

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

VALÉRIA DA COSTA OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA DE *Leishmania infantum* EM SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS: LESÕES ASSOCIADAS E
ISOLAMENTO PARASITOLÓGICO DE TECIDOS E
LÍQUOR**

Rio de Janeiro

2016

**OCORRÊNCIA DE *Leishmania infantum* EM SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS: LESÕES ASSOCIADAS E
ISOLAMENTO PARASITOLÓGICO DE TECIDOS E
LÍQUOR**

VALÉRIA DA COSTA OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Rio de Janeiro

2016

A Deus pela vida e ajuda em todos os momentos.

À minha família pela compreensão.

Aos amigos e profissionais por todo ensinamento.

Aos animais pelo aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, e por toda ajuda e bênçãos que me foi dada até aqui, pois sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço à minha família pela compreensão nos momentos de ausência e aos meus pais por terem me ensinado a buscar meus sonhos e objetivos sempre com determinação e honestidade.

Agradeço a todos os profissionais do Laboratório de Anatomia Patológica e do Serviço de Vigilância de Leishmanioses pelos ensinamentos passados e por tornar possível a conclusão deste estudo.

Agradeço a todos do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses (LAPCLIN-DERMZOO) sempre muito dispostos a ajudar, tanto na execução deste trabalho como nos momentos difíceis da minha vida pessoal. Vocês são grandes amigos.

Agradeço ao Dr. Rodrigo Caldas Menezes e a Dra. Maria de Fátima pela confiança, disponibilidade e ajuda. Obrigada por estarem do meu lado toda vez que precisei e por me apoiarem.

Agradeço à Monique Campos pelo suporte e conhecimentos passados nas técnicas de qPCR.

Agradeço aos animais do estudo por todo o aprendizado e progresso obtido, pois sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pelo auxílio financeiro e pela oportunidade.

“Que os vossos esforços desafiem
as impossibilidades, lembrai-vos
de que as grandes coisas do
homem foram conquistadas
do que parecia impossível”

(Charles Chaplin)

Oliveira, VC. **Ocorrência de *Leishmania infantum* em sistema nervoso central de cães naturalmente infectados: lesões associadas e isolamento parasitológico de tecidos e líquido.** Rio de Janeiro; 2016. 99 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

RESUMO

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*) e alterações histológicas atribuídas à infecção por esse parasito já foram relatadas em diferentes tecidos do sistema nervoso central (SNC). Entretanto, ainda não há relatos do isolamento do parasita nestes tecidos em cães do Brasil. Os objetivos deste estudo foram avaliar a ocorrência de *L. infantum* em diferentes tecidos do SNC e no líquido e identificar alterações histológicas associadas a esse parasito nesses tecidos em cães naturalmente infectados. Foi estudada uma amostra de 50 cães soropositivos para *Leishmania* no ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunocromatografia de duplo percurso (DPP®), provenientes do município de Barra Mansa. Estes animais foram submetidos à eutanásia e necropsia, sendo coletados: líquido, amostras teciduais de cérebro, cerebelo, tronco encefálico, medula espinhal e baço. O líquido e amostras teciduais foram submetidos à cultura parasitológica e qPCR. Amostras de cada tecido do SNC e baço foram fixadas em formalina tamponada a 10% e processadas pelas técnicas de imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e histopatologia. As amostras de baço foram submetidas somente às técnicas de imuno-histoquímica e histopatologia. Adicionalmente, 37 amostras de líquido foram submetidas ao teste DPP®. Sinais clínicos neurológicos foram observados em dois cães (4%): um apresentava paraparesia e o outro ataxia e desorientação. Todos os cães apresentaram positividade para *L. infantum* em SNC em pelo menos uma das técnicas utilizadas. Formas amastigotas foram identificadas em tronco encefálico e medula espinhal cervical em apenas um cão (2%) pelas técnicas histológicas. Formas viáveis de *L. infantum* foram isoladas no líquido, encéfalo e medula espinhal de treze animais (26%). Anticorpos anti- *L. infantum* foram detectados no líquido de 65% dos cães. As alterações histológicas inflamatórias em SNC foram observadas em dezesseis animais (32%) e foram caracterizadas por: meningite em treze animais (81%), manguito perivascular em sete (44%), coroidite em quatro (25%), encefalite em dois (12%) e mielite em um animal (6%). Na técnica de qPCR foi observado que encéfalo apresentou a maior frequência de positividade (98%) para *L. infantum*, seguido da medula espinhal (96%) e líquido (51%). A maior carga parasitária de *L. infantum* foi observada na medula espinhal (mediana de 1,996 gEq/ng), seguida do líquido (mediana de 0,712 gEq/ng) e encéfalo (mediana de 0,075 gEq/ng). A carga parasitária no baço foi correlacionada positivamente à carga parasitária de encéfalo ($p=0,005$) e medula espinhal ($p=0,006$). Esses resultados demonstraram que *L. infantum* é comum no SNC de cães naturalmente infectados por esse parasito. Portanto, esse parasito é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e causar alterações inflamatórias no SNC, que não estão necessariamente associadas a sinais clínicos neurológicos.

