente olhos, pele, articulações e rins (LOPEZ et al., 1996; SLAPPENDEL e FERRER, 1990).

Provavelmente a resposta à infecção pela *Leishmania* spp não é exclusivamente uma resposta celular ou humoral, mas sim uma combinação de respostas Th1 e Th2 com um grande espectro de respostas presentes (INIESTA et al., 2007).

A associação entre os níveis de IgG1 e IgG2 e os linfócitos Th1 e Th2 deve ser feita de maneira cuidadosa uma vez que a polarização da resposta imunitária (Th1, Th2) em cães não é clara, além da natureza do tipo de citocinas produzida (AWASTHI et al., 2004)

O desenvolvimento de imunidade celular está relacionado com a imunocompetência do hospedeiro enquanto que o aparecimento dos sinais clínicos está associado com a imunidade humoral apresentando altos níveis de anticorpos (PINELLI et al., 1994, LEANDRO et al., 2001, SOLANO-GALLEGOS et al., 2003, CARDOSO et al., 2007).

Estudos soroepidemiológicos realizados em áreas endêmicas demonstraram que muitos cães assintomáticos apresentam anticorpos anti-*Leishmania* sp que

podem ser mantidos durante anos sem o desenvolvimento da doença (ABRANCHES et al., 1991).

Vários estudos têm demonstrado níveis elevados de IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* spp específicos em cães com infecção natural e/ou experimental (DEPLAZES et al., 1995; LEANDRO et al., 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

Cardoso et al., (2007) e Iniesta et al., (2007) observaram níveis altos de IgG2 em cães com doença clínica, quando comparados com animais assintomáticos, da mesma forma observado por Santos-Gomes et al., (2002) em infecção natural e experimental, enquanto que os níveis de IgG1 obtidos apresentaram elevada variabilidade.

Entretanto, Iniesta et al., (2007) registraram que a resposta a LV em cães, consta de uma associação de anticorpos das classes IgG1, IgG3 e IgG4.

Nieto et al., (2009) afirmaram que a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp não é conclusivo para determinar o progresso da doença, porque todos os animais infectados possuem uma resposta humoral intensa. Contudo, ainda observaram em animais sintomáticos altos níveis de IgG, ressaltando que o dicótomo da resposta IgG1 pode estar associada à doença crônica.

#### **4.5 Citocinas**

Estudos realizados em infecções humanas e em modelos roedores sugerem que a completa resolução da doença depende da habilidade do hospedeiro na liberação de células T com ativação de macrófagos mediados por citocinas

derivadas da resposta Th1 (BRACHELENTE et al., 2005, PINELLI et al., 1994, 1995, NOLI, 1999, PINELLI et al., 1999, CORRÊA et al., 2007).

Todavia, tanto na LV humana quanto na canina, ainda não se pode afirmar que a resposta Th1 está relacionada com a resistência e possível cura da doença e a resposta Th2 com o desenvolvimento dos sinais clínicos. No entanto, um equilíbrio de ambas as respostas Th1 e Th2 podem ser importantes no controle da replicação de parasitos, resistência a infecção e até mesmo cura (STRAUSS-AYALI et al., 2005).

Strauss-Ayali et al., (2007) encontraram resposta Th1 e Th2 no baço de cães infectados, oligossintomáticos e polissintomáticos, e sugeriram que esta resposta não foi capaz de controlar a multiplicação de parasitos neste órgão.

A resposta elucidada pelos linfócitos Th1 confere proteção ao hospedeiro pela produção de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e IL-12 (CABRAL et al., 1992; PINELLI et al., 1994 e 1995; LIEW et al., 1999, NOLI et al., 1999, HABIBI et al., 2001, STRAUSS-AYALI et al., 2005) que estimulam a produção de células citotóxicas específicas para o parasito, ativação de macrófagos pelo IFN- $\gamma$  resultante da produção de óxido nítrico (LAGLER et al., 2002; MANNA et al., 2006), e baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* sp (CHAMIZO et al., 2005) desempenhando um papel importante para o controle da doença (D'OLIVEIRA JUNIOR et al., 2002). Cães assintomáticos têm sido associados com resposta proliferativa específica Th1 (PINELLI et al., 1999, QUINELL et al. 2001).

A IL-12 é produzida por células inflamatórias como monócitos, neutrófilos e células dendríticas em resposta a parasitas intracelulares, induzindo a produção de IFN- $\gamma$  pelas células natural killer (STRAUSS-AYALI et al., 2005). Linfócitos T CD8+

também induzem a produção de INF- $\gamma$  desempenhando papel importante na manutenção da resposta Th1 (AWASHI et al., 2004).

Apesar de vários estudos citarem o INF- $\gamma$  como peça chave na resistência a infecção (GOTO e LINDOSO, 2004, STRAUSS-AYALI et al., 2005). Quinnell et al., (2005) e Lage et al., (2007) afirmam que a expressão de IFN- $\gamma$  não é um indicador de resistência a doença, visto que pacientes assintomáticos e polissintomáticos apresentam expressões similares em seus tecidos.

No entanto, cães com sintomatologia clínica apresentam uma diminuição da função dos linfócitos Th1 (MANNA et al., 2006), devido a ação da IL-10, redução da expressão de INF- $\gamma$  e IL-2 e elevados títulos de anticorpos (SANTOS-GOMES et al., 2002, STRAUSS-AYALI et al., 2005), além de expressão de IL-4 (QUINNELL et al., 2001).

Desta forma, a susceptibilidade dos cães à doença está relacionada com as células Th2, que produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 as quais inibem a ação dos macrófagos, promovem a ação de plasmócitos, promovem a proliferação de células B (PINELLI et al., 1999) e geração de anticorpos (NOLI, 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

O papel da IL-4 na leishmaniose visceral ainda permanece inexplicado (GOTO e LINDOSO, 2004, STRAUSS-AYALI et al., 2007). No entanto Strauss-Ayali et al., (2007) associaram cães com sinais clínicos graves à presença de maior expressão desta citocina (CHAMIZO et al., 2005), sugerindo assim que a IL-4 pode ter papel fundamental na inabilidade do hospedeiro em produzir resposta Th1 devido a inativação de macrófagos nos estágios iniciais da doença, facilitando a replicação do parasito.



## 5. Sinais Clínicos

De acordo com a literatura, podem-se agrupar os cães infectados em três categorias de acordo com os sinais clínicos apresentados. Os assintomáticos, os oligossintomáticos, apresentando linfadenopatia, perda de peso, e/ou alopecia (COSTA-VAL et al., 2007), e os polissintomáticos (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997, BARROUIN-MELO et al., 2004, COSTA-VAL et al., 2007, MOREIRA et al., 2007).

Os cães assintomáticos possuem variabilidade à proliferação linfocítica e pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., podendo permanecer sem sinais clínicos ou desenvolver poucos sintomas que desaparecem espontaneamente (ALMEIDA et al., 2005). Estima-se que 50% dos cães infectados não apresentam sinais da doença (ABRANCHES et al., 1991, CHAMIZZO et al., 2005, FERREIRA et al., 2007, LAGE et al., 2007), porém sendo fontes de infecção para o vetor.

Os sinais clínicos observados em animais portadores de LVC são lesões cutâneas, especialmente nas regiões da cabeça, ponta de orelha e abdômen, além de alopecia periorbital, dermatite seborréica, hiperqueratose, nódulos subcutâneos e erosões (ALMEIDA et al., 2005), lesões oculares, notadamente conjuntivite e uveítes (BRITO et al. 2004, INIESTA et al., 2005), linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, emagrecimento e morte (SLAPPENDEL, 1998, CIARAMELLA et al., 1997, BARRECA et al., 2000, PEÑA et al., 2000, BLAVIER et al., 2001, TAFURI et al., 2001, TRAVI et al., 2001, BARBOSA de DEUS et al., 2002, LIMA et al., 2003, SOLANO-GALLEGO et al., 2003, BARROUIN-MELO et al., 2004, SOLANO-GALLEGO et al., 2004, CHAMIZZO et al., 2005, GUIMARÃES et al., 2005, LAGE et al., 2007, CARDOSO et al., 2007, NIETO et al., 1999)

A LVC possui extraordinário pleomorfismo de sinais clínicos e semelhanças com outras doenças mostrando sinais não específicos e lesões microscópicas como observado em outras doenças de caráter imunomediado (MOREIRA et al., 2007).

Sinais inespecíficos podem estar presentes tais como febre intermitente, epistaxe, anemia, icterícia, êmese, enterite, nefrite (NOLI, 1999, INIESTA et al., 2005, CARDOSO et al., 2007) poliatrite imunomediada, polidipsia, polimiosites, lesões ósseas, alterações cardíacas (NOLI, 1999) colite crônica sintomática ou assintomática (ADAMAMA-MORAITOU et al., 2007), e raramente sinais neurológicos (LIMA et al., 2003), caquexia, podem estar presentes, e morte no estágio final (LONGSTAFFE et al., 1983; MARZOCHI et al., 1985; GENARO, 1993, SANTA ROSA E OLIVEIRA, 1997, VALLADARES et al., 1997, BARBOSA DE DEUS et al., 2002).

Animais com sinais neurológicos da doença apresentam formas amastigotas de *Leishmania* sp no fluído cérebro espinhal (FCE) (LIMA et al., 2003) além de anticorpos anti-*Leishmania* sp (NOLI, 1999, LIMA et al., 2003).

A epistaxe, normalmente unilateral e freqüentemente observada, é considerada conseqüência de formação de úlceras na mucosa nasal ou problemas de coagulação devido à hiperglobulinemia e trombocitopenia (NOLI, 1999).

Insuficiência renal de grau moderado a grave pode ser observada em cães infectados por *Leishmania* spp devido à glomerulonefrites membranosas e extramembranosa, ambas por formação de imunocomplexos, ocasionando proteinúria, uremia que conseqüentemente leva o animal a morte (NOLI, 1999).

A proteinúria é freqüentemente observada em doenças glomerulares devido ao aumento da permeabilidade capilar glomerular às proteínas do plasma especialmente albumina. Em todos os tipos de glomerulonefrites membranoproliferativas, é comum observar-se proteinúria e hematúria. A maioria das causas de óbito em cães com Leishmaniose visceral é devido à insuficiência renal aguda que leva a um quadro urêmico (SOARES et al., 2005)

## **6. Diagnóstico**

O diagnóstico da LVC pode ser feito com base nas características clínicas apresentadas pelos animais, através da demonstração do parasito em punções aspirativas de órgãos linfóides, provas sorológicas e métodos moleculares (GENARO, 1993, NOLI, 1999). O diagnóstico da infecção é importante para a saúde pública e a manutenção de doença (ROSATI et al., 2003).

A pesquisa parasitológica pode ser feita de forma direta, em esfregaços de material proveniente de aspirado esplênico, de medula óssea, linfonodos ou de biópsia hepática corados pelos métodos de Giemsa, Wrigth, Leishman ou pelo Panótico (SANTA-ROSA e OLIVEIRA, 1997).

Também pode ser realizado isolamento em meios de cultura específicos, tais como Novy, McNeal, Nicolle (NNN) e Liver Infusion Triptofane (LIT), além de inoculação em animais de laboratório (CASTRO et al., 1996; BRASIL, 2003). Barroin-Melo et al., (2004) afirmam que a biópsia dos linfonodos poplíteos é considerada mais sensível para o diagnóstico da doença, quando comparados a outros tipos de amostras como aspirados de baço e fígado.

De acordo com Marzochi et al., (1985); Slappendel e Ferrer, (1990); Ferrer et al., (1995); Santa Rosa e Oliveira, (1970); Noli, (1999), ainda podem ser utilizados para o diagnóstico da LVC provas sorológicas realizadas, através dos testes de imonofluorescência indireta (RIFI) (BARBOSA de DEUS et al., 2002), teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou teste de aglutinação direta (TAD), imunocromatografia e “immunoblot”.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) pode ser utilizada rotineiramente para a detecção de anticorpos específicos e é facilmente utilizada quando em grande escala. Já o ELISA é muito fácil de ser executado, possui sensibilidade maior (FERREIRA et al., 2007, TÁVORA et al., 2007), chegando até 100% em cães parasitologicamente positivos (FERREIRA et al., 2007), porém sua eficácia depende da qualidade do antígeno empregado (ROSATI et al., 2003). O ELISA é mais indicado, por ser menos oneroso e rápido, em estudos epidemiológicos com um grande número de amostras (TÁVORA et al., 2007).

Apesar de Távora et al., (2007) afirmarem que a RIFI é considerada o teste padrão ouro para o diagnóstico de LVC e LVH, devido a sua especificidade elevada, Barbosa de Deus et al., (2002) e Ferreira et al., (2007) afirmam que os testes sorológicos ainda são problemáticos devido à baixas especificidade e sensibilidade e que a RIFI pode apresentar reações cruzadas com outros tripanossomatídeos. Segundo Ferreira et al., (2007) a RIFI pode apresentar reação cruzada com *Ehrlichia canis* e *Leishmania brasiliensis*.

Lachaud et al., (2001) alertaram que a reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma prova diagnóstica extremamente sensível e específica, sendo possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do parasito em amostras com

pequena quantidade, porém este método é bastante oneroso sendo por isso pouco utilizado na rotina clínica veterinária.

## 7. Referências

ABRANCHES P, SANTOS-GOMES G, RACHAMIM N, CAMPINO L, SCHNUR LF, JAFFE CL. 1991 An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**. 13:537-50

ABRANCHES, P., SILVA-PEREIRA, M. C., CONCEIÇÃO-SILVA, F. M., SANTOS-GOMES, G. M, JANZ, J. G.. 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**. 77 (4), 557-61

ADAMA-MORAITOU, K. K., RALLIS, T. S., KOUTINAS, A. F., TONTIS, D., PLEVRAKI, K., KRITSPI, M.. 2007. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 76, 53-57.