Palavras- chave: 1.Sistema nervoso central. 2. *Leishmania infantum*. 3. Cão. 4. Leishmaniose visceral. 5. Histopatologia. 6. PCR. 7. Diagnóstico.

Oliveira, V.C. **Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of dogs naturally infected: associated lesions and parasite isolation in tissues and cerebrospinal fluid.** Rio de Janeiro; 2016. 99 f. Dissertation [Masters in Clinical Research in Infectious Diseases] - Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation.

ABSTRACT

The zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) is caused by the protozoan *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*) and histological alterations attributed to the infection by this parasite were reported in different tissues of central nervous system (CNS). However, there are no reports of isolation of this parasite in these tissues in dogs from Brazil. The aims of this study were to evaluate the occurrence of *L. infantum* in different tissues of CNS and in the cerebrospinal fluid, and to identify the histological alterations associated with this parasite in these tissues in naturally infected dogs. A sample of 50 dogs seropositive for *Leishmania* in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunochromatographic rapid test Dual Path Platform (DPP®) were studied. These dogs were from the municipality of Barra Mansa. These dogs were euthanized, necropsied and the following samples were collected: cerebrospinal fluid, tissue samples of cerebrum, cerebellum, brain stem, spinal cord and spleen. The cerebrospinal fluid and tissue samples were submitted to parasitological culture and qPCR. Samples of each tissue of CNS and spleen were fixed in 10% buffered formalin and processed for histopathology, immunohistochemistry and *in situ* hybridization. The spleen samples were only submitted to histopathology and immunohistochemistry. Additionally, 37 samples of cerebrospinal fluid were submitted to DPP® assay. Neurological clinical signs were observed in two dogs (4%): one presented paraparesia and the other ataxia and maze. All the dogs presented positivity for *L. infantum* in CNS in at least one of the techniques used. Amastigote forms were identified in the brain stem and cervical spinal cord in one dog (2%) by the histological techniques. Viable forms of *L. infantum* were isolated in the cerebrospinal fluid, brain and spinal cord of 13 animals (26%). Anti- *L. infantum* antibodies were detected in the cerebrospinal fluid in 65% of dogs. Inflammatory histological alterations in CNS were observed in 16 (32%) dogs and were characterized by meningitis in 13 (81%) dogs, perivascular cuffing in seven (44%), choroiditis in four (25%), encephalitis in two (12%), and myelitis in one (6%). In the qPCR, the brain presented the higher frequency of positivity (98%) for *L. infantum*, followed by spinal cord (96%) and cerebrospinal fluid (51%). The higher parasite burden of *L. infantum* was observed in the spinal cord (median of 1.996 gEq/ng), followed by cerebrospinal fluid (median of 0.712 gEq/ng) and brain (median of 0.075 gEq/ng). The parasite burden in the spleen was positively correlated with the parasite burden in the brain ($p=0.005$) and in the spinal cord ($p=0.006$). These results demonstrated that *L. infantum* is common in the CNS of dogs naturally infected by this parasite. Therefore, this parasite is able to cross the blood-brain barrier and cause inflammatory alterations in CNS, which are not necessarily associated with neurological clinical signs.