ALMEIDA, M. A. O. et al. 2005. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology, Amsterdam**. 127, 227-232.

ALMEIDA A. B. P. F, FARIA, R. P., PIMENTEL, M. F. A; DAHROUG, M. A. A., TURBINO, N. C. M. R; SOUSA, V. R. F.. 2009 . Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato

Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 42 (2) 156-159.

ALVES, A. L. et al. 1998. Epidemiological survey of visceral leishmaniasis in errant dogs of Fortaleza city, Ceará. **Ciência Animal**, Fortaleza. 8, (2), 63-67.

AMÓRA, S. S. A., SANTOS, M. J. P., DALVES, N., COSTA, S. C. G., CALABRESE, K. S., MONTEIRO, A. J., ROCHA, M. F. G.. 2006 Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria.** 36 (6), 1854-1859.

ANDRADE, A. M., QUEIROZ, L. H., NUNES, G. R., PERRI, S. H. V., NUNES, C. M.. 2007. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 40(5),594-595.

AWASTHI, A., MATHUR, R. H., SAHA, B. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medicine Research.** 119, 238-258.

BARBOSA-DE-DEUS, R., MARES-GUIA, M. L., NUNES, A. Z., COSTA, K. M., JUNQUEIRA, R. G., MAYRINK, W., GENARO. O., TAVARES, C. A. P.. 2002. *Leishmania major*-Like Antigen for Specific and Sensitive Serodiagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** 9 (6), 1361–1366 .

BARRECA, G. S., MATERA, G., MAJO, M., LAMBERTI, A, LIBERTO, M. C., FOCÀ, A..2000. Early detection of *Leishmania* promastigotes in dog bone marrow cultures by acridine orange stain. **Parasitology Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** 37, 247–251

BARROUIN-MELO, S. M., LARANGEIRA, D. F., TRIGO, J., AGUIAR, P. H. P., DOS-SANTOS, W. L. C., PONTES-DE-CARVALHO, L.. 2004. Comparison between Splenic and Lymph Node Aspirations as Sampling Methods for the Parasitological Detection of *Leishmania chagasi* Infection in Dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.** 99 (2), 195-197.

BLAVIER, A., KEROACK, S., DENEROLLE, P., GOY-THOLLOT, I., CHMBANNE, L., CADORE, J. L., BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal.** 162, 108-120. 2001.

BONATES, A.. 2003. Leishmaniosis visceral (calazar). **Veterinary News,** London/New York, 10,( 61), 4-5.

BRACHELENTE, C., MULLER, N., DOHERR, M. G., SATTLER, U., WELLE, M. 2005. Cutaneous Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs is Associated with a T Helper-2–biased Immune Response. **Veterinary Pathology.** 42, 166–175.

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

BRITO, F.L .C., ALVES, L. C., ORTIZ, J. P. D., MAIA, F. C. L., SILVA-JUNIOR, V. A., LAUS, J. L.. 2004. Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from the Olinda city, Pernambuco, Brazil. Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi*. **Ciência Rural, Santa Maria,** 34, (3),925-929.

CABRAL, M., OCGRADY, J., ALEXANDER, J.. 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs.

**Parasite Immunology**. 14, 531-539.

CANELA, J. R., ALVES, C. J. M., RODRIGUES, G. C.. 2004. Perfil diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes adultos admitidos no Hospital Universitário Clemente Faria Montes Claros. **Unimontes Científica**. 6 (2), 107-111.

CARDOSO, L., SCHALLIG, H. D .F. H., CORDEIRO-DA-SILVA, A., CABRAL, M., ALUNDA, J. M., RODRIGUES, M.. 2007. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 117, 35–41.

CARVALHO, M.R. *et al.* 2005. Isolamento e identificação de *Leishmania (L.) chagasi* em cães endêmica para Leishmaniose visceral na zona da mata norte de Pernambuco, Brasil. In: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇAS DE CHAGAS E LEISHMANIOSES, 21. Uberaba. **Anais...** Uberaba.

CASTRO, A. G. *et al.* Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86p.

CHAMIZO, C., MORENO, J., ALVAR, J.. 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary**

**Immunology and Immunopathology**. 103, 67–75

CIARAMELLA, P., OLIVIA, G., LUNA, R. D., GRADONI, L., AMBROSIO, R., SCALONE, A., PERSECHINO, A.. 1997. A Retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmanina infantum*.

**Veterinary Record**. 141, 539-543.



CORRÊA, A. P. F. L., DOSSI, A. C. S., VASCONCELOS, R. O., MUNARI, D. P., LIMA, V. M. F.. 2007. Evaluation of transformation growth factor b1, interleukin-10, and interferon- $\gamma$  in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**. 143, 267–274.

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

DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S. P.. 2006. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 39, 352-356.

DEPLAZES, P., SMITH, N. C., ARNOLD, P., LUTZ, H., ECKERT, J.. 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody response of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology**. 17, 451-458.

D'OLIVEIRA JUNIOR, A., MACHADO, P., BACELLAR, O., CHENG, L. H., ALMEIDA, R. P., CARVALHO, E. M.. 2002. Evaluation of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 35 (1): 7-10.

DUBEY, J. P., ROSYPAL, A. C., PIERCE, V., SCHEINBERG, S. N., LINDSAY, D. S.. 2005. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 227 (8), 1266-1269.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. 2000. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo. 28, 36-42.

FERREIRA, E. C., LANA, M., CARNEIRO, M. A., REIS, A. B., PAES, D. V., SILVA, E. S., SCHALLIG, H., GONTIJO, C. M. F. . 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology** 146. 235–241.

FERRER, L.. 1990. Atypical nodular leishmaniasis in two dogs. **Veterinary Record**. 126 (4), 90.

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

FERRER, L.. 2002. Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27., Granada. **Proceedings...**

FERRER, L.. Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 24., 2003, Belo Horizonte**. Belo Horizonte: ANCLIVEPA. Palestra.

GENARO, O.. 1993 Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizonte, 202 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais.

FISA, R. et al. 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam. 83, 87-97.

FIGUEIREDO F B, BONNA, I. C. F., NASCIMENTO, L. D, COSTA, T., BAPTISTA, C., PACHECO, T. M. V., AMENDOEIRA, M. R. R, MADEIRA, M. F.. 2009. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42 (2), 141-145.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. ***Veterinary Parasitology***, Amsterdam. 111, 2/3, 161-173.

GOMES-PEREIRA, S., RODRIGUES, O. R., SANTOS-GOMES, G. M.. 2004. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. ***Immunology Letters***. 95, 63-70.

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

GOTO, H., LINDOSO, J. A. L.. 2004. Immunity and immunosuppression in visceral Leishmaniasis. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***. 37, 615-623

GUIMARÃES, K. S. et al. 2005. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. ***Veterinary Parasitology***. 131, 305-309,

- HABIBI, G. R., KHAMESIPOUR, A., MCMASTER, W. R., MAHBOUDI, F.. 2001. Cytokine gene expression in healing and non-healing cases of cutaneous leishmaniasis in response to *in vitro* stimulation with recombinant gp63 using Semi-quantitative RT-PCR. **Sacandinavian Journal of Immunology**.
- INIESTA L., GÁLLEGO M., PORTÚS M.. 2005. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 103, 77–81.
- INIESTA L., GÁLLEGO, M., PORTÚS, M.. 2007. Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 119, 189-197.
- JULIÃO, F. S., SOUZA, B. M. P. S., FREITAS, D. S., OLIVEIRA, L. S., LARANJEIRA, D. F., DIAS-LIMA, A. G., SOUZA, V. M. M. , BARROUIN-MELO, S. M., MOREIRA JR., E. D., PAULE, B. J. A., FRANKE, C. R.. 2007. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 27(8), 319-324.
- KAMHAWI, S. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes. *Trends Parasitology*. 22 (9), 439-445.
- KRAUSPENHAR, C., BECK, C., SPEROTTO, V., SILVA, A. A., BASTOS, R., RODRIGUES, L.. 2007. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil, Leishmaniose visceral em um canino de Cruz. **Ciência Rural, Santa Maria**. 37 (3), 907-910.
- LACHAUD, L. et al. 2001. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**. 39 (2), 613-617.

LAGE, R. S. , OLIVEIRA, G. C., BUSEK, S. U., GUERRA, L. L., GIUNCHETTI R. C., CORRÊA-OLIVEIRA, R., REIS, A. B.. 2007. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*.

**Veterinary Immunology and Immunopathology** . 115, 135–145

LAGLER H., WILLHEIM M., TRAUNMULLER F., WAHL K., WINKLER H., RAMHARTER M., GRANINGER W., WINKLER, S.. 2003 Cellular profile of cytokine production in a patient with visceral leishmaniasis: T cells express both type 1 cytokines and interleukin –10. *Scandinavian Journal of Immunology*. 57, 291-295.

LANGONI, H., LUCHEIS, S. B., DA SILVA, R. C., CASTRO, A. P. B., PAES, A. C..2005. American visceral leishmaniasis: a case report. *Tropical Disease*. 11 (3), 362.

LEANDRO, C., SANTOS-GOMES, G., CAMPINO, L., ROMÃO, P., CORTES, S., ROLÃO, N., GOMES-PEREIRA, S., RIÇA CAPELA, M. J., ABRANCHES, P.. 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 79, 273-284.

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

LIEW, F.Y., XU, D., CHAN, W. L..1999. Immune effector mechanism in parasitic infections. **Immunology Letters**. 65, 101–104.

LONGSTAFFE, J. A. et al. 1983. Leishmaniasis en imported dogs in the United Kingdom; a potential human hazard. *Journal of Small Animal Practice*. 24, 23-30.

LOPEZ, R. LUCENA, R.; NOVALES, M.; et al. 1996. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Medicine**. 43 (8), 469-474.

MANNA, L., REALE, S., VIOLA, E., VITALE, F., MANZILLO, V. F., MICHELE, P. L., CARACAPPA, S., GRAVINO, A. E.. 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**. 142, 271-80.

MARINHO, M. L.. Inquérito sorológico para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina no município de Itamaracá, estado de Pernambuco. 1996, 43f. Dissertação (**Mestrado em Ciência Veterinária**). Universidade Federal Rural de Pernambuco).

MARTÍN-SÁNCHEZ, J., NAVARRO-MARI, J. M., PASQUAU-LIAÑO, J, SALOMÓN, O. D., MORILLAS-MÁRQUEZ, F.. 2004. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in a Spanish patient in Argentina: What is the origin of the infection. Case report. **BMC Infectious Diseases**. 4:20

MARZOCHI, M. C. A. et al. 1985. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 1 (1) 5-17.

MASUCCI, M., DE MAJO, M., CONTARINO, R. B., BORRUTO, G., VITALE, F., PENNISI, M. G.. 2003. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. **Veterinary Research Communications**. 27 (1), 771-774.

MATHIAS, R., COSTA, F. A. L., GOTO H.. 2001. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral Leishmaniasis. IgG deposits in lung and liver in visceral Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 34, 539-543

MONTEIRO, E. M., SILVA, J. C. F., COSTA, R. T., COSTA, D. C., BARATA, R. A., PAULA, E. V., LINS, G. L., MACHADO-COELHO, ROCHA, M. F., FORTES-DIAS, C. L., DIAS, E. S.. 2005. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 38 (2), 147-152.

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

MULLER, .I, KROPF, P., ETGES, R. J., LOUIS, J. A.. 1993. Gamma Interferon Response in secondary Leishmania Major. Infection: Role Of CD8+ T Cells. **Infection and Immunity.** 61 (9), 3730-3738 .

MUNDER, M., MALLO, M., EICHMANN, K., MODOLELL, M.. 1998. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine.* 187,: 2103-2108.

NAVEDA, L. A. B., MOREIRA, E. C., MACHADO, J. G., MORAES, J. R. C., MARCELINO, A. P.. 2006Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** 58 (6), 988-993.

NETO, J. C., WERNECK, G. L., COSTA, C. H. N.. 2009. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro.** 25 (7), 1543-1551.

NIETO, C. G., GARCÍA-ALONSO, M., REQUENA, J. M., MIRÓN, C., SOTO, M., ALONSO, C., NAVARRETE, I.. 1999. 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.** 67,117-130

Noli C. 1999. Canine leishmaniasis. *Waltham focus.* 9 , 16-24.

NUNES, C. M., DIAS, A. K. K., GOTTARDI, F. P. H. B. P., AZEVEDO , M. A. A., LIMA, V. M. F. J. F. G.. 2007. AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM SANGUE DE CÃES. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** 16 (1), 5-9.

OLIVEIRA, S. S., ARAÚJO, T. M.. 2003. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro.** 19 (6), 1681-1690.

OLIVEIRA, A. L. L, PANIAGO, A. M. M. M., DORVAL, M. E. C., OSHIRO, E. T., LEAL, C. R., SANCHES, M., CUNHA, R. V. , BÓIA, M. N.. 2006. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 39 (5), 446-450.



OTERO, A. C. S.; SILVA, V. O.; LUZ, K. G.; PALATINIK, M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; SOUZA, C. P.. 2000. Occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 62 (1), 128-131.

OWENS, S. D., OAKLEY, D. A., MARRYOTT, K., HATCHETT, W., WALTON, R., NOLAN, T. J., NEWTON, A., STEURER, F., SCHANTZ, P., GIGER, U. .2001. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. 219, 1076-1083.

OWENS, S. D., OAKLEY, D. A., MARRYOTT, K., HATCHETT, W., WALTON, R., NOLAN, T. J., NEWTON, A., STEURER, F., SCHANTZ, P., GIGER, U. .2001. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. 219, 1076-1083.

PARANHOS-SILVA, M. et al. 1996. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore. 55 (1), 39-44.