Key words: 1. Central nervous system 2. *Leishmania infantum* 3. Dog 4. Visceral leishmaniasis 5. Histopathology 6. PCR 7. Diagnosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo de vida *Leishmania infantum*. **1.** Promastigotas metacíclicos são tranferidos para o hospedeiro vertebrado durante alimentação do flebotomíneo fêmea; **2.** Promastigotas são fagocitados pelos macrófagos e dentro de vacúolo (fagossomo) se transformam em amastigotas; **3.** As formas amastigotas se multiplicam por divisão binária; **4.** Amastigotas são liberadas do macrófago, infectando novos macrófagos; **5.** O vetor se alimenta de sangue de hospedeiro vertebrado infectado e ingere macrófagos parasitados. No tubo digestivo do vetor as amastigotas se transformam em promastigotas. **6.** Os promastigotas aderidos ao epitélio intestinal do vetor passam por diferenciação terminal e evolui para a forma metacíclica.....3

Figura 2. Estrutura da BHE. Esquema demonstrando estrutura normal da BHE entre o cérebro e vaso sanguíneo, composta por célula endotelial onde se encontram as junções apertadas (*tight junction- TJ*) e moléculas de Junções Associadas (AJ) que permitem a interação entre essas células. Mais abaixo se encontra a lamina basal composta pela matriz extracelular, onde se encontram as metaloproteinases (MMPs).....10

Figura 3. Coleta de amostras de SNC de cão infectado por *L. infantum*. Punção de líquido da região atlanto- occipital (A). Coleta medula espinhal (B). Corte de fragmento de cérebro (C). Fragmento de medula espinhal cervical, torácica e lombar (*pool* de medula espinhal) armazenados em tubo de polipropileno estéril e livre de *DNA* para realização de qPCR (D).....22

Figura 4 - Fluxograma da coleta de líquido.....23

Figura 5 - Fluxograma das coletas teciduais.....23

Figura 6. Frequência dos sinais clínicos gerais observados em cães naturalmente infectados, fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....36

Figura 7. Corte histológico de medula espinhal cervical de cão infectado por *L. infantum* mostrando várias formas amastigotas de *Leishmania* no citoplasma de macrófagos (setas) e infiltrado inflamatório granulomatoso composto por linfócitos, macrófagos e plasmócitos no espaço perivascular da substância branca. Hematoxilina-eosina.....39

Figura 8. Corte histológico de medula espinhal cervical de cão infectado por *L. infantum* mostrando formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho (setas) no espaço perivascular da substância branca. Imuno-histoquímica.....39

Figura 9. Corte histológico de medula espinhal cervical de cão infectado por *L. infantum* mostrando formas amastigotas de *Leishmania infantum* marcadas em azul (setas) no espaço perivascular da substância branca. Hibridização *in situ*.40

Figura 10. Corte histológico de tronco encefálico de cão infectado por *L. infantum* mostrando meningite supurativa composta por linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Hematoxilina-eosina.....40

Figura 11. Corte histológico de tronco encefálico de cão infectado por *L. infantum* mostrando manguito perivascular de linfócitos, plasmócitos e macrófagos na substância cinzenta. Hematoxilina-eosina.....41

Figura 12. Frequência das alterações histológicas observadas em tecidos do SNC de cães naturalmente infectados, fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....41

Figura 13. Frequência de regiões do SNC acometidas por alterações inflamatórias em cães naturalmente infectados, fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil). M.E.=medula espinhal.....42

Figura 14. Corte histológico de baço de cão infectado por *L. infantum* mostrando acentuada esplenite granulomatosa com formação de granuloma mal organizado no parênquima. Hematoxilina-eosina.....45

Figura 15. Corte histológico de baço de cão infectado por *L. infantum* mostrando acentuada periesplenite e esplenite granulomatosas com múltiplos granulomas bem organizados (nodular) no parênquima (círculo). Hematoxilina-eosina.....46

Figura 16. Corte histológico de baço de cão infectado por *L. infantum* mostrando acentuada periesplenite e esplenite granulomatosas com infiltrado inflamatório mal organizado constituído por macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Abundantes formas amastigotas de *Leishmania* foram observadas no interior de macrófagos. Hematoxilina-eosina.....46

Figura 17. Corte histológico de baço de cão infectado por *L. infantum* mostrando diversas formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho. Imuno-histoquímica.....47

Figura 18. Gráfico representativo da curva-padrão com os índices Slope, Y-inter, R^2 e eficiência da qPCR. Os pontos da curva indicam a diluição seriada na base 10 de 500 a 0,05 gEq de *L. infantum*/μL.....49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Frequência dos diferentes tipos de infiltrado inflamatório observados nas lesões inflamatórias do SNC em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil).....43
- Tabela 2 Intensidade dos diferentes tipos de células inflamatórias observados nos tecidos do SNC com alterações inflamatórias em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil).....43
- Tabela 3. Correlação das alterações histológicas inflamatórias nos tecidos do SNC com a positividade para *L. infantum* nos exames parasitológicos em amostras de SNC em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil).....44
- Tabela 4. Correlação das alterações histológicas encontradas no baço com a positividade para *L. infantum* em amostras de SNC detectadas pelos testes parasitológicos (cultura e técnicas histológicas) em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil).....48

Tabela 5. Mediana e valores mínimos e máximos (ng/ μ L) da quantificação de DNA por fluorimetria em amostras de baço, cérebro, medula espinhal e líquido em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil).....50

Tabela 6. Mediana e valores mínimos e máximos do número de cópias de gEq de *L. infantum*/ ng de DNA no encéfalo, medula espinhal, líquido e baço de cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil).....50

Tabela 7. Carga parasitária em gEq de DNA de *L. infantum*/ ng em amostras de cérebro e medula espinhal de cães naturalmente infectados, com e sem lesão microscópica em SNC, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil)..51

Tabela 8. Carga parasitária em gEq de DNA de *L. infantum*/ ng em amostras de SNC e baço de acordo com a positividade para *L. infantum* no SNC pelas técnicas parasitológicas (cultura e técnicas histológicas) em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil)52

Tabela 9. Resultados das análises de líquido pelas técnicas de DPP[®], usando como padrão de referência as técnicas de cultura parasitológica e qPCR realizadas no líquido de cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil).....53

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- BHE - Barreira hematoencefálica
- BSA - Albumina sérica bovina/ *Bovine serum albumin*
- BSLCR - Barreira sangue-líquido cefalorraquidiano
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- DAT - Teste de aglutinação direta/ *Direct Agglutination Test*
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DPP® - Tecnologia de dupla plataforma/ *Dual Path platform technology*
- ELISA - Ensaio imunoenzimático
- FAST - Teste de aglutinação rápida para triagem / *Fast Agglutination Screening Test*
- FFEP - Fixado em formol e embebido em parafina/ *Formalin-fixed paraffin-embedded*
- FUNED – Fundação Ezequiel Dias
- Fiocruz- Fundação Oswaldo Cruz
- HE – Hematoxilina-eosina
- HIV –Vírus da Imunodeficiência Humana/Human Immunodeficiency virus
- IC - Intervalo de confiança
- IgG – Imunoglobulina G
- IHQ- Imuno-histoquímica
- INI- Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- ISH – Hibridização *in situ* / *in situ Hybridization*
- LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública
- LAPCLIN - DERMZOO – Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LVZ - Leishmaniose Visceral Zoonótica

MMPs- Metaloproteinases da matriz

MS - Ministério da Saúde

NNN – Meio de cultura Novy , MacNeal e Nicolle

PBS - Salina fosfatada tamponada/ *phosphate buffered saline*

PCR - Reação em cadeia da polimerase/ *Polymerase chain reaction*

gEQ- Equivalente genômico

μL - microlitro

μm – micrometro

mL - mililitro

ng – nanograma

rpm – rotações por minuto

qPCR – PCR quantitativa

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

SFB – soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences/Pacote Estatístico para as Ciências Sociais

TRALd- Teste rápido anticorpo *Leishmania donovani*

WHO – Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	1
1.1.1 Ciclo biológico.....	2
1.2 SINAIS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).....	4
1.2.1 Manifestações neurológicas.....	5
1.3 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS, ISOLAMENTO PARASITÁRIO E DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>Leishmania</i> EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL(SNC).....	6
1.4 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA (BHE).....	9
1.4.1 Histórico.....	9
1.4.2 Estrutura e função da BHE.....	9
1.4.3 Disfunção da BHE.....	11
1.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	11
1.5.1 Testes imunológicos.....	12
1.5.2 Testes parasitológicos.....	14
1.5.3 Biologia molecular aplicada ao diagnóstico da LVC.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	20
4.2 EXAME CLÍNICO, NECROPSIA E COLETA DE AMOSTRAS	21
4.3 CULTURA PARASITOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA.....	24
4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ) E HISTOPATOLOGIA.....	24
4.5 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> (ISH).....	25
4.6 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM TECIDOS DO SNC.....	26