RONDON, F. C. M. , BEVILAQUA, C. M. L. , FRANKE, C. R., BARROS, R. S., OLIVEIRA, F. R., ALCÂNTARA, A. C., DINIZ, A. T.. 2008. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. 155, 24–31.

ROSATI, S., ORTOFFI, M., PROFITI, M., MANNELLI, A., MIGNONE, W., BOLLO, E., GRADONI, L.. 2003. Prokaryotic Expression and Antigenic Characterization of Three Recombinant *Leishmania* Antigens for Serological

Diagnosis of Canine Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 10 (6), 1153–1156.

101,18-23.

SANTA ROSA, I. C. A., OLIVEIRA, I. C. S.. 1997. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, ano II, (11), 24-28.

SANTOS C. A. C.. Percepção, epidemiologia e aspectos da Leishmaniose Visceral Canina em área urbana do estado de Pernambuco. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2006.

SANTOS-GOMES, G. M., ROSA, R. LEANDRO, C. CORTES, S., ROMÃO, P., SILVEIRA, H.. 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 88, 21-30.

SAVANI, E. S. M. M., SCHIMONSKY, B. V., CAMARGO, M. C. G. O., D'AURI, S. R. N.. 2003. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**. 37 (2), 260-262.

SHAW, J. J.. 2006. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. 101 (5), 577-579.

SILVA, E. S., GONTIJO, C. M. F., PACHECO, R. S., FIUZA, V. O. P., BRAZIL, R. P.. 2001. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo

Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.** 96 (3), 285-291.

SILVA, A. V. M., PAULA, A. A., CABRERA, M. A. A., CARREIRA, J. C. A .. 2005. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro.** 21 (1),324-328.

SILVA, F. S.. 2007. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Tropical de Ciências Agrárias e Biológicas.* 1 (1), 20.

SILVA, M. R., MARQUES, M. J., ROMANHA , A. J., SANTA-ROSA I. C. A., CARNEIRO C. M., REIS A B.. 2008. Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area: Bom Sucesso, Minas Gerais State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro.** 24 (2), 281-286.

SILVA, O. A., BRAGA, G. M. S.. 2008. Canine visceral leishmaniasis at the urban areas of the Municipality of São Vicente de Ferrer in the State of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária.** 15 (2), 101-102.

SILVA, A. R., TAUIL, P. T., CAVALCANTE, M. N. C., MEDEIROS, M. N., PIRES, B. N., GONÇALVES, E. G. R.. 2008. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 41(4), 358-364 .

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.

SOARES, M. J. V., MORAES, J. R. E. , ROSELINO, A. M. F.. 2005. Polymerase chain reaction in detecting *Leishmania* sp in symptomatic and asymptomatic seropositive dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. 11 (4), 532-539.

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

SOLANO-GALLEGO, L., RODRÍGUEZ, A., INIESTA, L., ARBOIX, M., PORTÚS, M., ALBEROLA, J. 2003. Detection of Anti-*Leishmania* Immunoglobulin G Antibodies in Urine Specimens of Dogs with Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 10 (5), 849–855.

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

STRAUSS-AYALI, D., BANETH, G., SHOR, S., OKANO, F., JAFFE, C. L.. 2005. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **International Journal for Parasitology**. 35, 63–73

STRAUSS-AYALI, D. S., BANETH, G., JAFFE, C. L.. 2007. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**. 38 (4), 547–564

TAFURI, W. L., TAFURI, W. L., BARBOSA AJA, MICHALICK, ASM., GENARO, O., FRANÇA-SILVA, J. C., MAYRINK, W., NASCIMENTO, E.. 1996. Histopathology and Immunocytochemical study of type 3 na type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 38 (2), 81-89.

TÁVORA, M. P. F., PEREIRA, M. A. V. C., SILVA, V. L., VITA, G. F.. 2007. Estudo de validação comparativo entre as técnicas EliSa e RiFi para diagnosticar *Leishmania sp* em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 40 (4), 482-483.

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

TRAVI, B. L., FERRO, C., CADENA, H., MONTOYA-LERMA, J., ADLER, G. H. 2002. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Research Veterinary Science**. 72, 83-6.

VALLADARES, J. E. et al. 1997. Hepatobiliar and renal failure in dog experimetally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**. 141 (22), 574-575.

VAN ZANDBERGEN, G., HERMANN, N., LAUFS, H., SOLBACH, W., LASKAY, T.. 2002. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein

10 production by neutrophil granulocytes. **Infection and Immunity**. 70, 4177-4184.

WILSON, M. E., JERONIMO, S. M. B., PEARSON, R. D.. 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. **Microbial Pathogenesis**. 38, 147–160.

WILSON, M. E. , WEINSTOCK, J. V.. 1996. Hepatic Granulomas in Murine Visceral. **METHODS: A Companion to Methods in Enzymology**. 9, 248–254

## 8. Objetivos

### 8.1 Geral:

Avaliar a prevalência da Leishmaniose Visceral Canina e sua distribuição espacial, avaliar a resposta imune humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes do município de Tamandaré, Estado de Pernambuco, Brasil.

### 8.2 Específicos:

Verificar a prevalência, analisar a correlação espacial entre a Leishmaniose Visceral Canina e fatores ambientais de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Avaliar e comparar os níveis de citocinas (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4) expressões por PCR em tempo real em diferentes tecidos/órgãos e também a determinação dos padrões bioquímicos e hematológicos em cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum / chagasi*.

Avaliar os níveis de anticorpos IgG2 específicos anti-*Leishmania chagasi* em cães sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados utilizando a proteína CPX2.

## **CAPÍTULO 1**

**PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES (*Canis familiaris*)  
(LINNAEUS, 1758) INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*  
(Cunha & Chagas, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO TAMANDARÉ,  
ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**



**PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758) INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO TAMANDARÉ, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) também conhecida como kala-azar, é uma importante zoonose que pode representar um grande problema de saúde pública com a presença de animais assintomáticos. Atualmente, várias ocorrências desta parasitose têm sido relatadas na região sudoeste do Estado de Pernambuco, Brasil. O objetivo deste trabalho foi diagnosticar casos de LVC no Município de Tamandaré, estado de Pernambuco, empregando-se exame sorológico pelo ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). O estudo de frequência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães pesquisado no Estado de Pernambuco, Brasil, a partir de levantamento efetuado em uma área endêmica, foi realizado através da caracterização da população canina assintomática e sintomática. Das 299 amostras sanguíneas utilizadas, 20,40% foram positivas ao ELISA, sendo 56,10% machos, 69,30% animais sem raça definida, 78,40% entre um e cinco anos de idade e 80,26% assintomáticos. Os resultados sugeriram que medidas de controle da LVC são necessárias no município de Tamandaré – PE que apresenta um processo de expansão desta enfermidade e que o cão desempenha uma função importante na transmissão dessa doença.

Palavras chave: Doença Parasitária, Epidemiologia, Kala-azar

## Abstract

Visceral leishmaniasis also known as kala-azar represents a serious problem of public health in the World, particularly in poverty countries. In Brazil dogs remain as the major reservoir in urban area. The goal of this research was to evaluate the prevalence and the clinical signs in dogs infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* from Tamandaré County, Pernambuco Brazil. A total of 299 dogs were investigated for clinical signs related to Canine Visceral Leishmaniasis (CanL) and sera were analyzed by ELISA test for anti-*Leishmania* antibodies. The serological survey showed 20.40% (61/299) of animals were positive to serological test, 80.26% of positive dogs were asymptomatic animals, 56,10% males, 69,30% mixed breed, 78,40% with one to five years old. As the dogs is the reservoir in Brazil and the canine infection precedes the human cases, these findings indicate that control measures must be apply in dog population from Tamandaré County in order to prevent human cases.

Keywords: Parasitic Disease, Epidemiology, Kala-azar

## 1. Introdução

A leishmaniose visceral é uma doença crônica, presente em vários continentes (TRAVI et al., 2002, LIMA et al., 2003, CARDOSO et al., 2007) tendo como agente etiológico o protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) (POCAI et al., 1998; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997), e os cães representam o principal reservatório no ambiente urbano (LANGONI et al., 2005, IKEDA et al., 2003, POCAI et al., 1998, CIARAMELLA et al., 1997).

No Brasil a prevalência da infecção canina tem sido registrada em vários estados da federação com diferentes índices na dependência do teste diagnóstico utilizado, nível de endemicidade local e população canina analisada.

Na região Centro-Oeste, Almeida et al., (2009) e Azevedo et al., (2008) observaram prevalência de 3,4% e 7,8% na população canina proveniente de Cuiabá-MT e Poxoreó (MT) respectivamente.

No sudeste brasileiro, particularmente no estado de Minas Gerais, a prevalência da infecção variou de 1,4% a 64,0%, na dependência da cidade e tipo de teste diagnóstico utilizado (NAVEDA et al., 2006, SILVA et al., 2008, MONTEIRO et al., 2005, SILVA et al., 2001).

Já no estado de São Paulo, Savani et al., (2003) determinou ser de 0,57% a prevalência da infecção em cães da cidade de São José do Rio Preto e 9% em Araçatuba (ANDRADE et al., 2007). No município de Barra de Guaratiba-Rio de Janeiro, Silva et al., (2005) observaram durante o período de 2001 a 2002, prevalência superior a 25%.

À semelhança da leishmaniose visceral (LVH), a LVC registra o maior número de casos na região Nordeste. Em São José de Ribamar (MA) a prevalência variou de 21,0 até 25,0% (GUIMARÃES et al., 2005); em Fortaleza (CE), 26,2% (RONDON et al., 2008); na cidade de Mossoró (RN), 45,0% e 34,0% na zona urbana e rural respectivamente (AMORÁ et al., 2006); em Feira de Santana (BA) e Camaçari, a prevalência encontrada variou de 0,6% e 21,7% respectivamente (OLIVEIRA e ARAÚJO 2003; JULIÃO et al., 2007).

No estado de Pernambuco, a frequência da infecção observada no município de São Vicente de Férrer, agreste Pernambucano, foi de 4,8% a 33%, utilizando-se métodos sorológicos e moleculares respectivamente (CARVALHO et al., 2005); no município de Itamaracá as taxas de prevalência variaram de 27,78% (MARINHO, 1996) a 9,09% (SANTOS, 2006) e 40,3% na cidade de Paulista, Região Metropolitana do Recife.

Em função da existência da *Lutzomyia longipalpis* na faixa litorânea do estado de Pernambuco e da notificação de 1434 casos humanos da doença no período entre 1995 a 2000 (PAIXÃO et al., 2004), aliados à ausência dos dados da doença em cães, o objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* em cães residentes no município de Tamandaré, estado de Pernambuco – Brasil, e associar com fatores como raça, idade e sexo.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Área estudada**

O município de Tamandaré (08°46'01''Sul e 35° 06' 13''Oeste) está localizado na mesorregião da Zona da Mata e na Microrregião Mata Meridional do Estado de Pernambuco e inserida na Reserva Ecológica de Saltinho. A vegetação é predominantemente do tipo Mata Atlântica.

### **2.2 Animais**

Foram utilizados 299 cães independentemente de sexos, raça ou idade, residentes no município de Município de Tamandaré, litoral sul de Pernambuco, Brasil. Para cada animal, foi confeccionada uma ficha de identificação individual, com informações acerca das condições sócio-ambientais dos proprietários residentes, como também a procedência e as condições clínicas dos mesmos (Anexo 1 e Anexo 2).

### **2.3 Avaliação Clínica**

Inicialmente foi realizado anamnese com obtenção de dados referentes ao estado geral, raça, sexo, idade, porte, bem como dados referentes ao proprietário e ao animal. O exame físico constou principalmente da inspeção da pele e fâneros além da palpação abdominal e dos linfonodos, com o objetivo de observar a existência ou não de sinais sugestivos de leishmaniose visceral canina como perda de peso, onicogrifose, lesões de pele, de acordo com Ferrer, (1999).

### **2.4 Obtenção do plasma para exame sorológico**

De todos os animais foram colhidos aproximadamente 3 mililitros (ml) de sangue através da venopunção da veia cefálica, com seringa<sup>1</sup> e agulha<sup>2</sup> e transferidos imediatamente para tubos de ensaio estéreis, contendo ácido etilenodiaminotetracético de sódio<sup>3</sup> (EDTA) a 10% para obtenção do plasma para o processamento no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

### **2.5 Teste Sorológico**

O ELISA foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do CPqAm/FIOCRUZ. Para tanto foi utilizado o

---

<sup>1</sup> Seringa descartáveis 10 ml,, Becton Dickson

<sup>2</sup> Agulhas descartáveis 25x7mm, Becton Dickson

<sup>3</sup> Acido etilenodiaminotetracético de sódio, Reagen

*Kit* EIE-Leishmaniose Canina<sup>4</sup>, que utiliza um peptídeo recombinante. O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, se realizando a leitura em espectrofotômetro a 490 nanômetros.

## **2.6 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados através do Software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 16.0). A análise da frequência da LVC segundo idade e sexo dos animais e presença de sinais clínicos foi realizada por meio do teste Mann Whitney considerando-se o nível de significância de 5% (REIS, 2003).

## **3 Resultados e Discussão**

O resultado do teste ELISA revelou que 20,4% (61/299) dos animais provenientes do município de Tamandaré apresentaram anticorpos anti-*Leishmania chagasi*.

A prevalência da LVC encontrada no município de Tamandaré foi superior àquelas observadas na Região Metropolitana do Recife (LIMA Jr. et al., 2000), em Itamaracá-PE, (SANTOS, 2006), na cidade de Fortaleza (ALVES et al., 1998), no município de Pedro Leopoldo-MG (NAVEDA et al., 2006) na

---

<sup>4</sup> Kit EIE-Leishmaniose Canina , ELISA S7, lote 001/05 Biogene

cidade de Santo Antônio do Amparo-MG (SILVA et al., 2008), no município de Barra Mansa-RJ (FIGUEIREDO et al., 2009), em São José do Rio Preto-SP (SAVANI et al., 2003), em Araçatuba (ANDRADE et al., 2007), em Cuiabá-MT (ALMEIDA et al., 2009), em Poxoréo-MT (AZEVEDO et al., 2008), e na cidade de Santa Maria-RS (POCAI et al., 1998), com índices de prevalência variando de 0,57% a 10,5%.

Por outro lado, a prevalência aqui observada foi inferior aquelas relatadas no município de São José de Ribamar-MA (GUIMARÃES et al., 2005), em Fortaleza (RONDON et al., 2008), em Mossoró-RN (AMORÁ et al., 2006) na cidade de Camaçari-BA (JULIÃO et al., (2007), em Montes Claros-MG (FRANÇA-SILVA et al., 2003), em Belo Horizonte-MG (SILVA et al., 2001) e no município de Barra de Guaratiba-RJ (CABRERA et al., 2003; SILVA et al., 2005) com variação na prevalência de 21% a 64%.

Provavelmente, as razões para diferenças entre as prevalências observadas deve-se a vários fatores, entre eles aqueles inerentes ao hospedeiro como idade, imunidade, raça (SOLLANO-GALLEGO et al., 2000), natureza do antígeno, além da sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos empregados.

Deve-se também levar em consideração que o nível de endemicidade de cada localidade estudada, ocupação desordenada da população humana, principalmente em áreas próximas a mata nativa, características da região (CABRERA et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2005; LANGONI et al., 2005; RONDON et al., 2008; SILVA et al., 2008), presença de animais domésticos (GAMA et al., 1998; GUIMARÃES et al., 2005), presença e competência do



vetor, além da população canina susceptível (GAMA et al., 1998; SILVA et al., 2001; CABRERA et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2005; NAVEDA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2009) interferem diretamente com os diferentes índices de prevalência relatados.

Nos locais onde foram realizadas as coletas foi possível observar condições de vida precária, sem saneamento básico e acúmulo de resíduos sólidos, fato este que se encontra associado com a presença da infecção na população humana (AMORÁ et al., 2006, RONDON et al., 2008) devido ao favorecimento da reprodução do inseto vetor.

Vale salientar a invasão da população humana em locais de mata e o deslocamento do flebotômio do seu habitat natural para o ambiente urbano. Segundo os moradores, na região estudada, existem relatos da presença de canídeos silvestres que podem desempenhar um papel importante como fonte de infecção do protozoário a diferentes populações do mosquito palha, o qual está presente em todo município (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO).

Com relação à idade, sexo e raça dos animais sororreagentes, as análises estatísticas não revelaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

No que se refere às características clínicas dos animais soro-reagentes 80,26% (48/61) eram assintomáticos, esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

A maior porcentagem de animais assintomáticos pode ser explicada pelo longo período de evolução da doença além da resposta imune do animal (FISA

et al., 1999), ressaltando desta forma à importância do cão como reservatório da doença.

#### **4. Conclusão**

Diante dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que o município de Tamandaré apresenta prevalência alta de Leishmaniose Visceral Canina, o que expõe a população a risco considerável, necessitando de medidas sanitárias como controle do vetor, controle de cães doentes e educação da população em relação à Leishmaniose Visceral Canina.

#### **5. Referências**

ALMEIDA, A. B. P. F., FARIA, R. P., PIMENTEL, M. F. A., DAHROUG M. A. A., TURBINO, N. C. M. R., SOUSA, V. R. F.. 2009. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 42 (2), 156-159.

AMÓRA, S. S. A., SANTOS, M. J. P., ALVES, N. D., COSTA, S. C. G., CALABRESE, K. S., MONTEIRO, A. J., ROCHA, M. F. G.. 2006. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria. 36 (6),1854-1859.

ANDRADE, A. M., QUEIROZ, L. H., NUNES, G. R., PERRI, S. H. V., NUNES, C. M. 2007. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 40 (5), 594-595.

AZEVEDO M. A. A., DIAS A. K. K., DE PAULA H. B., PERRI S. H. V., NUNES C. M.. 2008. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 17 (3), 123-127.

CABRERA, M. A., PAULA, A. A., CAMACHO, L. A. B., MARZOCHI, M. C. A., XAVIER S. C., SILVA A. V. M., JANSEN, A. M. 2003. Canine visceral Leishmaniasis in barra de Guaratiba, rio de janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 45 (2), 79-83.

CARDOSO, L., SCHALLIG, H. D. F. H., CORDEIRO-DA-SILVA A., CABRAL M., ALUNDA, J. M., RODRIGUES M.. 2007. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 117 35–41.

CARVALHO, M. R. *et al.* Isolamento e identificação de *Leishmania (L.) chagasi* em cães endêmica para Leishmaniose visceral na zona da mata norte de Pernambuco, Brasil. In: **REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇAS DE CHAGAS E LEISHMANIOSES**, 21., 2005, Uberaba. Anais... Uberaba, 2005.

CIARAMELLA, P., OLIVIA, G., LUNA, R. D., GRADONI, L., AMBROSIO, R., SCALONE, A., PERSECHINO, A.. 1997. A Retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**. 141, 539-543.

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

FIGUEIREDO F B, BONNA, I. C. F., NASCIMENTO, L. D, COSTA, T., BAPTISTA, C., PACHECO, T. M. V., AMENDOEIRA, M. R. R, MADEIRA, M. F.. 2009. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 42 (2), 141-145.

GAMA, M. E. A., BARBOSA, J. S., PIRES, B., CUNHA, A. K. B., FREITAS, A. R., RIBEIRO, I. R., COSTA, J. M. L.. 1998. Avaliação do nível de conhecimento que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, Estado do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**. 14 (2), 381-390.

GUIMARÃES, K. S. et al. , 2005. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. 131, 305-309.

IKEDA, F. A., et al.. 2003. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, no município de Araçatuba – SP: Um estudo retrospectivo de 191 casos. **Clínica Veterinária, São Paulo**. 8 (47), 42-48.

JULIÃO, F. S., SOUZA, B. M. P. S., FREITAS, D. S., OLIVEIRA, L. S., LARANJEIRA, D. F., DIAS-LIMA, A. G., SOUZA, V. M. M., BARROUIN-MELO, S. M., MOREIRA J. R. E. D., PAULE, B. J. A., FRANKE, C. R.. 2007. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 27 (8), 319-324.

LANGONI, H., LUCHEIS, S. B., DA SILVA, R. C., CASTRO, A. P. B., PAES, A. C.. 2005. American visceral leishmaniasis: a case report. **Tropical Disease**. 11, (3), 362.

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

MARINHO, M. L.. Inquérito sorológico para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina no município de Itamaracá, estado de Pernambuco. 1996, 43f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco).

MONTEIRO, E. M., SILVA, J. C. F., COSTA, R. T., COSTA, D. C., BARATA, R. A., PAULA, E. V., LINS, G. L., MACHADO-COELHO, ROCHA, M. F., FORTES-DIAS, C. L., DIAS, E. S.. 2005. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 38 (2), 147-152.

NAVEDA, L. A. B., MOREIRA, E. C., MACHADO, J. G., MORAES, J. R. C. , MARCELINO, A. P.. 2006. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral

canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.6, p.988-993.

OLIVEIRA, S. S., E ARAÚJO, T. M. 2003. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). **Caderno de Saúde Pública**. , Rio de Janeiro. 19 (6),1681-1690.

PAIXÃO, S. C. S.. Modelagem de dados espaciais para controle da Leishmaniose Visceral. **Dissertação de Mestrado** (Universidade Federal de Pernambuco (Área de Sistema de Informação). Programa de Pós graduação em ciências geodésicas e tecnologias da geoinformação. 143p. 2004.

POCAI, E. A., FROZZA, L., HEADLEY, S. A., GRAÇA, D. L. 1998. Visceral Leishmaniasis (Kala-azar). Five cases in dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul, South Brazil. **Ciência Rural, Santa Maria**. 28 (3), 501-505.

REIS, J. C. Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária. Olinda, 2003, 651p.

RONDON, F. C. M. , BEVILAQUA, C. M. L. , FRANKE, C. R., BARROS, R. S., OLIVEIRA, F. R., ALCÂNTARA, A. C., DINIZ, A. T. 2008. Cross-sectional serological study of canine Leishmania infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. 155 , 24–31.

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

SANTOS C. A. C.. Percepção, epidemiologia e aspectos da Leishmaniose Visceral Canina em área urbana do estado de Pernambuco. **Dissertação**

(Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2006.

SAVANI, E. S. M. M., SCHIMONSKY, B. V., CAMARGO, M. C. G. O., D'AURI, S. R. N. 2003. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**. 37(2), 260-2 .

SILVA, E. S., GONTIJO, C. M. F., PACHECO, R.S., FIUZA, V. O. P., BRAZIL, R. P.. 2001. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. 96 (3), 285-291.

SILVA, A. V. M., PAULA, A. A., CABRERA, M. A. A., CARREIRA, J. C. A.. 2005. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. 21 (1), 324-328.

SILVA, M. R., MARQUES, M. J., ROMANHA, A. J., SANTA- I. C. A., CARNEIRO, C. M., REIS, A. B.. 2008. Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area: Bom Sucesso, Minas Gerais State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. 24 (2), 281-286.

SOLANO-GALLEGO, L., LLULL, J., RAMOS, G., RIERA, C., ARBOIX, M., ALBEROLA, J., FERRER, L., 2000. The Ibizaian hound presents a predominant cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, 90: 37-45.

TRAVI, B.L., FERRO, C., CADENA, H., MONTOYA-LERMA, J., ADLER, G. H. 2002. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Research Veterinary Science**. 72:83-6.

## **CAPÍTULO 2**

### **SPATIAL CORRELATION BETWEEN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS AND ENVIRONMENTAL FACTORS IN TAMANDARÉ MUNICIPALITY, PERNAMBUCO STATE, BRAZIL.**

#### **SHORT COMMUNICATION**



**Spatial correlation between Canine Visceral Leishmaniasis and  
environmental factors in Tamandaré municipality, Pernambuco State,  
Brazil.**

**Short communication**

Abstract

Canine Visceral Leishmaniasis (CanL) in Brazil is caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and it has been reported in some cities. The goal of this research was to analyze the spatial correlation between CanL and environmental factors in Tamandaré County, Pernambuco State, Brazil. A total of 220 sera were analyzed by ELISA test for anti-*Leishmania* antibodies. The positive and negative cases in Tamandare were each assigned coordinates by the use of a GARMIN etrex handheld GPS device in the field. The cases were plotted throughout the county, and the points were loaded into arcGIS 9.2 and the layers were analyzed using “Moran’s I Spatial Autocorrelation” to distinguish clustering based on the variables vegetation and hydrology. The results showed the prevalence was 23.6% and the correlations between all points and environmental factors, such vegetation and hydrology were found to be clustered with less than 1% likelihood due to random chance. Although the results did not show relationship with the hydrology and the vegetation, GIS and RS technologies could be important tools in study the spatial pattern of CanL.

Keywords: Global Position System, Epidemiology, Canine Kala-azar

Visceral leishmaniasis (VL) in Brazil is a severe parasitic disease caused by a protozoan parasite *Leishmania chagasi* which is transmitted by *Lutzomia longipalpis*. In urban areas, dogs are reservoirs for the VL (LAINSON & SHAW 1987, LAINSON et al., 1987, GONTIJO, et al., 2004) and the Canine Visceral Leishmaniasis (CanL) is a serious public health problem because the dog's infection usually precedes human cases.

Geographical Information Systems (GIS) and Remote Sensing (RS) technologies are being used increasingly to study the spatial and temporal patterns of disease (SHARMA, 1997) and some associations about the space-time dynamics of leishmaniasis in Brazil have been reported (FRANKE et al., 2002, ASSUNÇÃO et al., 2001, WERNECK et al., 2006)

Although VL was previously known as a rural disease, the urbanization of the disease has been reported in Brazil. In Pernambuco State, VL is present in almost all regions (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2005, DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006) and autochthonous cases of VL and has been reported on the coastal region (CARVALHO et al., 2007).

The goal of this paper was to evaluate the spatial correlation between CanL and hydrology and vegetation in Tamandaré County, Pernambuco State.

A total of 220 dogs from both genders and different breeds and ages from Tamandaré County, state of Pernambuco, Brazil, (08°46' 01''S and 35° 06' 13''W) were used.

Before the procedures an informed consent was obtained from each dog owner. The blood samples from each dog was obtained by venous puncture and stored at 4°C. The sera were confirmed to be positive for CanL by using Kit

of canine Calazar ELISA S7®<sup>5</sup> which uses recombinant peptides of *Leishmania chagasi* according to manufacture instructions.

Coordinates of positive and negative dogs' serology locations were obtained from readings of a GARMIN etrex handheld global positioning system device in the field and all cases were plotted by using of arcGIS 9.2 software.

Information on vegetation status was obtained from Google Earth and local vegetation and hydrology was drawn as a feature class. The three categories were joined in arcGIS 9.2. with vegetation and hydrology feature classes separately to produce a total of six joined layers.

#### Statistical analysis

Correlation analysis was performed to determine the relationship between the incidence of the disease and different environmental variables. The layers were analyzed using "Moran's I Spatial Autocorrelation" to distinguish clustering based on the variables: (1) vegetation, and (2) hydrology. Inverse distance and inverse distance squared were used for the spatial relationships, and Euclidean distance and Manhattan Distance were used as the distance methods. No standardization or weight was used for spatial analysis.

The results of ELISA showed 23.63% (52/220) of dogs were positive to anti- *Leishmania chagasi* antibodies.

The results of this serology analysis require cautious interpretation, because and the dog's infection usually precedes human cases.