4.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNO- HISTOQUÍMICA DO BAÇO.....	27
4.8 REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR).....	27
4.8.1 Extração e purificação de DNA a partir de tecidos congelados do SNC e do baço.....	28
4.8.2 Extração e purificação de DNA a partir de amostras de líquido.....	28
4.8.3 Extração e purificação de DNA a partir de amostras fixadas com formol e embebidas em parafina (FFEP)	29
4.8.4 Quantificação de DNA por fluorimetria.....	30
4.8.5 processo de amplificação da qPCR.....	31
4.8.5.1 Confeção da curva padrão.....	31
4.8.5.2 Protocolo de amplificação de DNA por (qPCR)	32
4.8.5.3 Teste de inibição do DNA.....	33
4.9 ANÁLISE DE LÍQUOR PELO DPP®.....	33
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4.11 ASPECTOS ÉTICOS.....	35
5.RESULTADOS.....	36
5.1 CULTURA PARASITOLÓGICA.....	37
5.2 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	38
5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E CULTURA PARASITOLÓGICA DO BAÇO.....	44
5.4 ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA DE <i>L. Infantum</i> PELA TÉCNICA DE qPCR.....	48
5.4.1 Total de amostras analisadas e resultados.....	48
5.4.2 Avaliação da qPCR, quantificação e avaliação da carga parasitária.....	48
5.4.3 Teste de Inibição de DNA.....	52
5.5 ANÁLISE DE LÍQUOR PELO DPP®.....	52
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	67

1.INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitos que infectam várias espécies de mamíferos, incluindo os humanos (Gramiccia & Gradoni, 2005). A forma sistêmica das leishmanioses é denominada leishmaniose visceral (LV) e no Brasil é causada por *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) (WHO, 2010; Maia & Campino, 2012).

A LV possui amplo espectro epidemiológico com distribuição mundial, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas. É uma doença tropical negligenciada, que está presente em 12 países da América Latina onde apresenta mais de 3.000 novos casos humanos anuais, sendo que 96% desses casos ocorrem no Brasil (WHO, 2010; Arruda, 2013; PAHO/WHO, 2014). Dos 300 mil novos casos humanos anuais de LV a maioria está concentrada em apenas seis países, que são: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (WHO, 2014).

Atualmente, no Brasil, ocorre a expansão da LV, havendo relatos de casos em áreas antes consideradas livres da doença (Tonini et al., 2012).

No ano de 2011, foi descrito o primeiro caso autóctone de LV canina na região sul do país, a qual era a única sem relatos comprovados da doença (Da Silva et al., 2011). Na região sudeste, o estado do Rio de Janeiro também tem apresentado expansão de casos de infecção por *L. infantum* em cães para áreas anteriormente livres (Cabrera et al., 2003; De Paula et al., 2009; Souza et al., 2009; Figueiredo et al., 2010).

Recentemente, têm ocorrido muitos casos de LV em cães e humanos no município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, sendo registrados nove casos humanos entre 2010 e 2013, onde quatro desses pacientes evoluíram para óbito (Secretaria de Saúde do estado do Rio de Janeiro, 2013; Pimentel et al., 2014). Tal

fato reflete a fragilidade do controle da doença e o risco da sua expansão pelo estado.

Adicionalmente, a leishmaniose é considerada uma infecção oportunística em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) que se apresentam com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Alvar et al., 2008).

A principal forma de transmissão do parasita para o homem, cães e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos como flebotomíneos (WHO, 2010). *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor biológico do agente da LV no Brasil, mas estudos já evidenciaram a participação de *Lutzomyia cruzi* na transmissão de *L. infantum* na região do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Santos et al., 1998; Missawa et al., 2011).

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório de *L. infantum* e fonte de infecção para os vetores (Gontijo & Melo, 2004). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (Camargo-Neves et al., 2001). No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Ministério da Saúde, 2013).