---

<sup>5</sup> Diagnostic kit for Calazar ELISA/S7, Biogene Ind. e Com. Ltda, Recife/PE

The distribution of CanL in relation to vegetation and hydrology are shown in Figure 1. The correlations between all points and hydrology were found to be clustered with less than 1% likelihood due to random chance, except for positive points and hydrology, when using the inverse distance squared and Euclidean and Manhattan distances, the points were less clustered with a less than 5% likelihood of random chance.

The correlations between all points and vegetation were found to be clustered with less than 1% likelihood due to random chance.

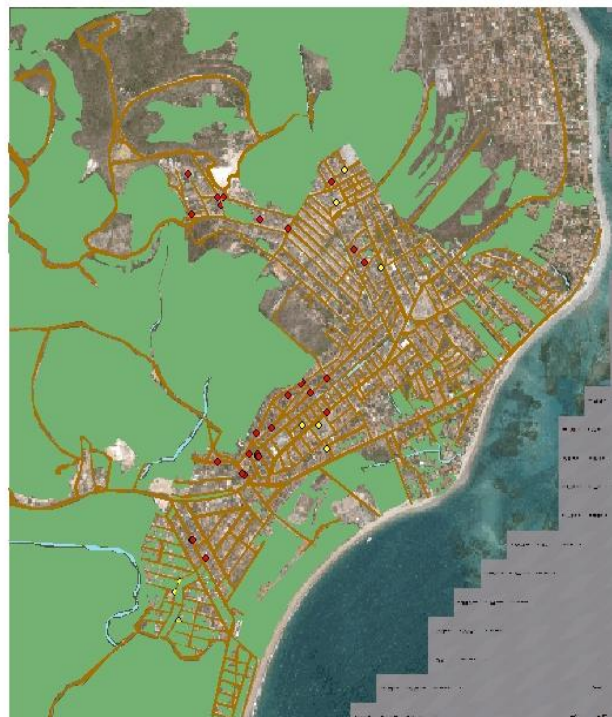


Figure 1 - General distribution of Canine Visceral Leishmaniasis prevalence (red dots –positive cases and yellow dots negative cases) in Tamandaré Coutty in relation to vegetation (green) and hydrology (blue)

These results did not show the relationship with the hydrology and the vegetation as the main environmental variables associated with the distribution and prevalence of CanL in Tamandaré County. It is probable that the positive cases are distributed along the county not only because the similarity of environmental condition but also the distribution of the sand flies.

In the same way, Margonari et al., (2006) did not find vegetation areas influencing on CanL transmission.

By using spatial analysis, Werneck and Maguire, (2002) have generated models that showed positive associations between VL occurrence with poverty and vegetation areas, and Neto et al., (2009), observed a strong correlation with the presence of green areas and VL.

The results also demonstrated that there is a typically urban characteristic of the CanL in Tamandare County. Various alterations may be responsible for this pattern such as changes in the degree of the vector's anthropophilia, vector species and also the presence of a silvatic reservoir.

Although the results did not showed the relationship with the hydrology and the vegetation, GIS and RS technologies could be an important tool in study the spatial pattern CanL

## References

ASSUNÇÃO, R. M., REIS, I. A., OLIVEIRA, C. L., 2001. Diffusion and prediction of leishmaniasis in a large metropolitan area in Brazil with a Bayesian space-time model. **Statistical Medicine**. 20, 2319–2335.

DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S.P. 2005. A leishmaniose visceral é uma doença endêmica em Recife, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 38, 361-2.

DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S. P. 2006. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 39, 352-356.

DE CARVALHO, M. R., LIMA, B. S., MARINHO-JÚNIOR, J. F. DA SILVA. F. J., VALENÇA, H. F., ALMEIDA, F. D. E. A., DA SILVA, A. L., BRANDÃO-FIL, S. P.. 2007. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis área in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. 23 (5), 1227-1232.

FRANKE, C. R., STAUBACH, C., ZILLER, M., SCHLUTER, H., 2002. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 96, 236–241.

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

LAINSON, R., SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol. 1. London: **Academic Press**; 1987. p. 1-120.

LAINSON, R., SHAW, J. J., SILVEIRA, F.T., BRAGA, R. R.. 1987. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 81, 517.

MARGONARI, C., FREITAS, C. R., RIBEIRO, R. C., MOURA, A. C. M., TIMBÓ, M., GRIPP, A. H., PESSANHA, J. E., DIAS, E. S.. 2006. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. 101 (1), 31-38.

NETO, J. C., WERNECK, G. L., COSTA, C. H. N.. 2009. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**. 25 (7), 1543-1551.

SHARMA, V. P.. 1997. GIS for Health and the Environment. **Tropical Medicine & International Health**. 2 (5), 508-510.

WERNECK, G. L., MAGUIRE, J. H. 2002. Spatial modeling using mixed models: an ecologic study of visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**. 18 (3), 633-637.

WERNECK, G. L., COSTA, C. H., WALKER, A. M., DAVID, J.R., WAND, M., MAGUIRE, J. H., 2006. Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiologic and Infection**. 135, 1–7.



## CAPÍTULO 3

**Balance of cytokine expression in tissues of dogs where *Leishmania infantum* /*chagasi* usually persists**

**Balance of cytokine expression in tissues of dogs where *Leishmania infantum* /*chagasi* usually persists**

Abstract

Canine leishmaniasis (CanL) caused by the protozoan parasite of genus *Leishmania* is a systemic, chronic and endemic disease. The aim of this study is to evaluate and compare the levels of cytokine (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4) expressions by Realtime-PCR in different tissues/organs from 64 adult dogs naturally infected by *L. (L.) infantum/chagasi*, determination of Hematological and Biochemical parameters with or without clinical signs and after treatment for canine leishmaniasis. The results showed that dogs of symptomatic group exhibited clinical signs compatible with leishmaniasis as normocytic and normochromic anaemia, hypergammaglobulinemia and increase of blood urea nitrogen (BUN). The physical examination of dogs from control and asymptomatic groups did not reveal any clinical signs of canine leishmaniasis. Dogs from treated group showed high levels of BUN, hypergammaglobulinemia and decrease of albumin. On the other hand peripheral blood of symptomatic animals showed increased expression of IL-12 IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 when compared with healthy dogs. Asymptomatic animals and dogs that had been subject to treatment against canine leishmaniasis revealed significant augments of IL-4. Significantly increased in lymph nodes of IL-12 and IL-2 expression was observed in asymptomatic dogs. Treated animals showed significant high levels of IL-12 in bone marrow when compared with healthy, symptomatic and asymptomatic dogs. Besides the difference in the intensity of the cellular

immune response developed by each tissue, the relationship between *L. infantum* and the immune system of the dog, make this specie of animal a good reservoir for this parasite.

Keywords: Immunology, Cellular response, Clinical Pathology

## 1. Introduction

Canine leishmaniasis (CanL) caused by the protozoan parasite of genus *Leishmania* is a systemic, chronic and endemic disease in approximately 50 countries in South of Europe, North Africa, Asia, and South America (Travi et al., 2002, Lima et al., 2003). Dog, the most important reservoir of *L. infantum* has been recognized as the main source of infection for other animals and for the human population therefore representing a problem for both veterinary medicine and public health (Quinnell et al., 2001, Travi et al., 2001).

*Leishmania* parasites are introduced in the skin through the bite of sand flies. They are phagocyted by macrophages where they live and replicate as round, non-motile amastigotes, leading to the lysis of macrophages (Noli, 1999). The amastigotes released are taken up by additional macrophages dispersing the infection for internal organs. Ultimately all the organs containing macrophages and phagocytes are affected, particularly lymph nodes, spleen, liver and bone marrow (Almeida et al., 2003, Awasthi et al., 2004).

The virulence of the parasite, the genetic background, the immunological status and the immune response of the host are factors that interfere in the development of clinical disease. In fact a large majority of the infected dogs

does not develop clinical signs, remaining asymptomatic for variable periods of time or even sometimes for life (Pinelli et al., 1994, Manna et al., 2006).

Several studies in humans and murine models indicated that the successful resolution of *Leishmania* infections depends on the ability of the host to mount a T cell-dependent response with activation of macrophages mediated by T cell-derived cytokines (Brachelente et al., 2005). Resistance to infection depends on a strong type 1 T-helper response (Th1), which involves production of cytokines such as interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukin IL-2 and IL-12 (Pinelli et al., 1994, 1995, Noli, 1999, Pinelli et al., 1999, Corrêa et al., 2007).

Asymptomatic infected dogs have been associated with specific proliferative responses, production of IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  and low anti-leishmanial antibodies titres (Pinelli et al., 1999, Quinell et al., 2001). In contrast, sick animals presented depressed T cell-mediated functions and high levels of specific antibodies (Santos-Gomes et al., 2002). Disease occurs as a consequence of a Th2 response, with production of IL-4, IL-5 and, IL-6 (Pinelli et al., 1999) which in turn promotes B-cell proliferation and antibody production. Unfortunately these antibodies are not protective and may even be detrimental, due to the formation of immune complexes and their subsequent deposition in basement membranes (Noli, 1999, Pinelli et al., 1999).

Quinell et al., (2001) observed that the primary feature identified as distinguishing CanL from *L. infantum* infection in man, mouse, and hamster is the absence of high-level accumulation of IL-10 mRNA in infected tissues. Other study performed in experimental infected dogs also showed reduced

expression of IL-10mRNA in peripheral blood mononuclear cells (Santos-Gomes et al., 2002).

Previous studies carried out in rodent models infected with *L. infantum* showed that different organs/tissues harboring parasites elicit specific cellular immunologic responses. In fact, Wilson e Weinstock, (1996), found different cytokines patterns in hepatic granulomas and splenic cells from BALB/c mice infected with *L. infantum*, and Gomes-Pereira et al., (2004) observed differences on dynamic of memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subpopulations in the spleen and liver of infected mice.

The above considerations highlight the importance of understanding the immune response to *L. infantum* infection raised by different organs were the parasite replicates. The specificity of the local immune response should to be taken into account when it is intended to develop therapeutic or prophylactics products to control canine leishmaniasis. Therefore, the aim of this study is to evaluate and compare the levels of cytokine (IL-12, IFN-  $\gamma$ , IL-2 and IL-4) expressions in different tissues/organs of dogs naturally infected by *L. (L.) infantum/chagasi*, with or without clinical manifestations and after treatment for canine leishmaniasis to improve the understanding of local immunological modulation during parasite evolution. These findings should contribute to a better understanding of the factors leading to development and control of CanL.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Local

Samples were collected from animals living in two different endemic areas, the metropolitan region of Lisbon (Portugal) and in Tamandaré (Brazil). Tamandaré is a town located on Meridional Forest micro region, at south of State of Pernambuco (northeast region of Brazil). This region has a hot climate with annual average temperature around 27°C. The population is approximately of 18.000 habitants distributed by several villages. The city is recovered by a type of seasonally Atlantic forest vegetation, manly palm tree and manguezal (mangrove swamp). Twenty four animals were from Tamandaré city, and 40 dogs from Metropolitan Region of Lisbon.

### 2.2 Animals

The present study included 64 adult dogs of either gender aged between 1 and 15 years (average 5.7 years) and 8 to 40 kg body weight (average 22.5 kg). Fourteen dogs were purebred, while two were crossbreed and 48 were mongrels. Males and females were equally represented in this study.

Animals were submitted to physical examination (behaviour, measurement of internal temperature, observation of skin and mucosa, palpation of lymph nodes and abdominal palpation), followed by laboratorial routine analysis. Afterword dogs were classified as symptomatic or asymptomatic.

Dogs treated for canine leishmaniasis with meglumine antimoniate (Glucantime®, 100 mg/kg. SC or IM, during 28 days) plus allopurinol (Zyloric®

10 mg/kg, twice a day, during six to eight months) were also included in this study.

According to physical examination, laboratorial routine analysis and immunofluorescence assay (IFAT) results, dogs were classified in four groups: control (11), asymptomatic (13), symptomatic (29) and treated (11) dogs.

Prior to inclusion of animals in this study, the dog owners were informed of the objectives of the study and of the nature of the interventions, and their consent were obtained.

### 2.3 Biological samples

Samples of peripheral blood were obtained from cephalic or saphena vein puncture into tubes with EDTA and heparin respectively and maintained at 4°C and until being used for determination of haematological parameters and isolation of leukocytes. Sera samples for IFI assay were obtained from total blood collected into dry tubes.

White blood cells were separated using Ficoll-Hypaque gradients after centrifugation at 1200 rpm, during 30' at room temperature. The cells were resuspended in Gey's solution, during 10' at 4 °C. After the rejection of supernatant, pellet cells were washed with PBS and centrifuged at 370 gs at 4 °C. Afterwards cells were stored in RNA later (Qiagen, Germany) at -80°C until use RTL buffer at -80°C until RNA extraction.

Samples from bone marrow (from distal areas of ribs) and lymph nodes (popliteum or retrofaringeum) were collected by aspirative biopsy from all

animals, into tubes with EDTA/RPMI with 10% of bovine fetal serum was added to samples and these latter were centrifuged for 10 minutes at 4 °C. Cells were washed and stored in RNA later (Qiagen,) at -80°C until use.

All procedures were made according to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals and European Union requirements (86/609/CEE), recognized by Portuguese law (DR DL129/92 and Portaria 1005/92).

#### 2.4. Immunologic tests

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA commercial kit, Biogene, Recife, Brazil) for canine leishmaniasis was used to detect antibodies against *Leishmania* on 24 dog sera from Tamandare using a cut off = 0.214. An indirect immunofluorescence antibody test (Kit *Leishmania* Spot IF®, bioMerieux, France), was used to detect *Leishmania* antibodies in sera of 40 dogs from Lisbon, using a cut-off of 1:80.

#### 2.5. Hematological and Biochemical parameters

The complete blood count (CBC), was performed in a hematology analyser (Cell Dyn 3700, Abbott, USA). Values of alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine, total proteins (TP), albumin, globulin and blood urea nitrogen (BUN) were determined using specific ELISA sets (Termo Electron Corporation, Finland). The results were read in a spectrophotometer (Kone OPTIMA, Finland) adapt to veterinary values.



## 2.6. RNA extraction and reverse transcription.

Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen), treated with Dnase I (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Briefly, homogenization was performed in 700  $\mu$ l of buffer RTL with a rotor stator after elution, the concentration of purified total RNA was determined by measuring the optical density at 260 nm. Samples were denatured at 65 °C for 5 minutes before being reverse transcribed (RT) into cDNA using 200 U M-MLVRT (Life Technologies, Gibco Brl, USA), at 37 °C for 60 min in the presence of 3 mM 5x M-MLV RT Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl and 15 mM MgCl<sub>2</sub>) (Life Technologies, Gibco Brl), 10 mM BSA (Boehringer, Germany), 1 mM dNTPs (Life Technologies, Gibco Brl), 40 U rRNAsin ribonuclease inhibitor and 10x Oligo (dT)<sub>15</sub> (Promega, USA). The samples were then heated 10 minutes at 95 °C for RT inactivation cooled and stored at -20 °C.

## 2.7. Real time PCR analysis

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) quantitative method was performed in the ABI GeneAmp 5700 (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, USA) to quantify the expression of  $\beta$ -actin, IL-2, IL-4, IL-12 and IFN- $\gamma$  mRNA. Diluted cDNA (2.0  $\mu$ l) was amplified with SYBER® Green I dye PCR Master Mix in a total volume of 20  $\mu$ l. Each PCR amplification was performed in duplicate wells, using the following conditions: 10 minutes at 95° C for AmpliTaq Gold activation, followed by a total of 40 cycles (thermal profile for each cycle: 15s at 95°C, 1 minute at 60°C). External cDNA standards were constructed for all target genes by cloning PCR fragments generated by the same primers, into a

pGEM – T Easy Vector according to the manufacturer's recommendations (Promega, USA). Ligated fragments were transformed into JM103 competent cells and plasmid DNA was prepared using the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Applied Sciences, Germany). Concentrations of standards were determined by measuring the OD at 260 nm and the corresponding copy numbers were calculated and serial dilutions from the resulting clones were used as standard curves, each containing known amount of input copy number as previously described (Overbergh et al., 1999, Rosa et al., 2005, Rodrigues et al., 2006). Copy numbers of target genes were normalized to housekeeping gene  $\beta$ -actin, which is present at constant levels in all samples, therefore correcting minor variations in RNA isolation and reverse transcription. Final results were expressed as the copy number of each cytokine per 1000 copies of housekeeping gene  $\beta$ -actin.

## 2.8. Primer sequences

The sense and anti-sense primer sequences for the amplification of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, and IFN- $\gamma$  were previously described by Peeters et al., (2005). The primers for  $\beta$ -actin were described by Sauter et al., (2005).

## 2.9. Statistical analysis

The non-parametric Mann–Whitney U test was used to compare health group with the other groups of dogs and to establish comparisons between symptomatic, asymptomatic and treated groups in relation to cytokine expression levels. Differences were considered significant with 5% significance level ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed with the SPSS 18.0 for Windows software (SPSS Inc., USA).

### 3. Results

#### 3.1. Clinical examination and laboratorial findings

Dogs of symptomatic group exhibited one or more signs compatible with leishmaniasis such as loss of weight, alopecia, skin ulcerations, hiperqueratosis, exfoliative dermatitis, onychogryphosis, pale mucosa membranes, enlarged lymph nodes, anorexia and epistaxis. These animals presented a decrease in the number of total red blood cells ( $3.38 \times 10^6/\mu\text{l}$ , normal range  $5.5-8.5 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) with normal erythrocyte indices (MCV- 71.88 fL, normal range 60-77 fL; MCH - 24.43 pg, normal range: 19.5-24.5 pg; MCHC - 34.04 g/dl, normal range 32-36 g/dl), revealing normocytic and normochromic anaemia, and hypergammaglobulinemia (5.38 g/dl, normal range 2.5-4.5 g/dl) and of blood urea nitrogen (35.35 mg/dl, normal range 7-27 mg/dl).

The physical examination of dogs from control and asymptomatic groups did not reveal any clinical signs of canine leishmaniosis.

Dogs from treated group had high levels of blood urea nitrogen (38.53 mg/dl) and globulins (5.71 g/dl) but lower amounts of albumin (2.10 g/dl, normal range: 2.3-4.0).

The values of blood urea nitrogen above normal range in the symptomatic and treated groups suggest kidney lesion caused by leishmaniosis and/or toxic secondary effects of meglumine antimoniate.

### 3.2 Humoral immune response

Significant antileishmanial antibody titres detected by IFI were observed in five asymptomatic (titres of 1:80), 11 symptomatic (titres  $\geq$  1:320) and five treated dogs (titres of 1:80 in three, 1: 160 in one and  $\geq$  1:320 in one dog). All 24 dogs from Tamandaré city was positive on Elisa test presenting titres over them 0,2140.

### 3.3 Levels of cytokine expressed by peripheral blood leucocytes

Peripheral blood of symptomatic animals showed increased expression of IL-12 ( $p=0.030$ ), IFN-  $\gamma$  ( $p=0.001$ ), IL-2 ( $p<0.001$ ) and IL-4 ( $p=0.001$ ) when compared with healthy control dogs. Asymptomatic ( $p=0.016$ ) dogs and dogs that had been subject to treatment against canine leishmaniasis ( $p=0.006$ ) revealed significant augments of IL-4 expression (Fig 1).

When comparisons were established with treated group significant differences in the expression levels of IFN- $\gamma$  ( $p=0.017$ ), IL-2 ( $p<0.001$ ) and IL-4 mRNA ( $p=0.032$ ) were evidenced in the symptomatic animals and in IL-2 levels of the asymptomatic group ( $p=0.037$ ).

### 3.4 Levels of cytokine expressed by lymph node and bone marrow

Expression of IL-12 ( $p=0.04$ ) and IL-2 ( $p=0.01$ ) was significantly increased in lymph nodes of asymptomatic dogs. Symptomatic dogs revealed high levels of IL-2 ( $p=0.002$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0.045$ ) and treated dogs showed an increased of IL-12 ( $p=0.043$ ) and IL-4 ( $p= 0.030$ ) (Fig 2). Furthermore the levels of IL-4 was significantly high in treated dogs when compared to asymptomatic ( $p=0.008$ ) and symptomatic animals ( $p=0.016$ ).

Treated animals showed significant high levels of IL-12 in bone marrow when compared with healthy ( $p=0.005$ ), symptomatic ( $p=0.014$ ) and asymptomatic dogs ( $p=0.008$ ) (Fig. 3).

#### 4. Discussion

The clinical manifestations that develop following infection with *Leishmania* are dependent of a complex net of interactions between the parasite and the immune system of the host. The spectrum of clinical symptoms present in CanL is related with macrophage activity, T cell kinetics and the profile of cytokines release.

This study evaluates the *in vivo* balance of cytokine expression elicited by different tissues that contact with the parasite. The *in vivo* expression levels of IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 were analyzed in dogs that have established contact with the parasite but did not present symptoms compatible with canine leishmaniasis, dogs suffering from leishmaniasis, dogs that have been treated for CanL and in healthy dogs.

Different immune responses were observed in tissues where the parasite persists. Significant increase of IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 expressions detected in peripheral blood leucocytes of symptomatic dogs evidence a balanced expression of Th1 and Th2 cytokines. IL-12 is the first cytokine released in the microenvironment and is pivotal for the initiation and polarization of the immune response and inhibition of the apoptosis of Th1 cell population (Park et al., 2002). This cytokine plays a critical role in the differentiation of naive T cells into Th1 and is involved in the inflammatory process mediating the production of IFN- $\gamma$  a Th1 cytokine that activates macrophages and enhances their

microbicidal activity (Trinchieri, 2003). Additionally, IL-2 has a dominant role for T cell expansion and effector cell development (Malek et al., 2001). Although the presence of the parasite in the peripheral blood may be controlled by these two cytokines, IL-4, which is involved in the generation of a Th2 response and in down regulation of macrophage activity may allow the presence of the parasite in the blood and, eventually, its transmission. Studies in human leishmania infections and in mice models have made clear the development of mixed Th1/Th2 immune responses (Miralles et al., 1994, Zijlstra and el-Hassan, 2001) High expression of IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 were also reported by Sanchez-Robert et al., (2008) in peripheral blood mononuclear cells of experimental sick dogs. However, another study demonstrated high levels of IL-4 and lower levels of IFN- $\gamma$  in the blood samples of symptomatic naturally infected dogs (Manna et al., 2008). Previously *in vitro* studies carried out by our group showed that IFN- $\gamma$  and IL-2 mRNA were only detected in cultured leucocytes from a reduced number of symptomatic experimental infected dogs (Santos-Gomes et al., 2002). Also the production of IL-2 by peripheral blood leucocytes from symptomatic experimental and naturally infected dogs stimulated with leishmania antigen was low (Pinelli et al., 1994). Besides the different methodologies used, these studies demonstrated that cultured lymphocytes reduce the levels of expression and, eventually production, of Th1 cytokines. These may be associated to the reduced proliferation levels exhibited by these cells (Abranches et al., 1991, Moreno et al., 1999).

Peripheral blood leucocytes from asymptomatic dogs showed significant increases of IL-4 expression evidencing a Th2 immune response. In contrast a previous study reported by Chamizo et al., (2005) evidenced low expression of

IL-4 mRNA in peripheral blood mononuclear cells from asymptomatic dogs. Although, a more recent work demonstrated that the expression of IL-4 increases in asymptomatic dogs with the out coming of the infection (Manna et al., 2006).

In these dogs the expression levels of IL-12, IFN- $\gamma$  and IL-2 were similar to healthy dogs confirming the results obtained by Sanchez-Robert et al., (2008) that reported low expression of IL-12 and IFN- $\gamma$  in blood leucocytes from experimental infected dogs with reduced parasite loads and transient clinical symptoms. In previously *in vitro* studies carried out by our group the expression of these cytokines was only detected in leucocytes of few asymptomatic experimentally infected dogs while an individual variation of IL-2 expression was observed (Santos-Gomes et al., 2002).

The balance between high IL-4 levels together with the low expression of IL-12, IL-2 and IFN- $\gamma$  should favor the presence of the parasite. The suppressive effect of IL-4 on macrophage activation during the early stages of the infection may favor parasite survival in peripheral blood allowing its transmission. In fact, it was verified that asymptomatic naturally infected dogs are able to transmit *L. infantum* to the sand fly (Molina et al., 1994, Travi et al., 2001).

Dermatological lesions, weight loss and lymphadenopathy are the signs more commonly found in CanL (Ferrer, 1999, Amusatogui et al., 2003, João et al., 2006). Significant increases of IFN- $\gamma$  and IL-2 expression was detected in lymph node of sick dogs evidencing a predominant Th1 immune response. On the other hand asymptomatic dogs exhibited significant increases of IL-12 and IL-2 also pointing for the predomination of cytokines associated to a Th1 immune response. These results contrasts with a previously study showing high

expression of IFN- $\gamma$  and low levels of IL-12 in lymph nodes of asymptomatic dogs (Alves et al., 2009).

Bone marrow of asymptomatic and symptomatic dogs showed low levels of IFN-  $\gamma$ , IL-2 and IL-4 expression suggesting absence of an immune response against *Leishmania*. Although no significant different from healthy animals IL-12 was highly expressed in symptomatic dogs, pointing for the induction of antigen presentation

The reduced expression of IL-4 are in accordance with the results obtained by Quinnell et al., (2001) that reported low expression of IL-4, IL-10, and IL-18 in bone marrow of naturally infected dogs. However, these authors also showed increased IFN-g mRNA associated with antibody production.

Taken together the results obtained in present study clearly demonstrate a specific expression of cytokines in each analyzed tissue. Blood leucocytes of sick dogs evidenced a mixed Th1/Th2 and lymph node reveals IL-2 and IFN- $\gamma$  mRNA accumulation while bone marrow seems to be unresponsive. On the other hand blood leukocytes from asymptomatic dogs exhibited a Th2 associated cytokine and lymph node a Th1 immune response. In these dogs bone marrow also do not seem to be able to elicit a specific immune response to leishmania infection.

Lymph node and bone marrow of treated animals revealed increased expression of IL-12. Furthermore, a significant high level of IL-4, a Th2 cytokine, was also verified on blood lymphocytes and lymph node. A previous study has shown that dogs treated for canine leishmaniasis were able to reduce the parasite populations. Even so, antileishmania chemotherapy does not



completely eliminate the parasite and it is possible that *Leishmania* amastigotes remain in lymph nodes (João et al., 2006). The balance between IL-12, which is associated to antigen presentation and inhibition of T cells apoptosis (Park et al., 2002), and IL-4 that inhibit pro-inflammatory immune responses, may restrain parasite replication in lymph node and dispersion. Blood lymphocytes express low levels of IL-12, IFN- $\gamma$  and IL-2. During treatment increased expression of IFN- $\gamma$  in total blood was reported by Manna et al., (2008), although six months after the treatment there was a significant reduction in the levels of this cytokine. A significant higher expression of IL-4 mRNA was detected in blood leukocytes, although the levels are very low pointing to an incipient Th2 immune response.