1.1.1 Ciclo biológico

Durante seu ciclo de vida a *Leishmania* apresenta duas formas diferentes, sendo que uma ocorre no hospedeiro vertebrado e a outra no hospedeiro invertebrado (vetor). O vetor infectado durante a alimentação de sangue de um hospedeiro vertebrado regurgita promastigotas infectantes (metacíclicas) na pele desses hospedeiros. As formas promastigotas são rapidamente fagocitadas por células de defesa, principalmente macrófagos e dentro de um vacúolo parasitóforo (fagossomo) se transformam em formas amastigotas. Essa forma intracelular se divide por divisão binária até o rompimento da célula. Após o rompimento celular, as formas amastigotas são liberadas e infectam novos macrófagos. Em algumas espécies ocorre a disseminação hematogênica do parasito que tem tropismo por

vísceras como o baço e o fígado. O vetor ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ingere uma pequena quantidade de sangue com macrófagos parasitados. No tubo digestivo do vetor, os amastigotas se transformam em promastigotas, migrando posteriormente ao aparelho bucal do vetor e o ciclo se completa (Silva & Prata, 2012). O esquema do ciclo biológico de protozoários do gênero *Leishmania* é apresentado na figura 1.

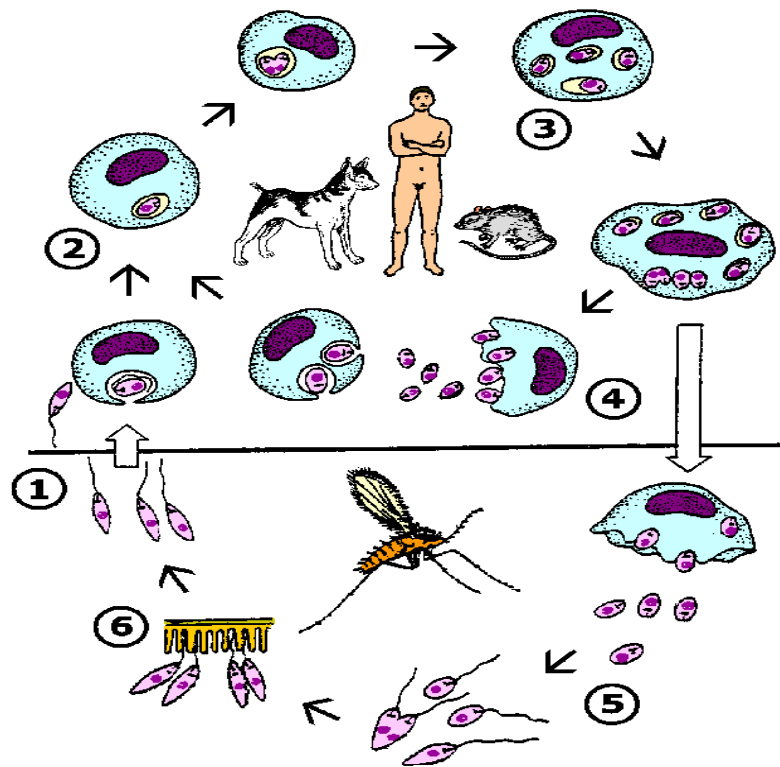


Figura 1- Ciclo de vida *Leishmania infantum*. 1. Promastigotas metacíclicas são transferidos para o hospedeiro vertebrado durante alimentação do flebotomíneo fêmea; 2. Promastigotas são fagocitados pelos macrófagos e dentro de vacúolo (fagossomo) se transformam em amastigotas; 3. As formas amastigotas se multiplicam por divisão binária; 4. Amastigotas são liberadas do macrófago, infectando novos macrófagos; 5. O vetor se alimenta de sangue de hospedeiro vertebrado infectado e ingere macrófagos parasitados. No tubo digestivo do vetor as amastigotas se transformam em promastigotas. 6. Os promastigotas aderidos ao epitélio intestinal do vetor passam por diferenciação terminal e evoluem para a forma metacíclica.

Fonte: modificado de Chang (1990) in Modern Parasite Biology edited by D.J. Wyler

1.2 SINAIS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

O quadro clínico da LVC é bastante variável e o animal pode apresentar desde estado assintomático a quadros severos de caquexia. A infecção evolui para os estados latente ou patente que, por sua vez, em períodos variáveis de semanas, meses ou anos, podem evoluir para a forma aguda, subaguda, crônica ou regressiva (Marzochi et al., 1985).

A LV é considerada uma doença imunomediada, pois o parasito possui a capacidade de modificar o sistema imunológico do hospedeiro (Pinelli et al., 1994). O parasito multiplica-se dentro dos macrófagos, causando uma inflamação crônica e intensa resposta policlonal de células B. A hipergamaglobulinemia resultante leva à deposição de imunocomplexos e à ativação do sistema complemento nos tecidos, causando vasculite, uveíte, artrite, dermatite e, especialmente glomerulonefrite e falha renal (Lopez et al., 1993; Ikeda et al., 2003).

De modo geral, os animais desenvolvem um processo debilitante, crônico, com linfadenomegalia generalizada, anemia, lesões cutâneas ulcerativas ou descamativas, hepato-esplenomegalia e glomerulonefrite com proteinúria. Blefarite, úlcera e edema de córnea, conjuntivite e uveíte são comuns (Abranches et al., 1991; Ciaramarella & Corona, 2003). Sinais inespecíficos como perda de peso progressiva, apesar de apetite normal, e distúrbios locomotores associados à fraqueza muscular são também comumente relatados. A suspeita clínica da doença é mais facilmente levantada quando o animal apresenta vários sinais clínicos (Abranches et al., 1991).

No entanto, a maioria dos cães infectados não apresenta sinal clínico (Cabral et al., 1998) e mesmo na pele clinicamente sadia pode haver a presença de parasitos, o que alerta para a importância desses animais no ciclo de transmissão da doença (Solano-Gallego et al., 2004). Em trabalho realizado por Laurenti et al. (2013) foi avaliada a viabilidade de transmissão de *L. infantum* para o vetor através de xenodiagnóstico, sendo avaliados 24 animais sintomáticos e 14 animais assintomáticos, onde todos os animais assintomáticos, exceto um, apresentaram-se competentes para transmitir o parasito, incluindo os que não apresentaram formas amastigotas na pele através da técnica de imuno-histoquímica. Isto demonstra que

mesmo animais assintomáticos são fonte de infecção para o vetor, mantendo o ciclo de *L. infantum* em áreas endêmicas.

1.2.1 Manifestações neurológicas

Em cães infectados por *L. infantum* já foram relatados sintomas neurológicos como convulsões generalizadas, locomoção atáxica, hipermetria, tremor de intenção, quedas, sinais de paralisia dos nervos cranianos (estrabismo, ptose facial, disfagia), sinais de envolvimento vestibular e cerebelar (inclinação de cabeça, nistagmo, ataxia), mioclonias, hemiparesia esquerda, paraparesia, tetraplegia, vocalização, andar em círculos e episódios de perseguição à cauda, entre outros (Ikeda et al., 2007; Schwarzt et al., 2012). Em trabalho realizado por Marquéz et al. (2013) foi observado alterações como síndrome de Horner bilateral, depressão e atrofia dos músculos supra e infra espinhoso, temporal, deltóide, bíceps e tríceps braquial.

Também já foi relatada a presença de alterações oftálmicas (cegueira, anisocoria e midríase bilateral) (Ikeda et al., 2007). Font et al. (2004) descreveram o caso de uma cadela que apresentou vasculite aguda que atingiu o tecido da medula espinhal levando a paraplegia. Essas alterações neurológicas observadas em cães infectados por *L. infantum* foram atribuídas a esse parasito, tendo sido excluídos por meio de técnicas de diagnóstico laboratoriais outros agentes de diagnóstico diferencial como: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* e o vírus da cinomose (Schwarzt et al., 2012; Marquéz et al., 2013). Em trabalho realizado na Espanha por José-López et al. (2014) foi observado severa hemiparesia direita e claudicação do membro pélvico direito em cão com LV, cujos sinais apresentaram regressão após terapia anti *Leishmania*.

Na medicina humana já foi relatado, em uma criança de 16 meses a ocorrência de mioclonia facial e tremores de extremidades, sendo mais visíveis em cabeça, mãos e língua associadas à infecção por *L. infantum*. Na tomografia computadorizada deste paciente, observou-se redução difusa do cérebro especialmente no lobo frontal direito, com atrofia da matéria branca e aumento do terceiro ventrículo (Diniz et al., 2010).