The outcome of *L. infantum* infection depends on a complex interaction with the dog, with the individual biological characteristics of the parasite and the host contributing to the development of disease manifestations. The present demonstrate that each tissue of the host develop a proper cellular immune response. The immune response presented by each tissue seem to be regulated by the parasite itself in order to assure their one survival and transmission, avoiding, in simultaneous, the precocious death of dog. The balance between Th1 and Th2 cytokines patent in the blood of sick dogs may regulate parasite uncontrolled replication, avoiding a faster dispersion of the parasite, favoring dog fitness and, at the same time, allowing parasite survival and transmission. In the asymptomatic dogs the reduced expression of IFN- $\gamma$  does not seem to favor the efficient control of the parasite, neither the dog develop a strong inflammatory reaction that could have harmful implications. Therefore, IL-2 does not seem to be enough to control the infection. In fact IL-2

regulates the production of immunoglobulins by B cells (Waldmann and Tagaya, 1999, Waldmann, 2006) and the differentiation of regulatory T cells (Sakaguchi et al., 1995, Thornton and Shevach, 1998, Thornton et al., 2004) that may abolish the activity of effector cells. Furthermore the accumulation of IL-2 and IFN- $\gamma$  mRNA in blood and lymph node seem to increase with the severity of infection pointing for a strong pro-inflammatory immune response. Besides the difference in the intensity of the cellular immune response developed by each tissue, the relationship that is established by *L. infantum* with the immune system of the dog, in particular, make the dog a good reservoir for this parasite.

#### Acknowledgments

We thank Drs. João Villa de Brito, Graça Simões, Nuno Pereira and Cristina Costa for getting some of the dogs and J. Ramada for technical support. Funding for this work was provided by a project research grant POCTI/CVT/44884/2002\_by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) with co-participation of the European Union Fund (FEDER) and by a fellowship BEX: 1165/07-0 supported by Capes, Coordenação de Pós Graduação em Ciência Veterinária (UFRPE-Brasil),

## 5. References

- Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. 1991 **An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 13:537-50**
- Alves CF, de Amorim IF, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, Kalapothakis E, Bruna-Romero O, Tafuri WL, Teixeira MM, Melo 2009 MN. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** 15;128:349-58.
- Almeida M.C., Vilhena V., Barral A., Barral-Netto M. 2003. Leishmanial infection: Analysis of its First Steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** 98: 861-870.
- Amusatogui I, Sainz A, Rodríguez F, Tesouro MA. 2003. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Epidemiology.** 18:147-56.
- Awasthi A., Mathur R. H, Saha B. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medicine Research.* 119, 238-258.
- Brachelente C., Muller N., Doherr M. G., Sattler U., Welle M. 2005. Cutaneous Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs is Associated with a T Helper-2–biased Immune Response. **Veterinary Pathology.** 42, 166–175.
- Chamizo, C., Moreno, J., Alvar, J.. 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** 103, 67–75

- Corrêa A. P. F. L., Dossi A. C. S., Vasconcelos R. O., Munari D. P., Lima V. M. F. 2007. Evaluation of transformation growth factor b1, interleukin-10, and interferon- $\gamma$  in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**. 143, 267–274.
- Ferrer, L. M., 1999: Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Canine Leishmaniasis: An Update. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelone, Spain**, pp. 6–10.
- Gomes-Pereira S, Rodrigues OR, Santos-Gomes GM. 2004. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. **Immunology Letters**. 95:63-70.
- João A, Pereira MA, Cortes S, Santos-Gomes GM. 2006. Canine leishmaniasis chemotherapy: dog's clinical condition and risk of *Leishmania* transmission. **Journal of Veterinary Medicine: A Physiology Pathology Clinical Medicine**. 53:540-5.
- Lima V. M. F., Gonçalves M. E., Ikeda F. A., Luvizotto M. C. R., Feitosa M. M. 2003. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 36, 485-489.
- Malek TR, Yu A, Scibelli P, Lichtenheld MG, Codias EK. 2001. Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. **Journal of Immunology**. 166: 1675–83

Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Caracappa S, Gravino AE. 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**. 142:271-80.

Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, Gravino AE. 2008. Interferon-gamma (IFN-gamma), IL-4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. **Cytokine**. 44:288-92.

Miralles G.D., M.Y. Stoeckle, D.F. McDermott, F.D. Finkelman and H.W. Murray, Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis, **Infection and Immunity** 62 (1994), pp. 1058–1063

Molina, R., C. Amela, J. Nieto, M. San-Andrés, F. González, J. Castillo, J. Lucientes, and J. Alvar, 1994: Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 88, 491-493

Moreno J, Nieto J, Chamizo c, Gonzalez F, Blanco F, Barker DC, Alvar J. 1999. The immune response and PMBC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 71, 181-195

Noli C. 1999. Canine leishmaniasis. *Waltham focus*. 9 , 16-24.

Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., Mathieu C. 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. **Cytokine**. 11: 305–312.

Park AY, Hondowicz B, Kopf M, Scott P. 2002. The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. **Journal of Immunology**.168: 5771-7.

Peeters, D., Peters, I. R., Farnir, Clercx, C., Day, M. J. 2005. Real-time RT-PCR quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in histologically normal canine nasal, bronchial and pulmonary tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 104, 195–204.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**. 62:229-35.

Pinelli, E., Van der Kaaij, S. Y., Slappendel. R., Fragio, C., Ruitenber, E. J., Bernadina, W., Rutten, V. P. M. G. 1999. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 69, 121 – 126.

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM. 2001 Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**. 183:1421-4.

Rodrigues OR, Moura RA, Gomes-Pereira S, Santos-Gomes GM 2006 H-2 complex influences cytokine gene expression in *Leishmania infantum*-infected macrophages. **Cellular Immunology**. 243:118-26.

Rosa, R., Rodrigues, O. R, Marques, C., Santos-Gomes, G. M.. 2005. *Leishmania infantum*: soluble proteins released by the parasite exert differential effects on host immune response. **Experimental Parasitology**. 109, 106–114

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains

(CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal of Immunology**. 155: 1151–64.

Sanchez-Robert E, Altet L, Alberola J, Rodriguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timon M, Sanchez A, Francino O. 2008. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 125:168-75.

Santos-Gomes, G. M., Rosa, R. Leandro, C. Cortes, S., Romão, P., Silveira, H. 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 88, 21-30.

Sauter, S. N., Allenspach, K., Gaschen, F., Grone, A. E. Ontsouka, Blum J. W. 2005. Cytokine expression in an *ex vivo* culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: Modulation by probiotic bacteria. **Domestic Animal Endocrinology**. 29, 605–622.

Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the *in vitro* activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function". **Journal of Immunology**. 172: 6519–23.

Thornton AM, Shevach EM 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production". **Journal of Experimental Medicine**. 188: 287–96.

Travi, B.L., C.J. Tabares, H. Cadena, C. Ferro, and Y. Osorio, 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and

parasitological status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 64, 119-124.

Travi BL, Ferro C, Cadena H, Montoya-Lerma J, Adler GH. 2002. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Research Veterinary Science.** 72:83-6.

Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, **Nature Reviews: Immunology.** 3, 133.

Zijlstra EE, el-Hassan AM. 2001. Leishmaniasis in Sudan. Post kala-azar dermal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** 95, Suppl 1, 59-76.

Waldmann TA 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. **Nature Reviews: Immunology.** 6 : 595–601.

Waldmann TA, Tagaya Y. 1999. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. **Annual Review of Immunology.** 17: 19–49.

Wilson, M. E., Weinstock, J. V. 1996. Hepatic granulomas in murine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. **Methods,** 9: 248-254.



## Legends

Figure 1 - Levels of IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 expressed by leucocytes isolated from peripheral blood of healthy, asymptomatic, symptomatic and treated dogs.  $*(p<0.05)$  indicates statistically significant differences in comparison to healthy dogs.

Figure 2 - Levels of IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 expressed by lymph nodes (A) and bone marrow (B) of healthy, asymptomatic, symptomatic and treated dogs.  $*(p<0.05)$  indicates statistically significant differences in comparison to healthy dogs.

## Figures

Fig. 1

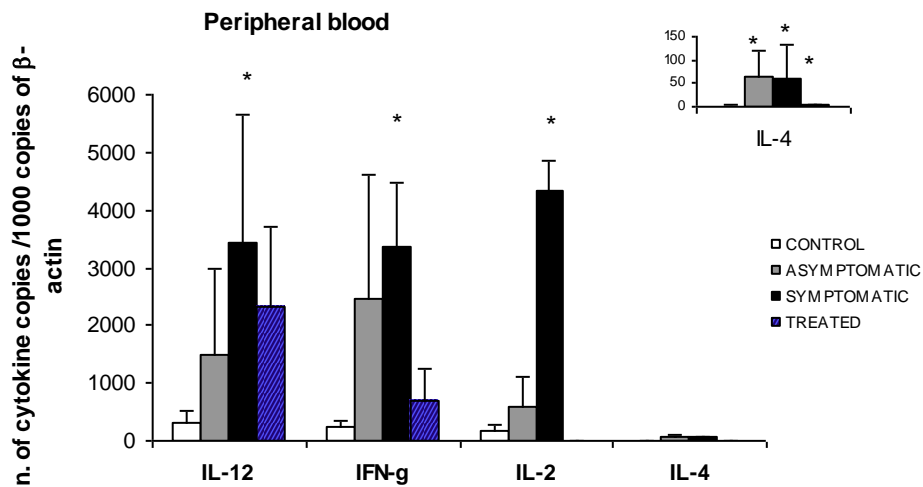
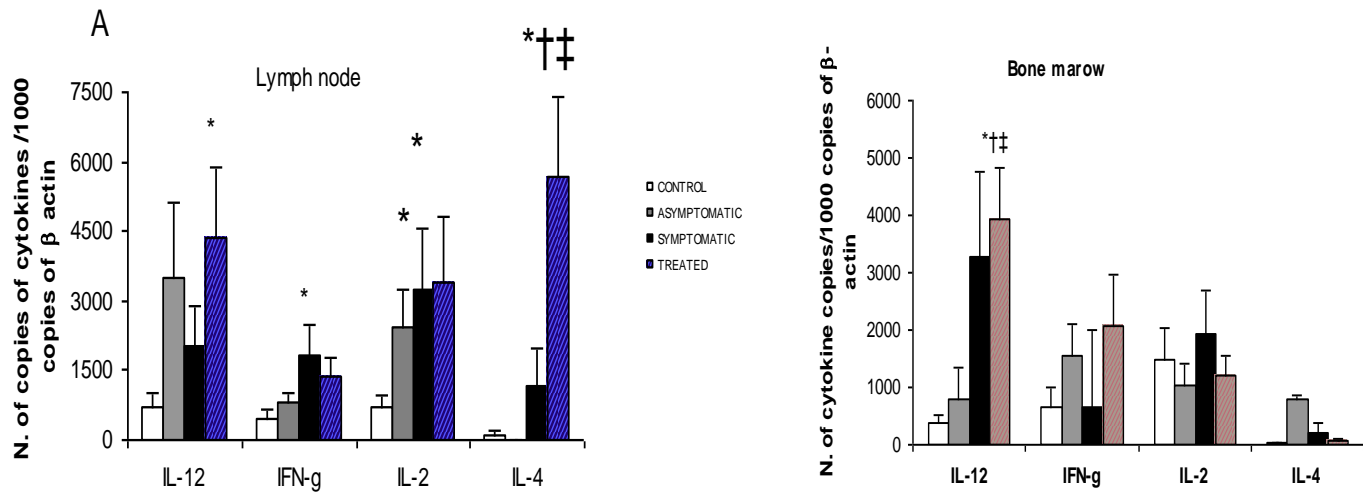


Fig. 2



## **11. CAPÍTULO 4**

**LEVELS OF *Leishmania chagasi* SPECIFIC IGG2 IN SYMPTOMATIC AND  
ASYMPTOMATIC DOGS NATURALLY INFECTED USING CPX2 PROTEIN**

## Levels of *Leishmania chagasi* specific IgG2 in symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected using CPX2

### Abstract

Canine Visceral Leishmaniasis (CanL) is present all over the Brazilian states with high prevalence ranges, particularly in northeast. Recently some *Leishmania* sp. genes encoding parasite proteins have been characterized in the diagnostic of *Leishmania* species. The goal of this study was to evaluate the levels of *Leishmania chagasi* specific IgG2 antibodies in symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected using CPX2. A total of 217 sera samples from both sex and different breeds and ages were analyzed by CPX2 antigen ELISA test. The results showed 41.01% (89/217) of dogs were positive to IgG2 antibodies. The evaluation of the CPX2 antigen showed high levels of *Leishmania chagasi* specific IgG2 antibodies in asymptomatic, however because of the cross reaction with non-leishmaniasis disease observed in ELISA tests, it cannot be recommended for classify symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected.

Key-Words: Canine Visceral Leishmaniasis; Clinical disease, Antibodies Class Production; Recombinant Protein.

## 1. Introduction

Canine Visceral Leishmaniasis (CanL) is caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), is a systemic, chronic, and even fatal disease characterized by lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, skin ulceration, onychogriposis, weight loss, cachexia, conjunctivitis and renal dysfunction (WILSON et al., 2005, ADAMA-MORAITOU et al., 2007). However the infection may remain asymptomatic for years representing a public-health problem (CARDOSO et al., 2007) due to the risk of infection in dogs and humans. Therefore to control this disease is crucial to identify the asymptomatic animals.

At least two serological tests have been applied for antibody detection of CanL diagnosis including Immunofluorescent antibody test (IFAT) and enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). However some authors have been demonstrated the possibility of using as antigen source intact lysed parasites or recombinant proteins to increase the sensibility of tests have been demonstrated (CASTRO et al., 2002, SANTARÉM et al., 2005).

Recently some *Leishmania* sp. genes encoding parasite proteins as LmS3a: LmSIR2, *LimTXNPx*, *LicTXnPx* and *LITXN1* (SANTARÉM et al., 2005) have been characterized and the use of specific antibodies against the recombinant proteins (LmSIR2, LmS3a and *LimTxNPx*) demonstrate their expression by promastigotes and amastigotes of different *Leishmania* species (ZEMZOUMI et al., 1998, ZEMZOUMI et al., 1999).

Among these *LmSIR2* protein antibodies was present in the majority of asymptomatic and symptomatic naturally infected animals (CORDEIRO-DA-SILVA, et al., 2003).

The goal of this study was to evaluate the level of *Leishmania chagasi* specific IgG2 in symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected using CPX2 protein.

## **2. Material and methods**

### 2.1 Animals

A total of 217 dogs from both genders and different breeds and ages from Tamandaré County, state of Pernambuco, Brazil, (08°46´ 01´´S and 35° 06´ 13´´W) were used.

### 2.2 Clinical and serological examination

Before the procedures an informed consent was obtained from each dog owner. All dogs were submitted to a clinical examination to evaluate signs of CanL as lymphadenopathy, skin ulceration, onychogriposis, conjunctivitis, according to Ferrer, (1999). The animals were classified as asymptomatic and symptomatic. The serum samples from each dog was obtained by venous puncture and stored at 4°C. The sera were confirmed to be positive for CanL by using Kit of canine Calazar ELISA S7® which uses recombinant peptides of *Leishmania chagasi* according to manufacture instructions.

On the other hand, 13 samples from dogs with non-leishmaniasis diseases, *Babesia* sp, *Leptospira* sp. *Dypilidium caninum* , *Ancylostoma* sp and *Sarcoptes* sp., from Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Portugal, obtained from an endemic region of “Alto do d’Ouro were studied in parallel as controls.

### 2.3 Parasites, antigens and ELISA using CPX2 protein

The CPX2 antigen was obtained from *L. infantum*-like promastigotas acquired from “Universidade do Porto - Portugal”. ELISA test was performed as described by Leandro et al., (2001) with some modifications regarding the dilution and conjugates used. Soluble antigen (10µl/ml was diluted in 0.1M sodium carbonate buffer (pH 9), and 100µl per well were used, to coat flat bottom 96-well polysorp microtitre plates (Nunc, Naperwille, USA) for 1 h at 4°C. Plates were washed two times with washing buffer [10mM Tris pH 7/8; 0.1M NaCl containing 0.05% Tween 20 (Sigma, St Louis, USA)] and blocked for 30 min at 37°C with blocking buffer [ 50mM tris pH 7/8; 0.15M NaCl (TBS) containing 1% bovine serum albumin (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany)]. Dog sera were diluted (1:1000 for IgG2) with TBS containing 0.05% Tween 20, and 100 µl per well were added to the plates. After 1 h incubation at 37° C, plates were washed two times. Diluted goat anti-dog IgG2-HRP conjugates in TBS [0.05% Tween 20] were added to each well and incubated for 1 h at +37°C. After three washes 100µl of tetramethyl-benzidine was added to each well (Sigma, St Louis, USA). The reactions were stopped by addition of 50 µl of 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per well. Absorbance values were read at 450 nm in an

automatic microELISA reader (Titertek MultiSkan Plus MK II). Sera from healthy dogs were used as a negative control. The concentrations of the *Leishmania infantum* antigen CPX2 and the dog's serum dilution were 0,125µg/µl for antigen and 1:1000 for the serum dilution.

## 2.4 Statistical analysis

Data analysis was performed using the SPSS 16.0 statistical program (SPSS Inc., USA). The *t* Student and Mann Whitney tests, with a 5 % level of significance, were used to compare IgG2 levels between different clinical groups (asymptomatic and symptomatic) (REIS, 2003).

## 3. Results and discussion

The results of ELISA using the CPX2 antigen showed 41.01% (89/217) of dogs were positive to IgG2 antibodies.

Among the positive animals, asymptomatic dogs showed higher IgG2 antibody levels (68,53%) than symptomatic animals (31,46%), but no statistic significance was found.

Some serological tests have been applied for antibody detection of CanL with proteins expressed in stationary-phase promastigote and amastigote with satisfactory results (SANTARÉM et al., 2005, COELHO et al., 2009).



Iniesta et al., (2005) observed significant high levels of antibodies of the IgG2 subclass in asymptomatic and symptomatic dogs and suggested that this is consequence of Th-cell response type.

The relationship between IgG2 expression with asymptomatic infections have been described in several studies (PINELLI et al., 1994, DESPLAZES et al., 1995, SOLLANO – GÁLLEGO et al., 2001, INIESTA et al., 2005), however conflicting results regarding the up-regulation of IgG subclasses have been reported (INESTA et al., 2007).

In despite of a large number of serological tests for CanL, it remains a problem to elucidate the positive animals with non clinical signs.

On the other hand the presences of specific IgG2 in infected animals have been suggested as a marker for the clinical status (DEPLAZES et al., 1995, LEANDRO et al., 2001, SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

From 13 samples from dogs with non-leishmaniasis disease tested as controls on ELISA using CPX2 protein, 38.46% (5/13) showed cross reaction, particularly, sera from animals with *Babesia* sp, *Leptospira* sp. *Dypilidium caninum* , *Ancylostoma* sp and *Sarcoptes* sp.

Cross reaction have been reported in dogs infected with *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* (MANCIANTI et al., 1996, GOMES e CORDEIRO, 2004) *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Hepatozoon canis* (METTLER et al., 2005) *Trypanosoma cruzi* (VEXENAT et al., 1996; LUCIANO et al., 2009) and *Demodex canis* (LIRA, 2005).

The low specificity of immunological tests and the co-infection with other diseases may be responsible for this kind of reaction.

#### 4. Conclusion

The evaluation of the CPX2 antigen showed high levels of *Leishmania chagasi* specific IgG2 antibodies in asymptomatic, however because of the cross reaction with non-leishmaniasis disease observed in ELISA tests, it cannot be recommended for classify symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected.

#### 5. References

Adama-Moraitou, K. K., Rallis, T. S., Koutinas, A. F., Tontis, D., Plevraki, K., Kritspi, M.. 2007. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 76, 53-57.

Cardoso, L., Schallig, H. D .F. H., Cordeiro-da-Silva, A., Cabral, M., Alunda, J. M., Rodrigues, M.. 2007. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 117, 35–41.

Castro, H., Sousa, C., Santos, M., Cordeiro-Da-Silva, A., Flohé, L., Tomás, A. M..2002. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial

peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. **Free Radical Biol. Med.** 33, (11), 1552–1562.

Coelho, E. A. F., Ramírez, L., Costa, M. A.F., Coelho, V.T.S., Martins, V. T., Chávez-Fumagalli, M. A., Oliveira, D. M., Tavares, C. A. P., Bonay, P., Nieto, C. G., Abánades, D. R., Alonso, C., Soto, M.. 2009. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* ribosomal protein extracts. **Clin. Vaccine Immunol.** 16 (12), 1774-1780.

Cordeiro-Da-Silva, A., Cardoso, L., Araújo, N., Castro, H., Tomás, A., Rodrigues, M.. 2003. Identification of antibodies to Leishmania silent information regulatory 2 SIR (SIR2) protein homologue during canine natural infections pathological implications. **Immunol Lett.** 68, 155-162.

Desplazes, P., Smith, N. C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J.. 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody response of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol.** 17, 451-458.

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

Gomes, A. P. S.; Cordeiro, R. L. R. 2004. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. **Rev. Bras. Parasitol Vet.** 23, (1), 238-?.

Iniesta L., Gállego, M., Portús, M.. 2005. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 103, 77–81

Iniesta L., Gállego, M., Portús, M.. 2007. Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 119, 189-197.

Leandro, C., Santos-Gomes, G., Campino, L., Romão, P., Cortes, S., Rolão, N., Gomes-Pereira, S., Riça Capela, M. J., Abranches, P.. 2001. **Cell mediated** immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 79, 273-284.

Lira, R. A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos *Kits* EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos. **Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) -Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz –NESC/CPqAM/FIOCRUZ.** 2006 43p.

Mancianti, F.; Pedonese, F.; Poli, A. 1996. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Vet Parasitol.** 65, (1), 1-9.

Luciano, R. M., Lucheis, S. B., Troncarelli, M. Z., Luciano, D. M., Langoni, H. . 2009. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** 46 (3), 181-187,

Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Del Real G., Ruitenbergh, J.. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun.** 62, 229-35.

Reis, J. C. Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária. Olinda, 2003, 651p.

Santarén, N., Tomás, A., Ouaiissi, A., Tavares, J., Ferreira, N., Manso, A., Campino, L., Correia, J. M., Cordeiro-Da-Silva, A.. 2005. Antibodies against *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of viscera leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. **Immunol. Lett.** 101,18-23.

Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, M., Ferrer, L.. 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infections in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microbiol.** 39, 560-563.

Vexenat, A. C., Santana, J. M., Teixeira, A. R. L.. 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania Chagasi* and *Leishmania (viannia) brasiliensis*. **Rev Inst Med Trop S Paulo.** 28, (3), 177-185.

Wilson, M. E., Jeronimo, S. M. B., Pearson, R. D.. 2005 Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb. Pathog.** 38, 147–160

Zemzoumi, K., Guilvard, E., Sereno, D., Preto, A., Benlemlih, M., Cordeiro-Da-Silva, A., Lemesre, J. L., Ouaiissi, A.. 1999. Cloning of *Leishmania major* gene

encoding for an antigen with extensive homology to ribosomal protein S3a. **Gene**. 240, 57.

Zemzoumi, K., Sereno, D., François, C., Guilvard, E., Lemesre, J. L., Ouaiissi, A.. 1998. *Leishmania major*. cell type distribution of a 43kDa antigen related to silent information regulatory-2 protein family. **Biol. Cell**. 90, 239

## 12. Conclusões Gerais

Diante dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que o município de Tamandaré, PE necessita de medidas sanitárias como controle do vetor, controle de cães doentes e educação da população em relação à Leishmaniose Visceral Canina.

Embora não tenha havido relação dos casos de Leishmaniose Visceral canina com hidrologia e vegetação, no município de Tamandaré, a tecnologia do GIS e o RS podem ser bastante úteis no estudo da doença.

Aliando-se a diferença de intensidade da resposta immune celular desenvolvida por cada tecido à relação estabelecida pela *L. infantum* com o sistema immune em particular, foi possível concluir que o cão é um bom reservatório para o parasita.

O teste com a proteína CPX2 na quantificação de IgG2 no ELISA mostrou que animais assintomáticos apresentam altos níveis de IgG2 específicos muito embora, devido a reação cruzada com outras doenças infecciosas, esta não é recomendada para diferenciar animais naturalmente infectados, sintomáticos e assintomáticos.

Como o cão é o principal reservatório no Brasil e a infecção canina precede a infecção humana, esses resultados indicam que medidas de controle devem ser aplicáveis na população canina no município de Tamandaré a fim de evitar casos humanos.

## 15. ANEXOS



## 15.1 Anexo 1

### AMBULATÓRIO DE LEISHMANIOSE

Data:

Horário:

Responsável:

#### 1. FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

Nome do proprietário:

Nome do animal:

Idade:

Sexo: F( ) M( )

Raça:

Pelagem: ( ) curta ( ) média ( ) longa

Porte: ( ) pequeno ( ) médio ( ) grande Cor: ( ) branca ( ) preta ( ) marrom ( ) dourada ( ) cinza

Procedência:

Viagens: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

Endereço:

Bairro:

Fone:

Médico Veterinário Responsável:

Fone:

#### 2. AVALIAÇÃO DO ANIMAL

Início da sintomatologia:

Vermifugado: ( ) sim

Apetite normal: ( ) sim

Perda de peso: ( ) sim

Oftalmologia presente: ( ) sim

Micção normal: ( ) sim

Epistaxe: ( ) sim

Problema articular: ( ) sim

Aumento de linfonodo: ( ) sim

Grifose: ( ) sim

Úlcera cutânea: ( ) sim

#### 3. MATERIAL COLETADO

Punção de medula: ( ) sim ( ) não

Eternal: ( ) sim ( ) Ilíaca

Raspado/pele integra: ( ) sim ( ) não

Raspado/pele lesionada: ( ) sim ( ) não

Soro: ( ) sim ( ) não

Plasma: ( ) sim ( ) não

( ) não

( ) não

( ) não

( ) não

( ) não

#### 4. DADOS SOBRE O VETOR

Presença de mosquito: ( ) sim ( ) não

#### 5. RESULTADO

Parasitológico de medula: ( )

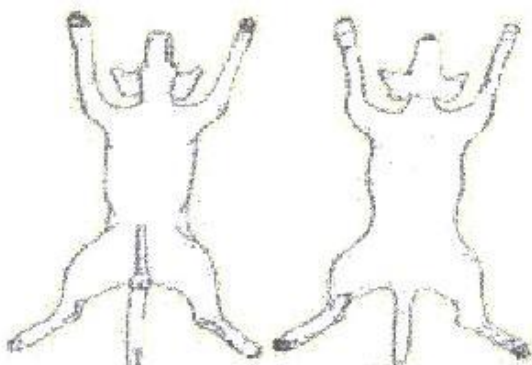
Eternal: ( ) Ilíaca: ( )

Parasitológico/pele integra: ( ) ( )

#### 6. LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES

Parasitológico/pele lesionada ( ) ( )

Sorologia/ELISA: ( ) ( )



## 15.1 Anexo 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, residente em \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Portador do RG nº \_\_\_\_\_ abaixo assinado atesto que entendi o conteúdo deste consentimento informado e concordo de livre e espontânea vontade de participar do projeto de pesquisa "**Vigilância epidemiológica da Leishmaniose Visceral Canina no município de Petrolina através do uso de Sistemas de Informações Geográficas (SIG)**". Declaro, ainda, que esclareci todas as minhas dúvidas com os profissionais pela pesquisa e autorizo à publicação dos dados e/ou as fotos.

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do Proprietário**

data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_