Adicionalmente em hospital universitário no Sudão, no período de fevereiro de 1992 a abril de 1993 foram atendidos 111 pacientes com LV, sendo que cinquenta e dois (46%) deles apresentavam sinais neurológicos de discretos a severos, sendo o sintoma mais comum a sensação de queimação dos pés. Porém, outras alterações como hiperestesia, sinais de paralisia dos nervos cranianos e surdez neuro sensorial também foram observados nestes pacientes (Hashim et al., 1995).

1.3 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS, ISOLAMENTO PARASITÁRIO E DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI *Leishmania* EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Alterações histológicas associadas à infecção por *L. infantum* são observadas em tecidos do SNC de cães infectados, mesmo os assintomáticos. Essas alterações são caracterizadas principalmente por infiltrado linfo-plasmocitário, coroidite, leptomeningite e degeneração neuronal (García- Alonso et al., 1996; Nieto et al., 1996; Ikeda et al., 2007; Schwardt et al., 2012). Essas lesões já foram relatadas em cérebro, sendo o plexo coróide a área mais acometida, medula espinhal, nervos espinhais e meninges (Nieto et al., 1996; Viñuelas et al., 2001; Ikeda et al., 2007; Melo & Machado, 2009; Melo et al., 2009; Petersen & Greenlee, 2011; Marquéz et al., 2013).

Em estudo utilizando 39 cães naturalmente infectados por *L. infantum*, com e sem sintomas neurológicos, foi observado que as alterações histológicas foram mais frequentes e intensas em animais com sintomatologia nervosa (Ikeda et al., 2007), o que sugere que o grau de lesão e o aparecimento de sinais neurológicos estão relacionados com a cronicidade da doença (Melo et al., 2009). Também já foi relatada a presença de infiltrado inflamatório contendo linfócitos, macrófagos e neutrófilos em cérebro de cães, sendo distinguidos principalmente no plexo coróide, zona sub-ventricular, leptomeninges e em torno de vasos sanguíneos do parênquima cerebral em cães infectados sem sintomas neurológicos (Melo et al., 2009).

Em relato de caso de um animal com leishmaniose que apresentou paraplegia aguda, foram observadas áreas hemorrágicas na medula espinhal lombar, vasculite

e necrose de muitas paredes dos vasos desta região (Font et al., 2004). Em trabalho feito por José-López et al., (2014) foi observado formação de uma massa semelhante a um granuloma na medula espinhal e mielopatia em um poodle com LV, sendo o infiltrado composto por população celular fusiforme (fibroblastos e fibrócitos) e alguns linfócitos em uma matriz eosinofílica coberta por uma fina camada de fibras colágenas.

Adicionalmente, Mendonça et al. (2013), utilizando as técnicas de histopatologia usando a coloração de hematoxilina-eosina (HE) e de imunohistoquímica (IHQ) em amostras de cérebro de 23 cães com LV, encontraram lesões no cérebro em 10 animais. As lesões cerebrais encontradas foram congestão vascular, meningite linfo-plasmocitária focal e linfomeningite. Em nenhum desses animais, formas amastigotas de *Leishmania* sp. foram encontradas e as lesões foram classificadas como leves, sugerindo que o cérebro de cães infectados parece ser, de alguma forma, protegido pelas metaloproteinases que atuam na barreira hematoencefálica (Machado et al., 2010).

Porém em estudo experimental de Abreu-Silva et al. (2003), foi utilizado *L. amazonensis* para fazer inoculação em seis camundongos, e oito meses depois esses animais foram sacrificados e submetidos a necropsia. Na histopatologia foram observadas lesões histológicas no cérebro como hiperemia e meningite composta por células mononucleares e neutrófilos na maioria dos animais do estudo.

Apesar da observação de alterações histológicas, relatos de identificação de formas amastigotas em SNC de cães ainda são escassos, ocorrendo somente em relatos de caso de cães da Europa, onde o tratamento canino é permitido (Nieto et al., 1996; Viñuelas et al., 2001; Schwardt et al., 2012; Márquez et al., 2013). Com isso, até o presente momento não ocorreu isolamento parasitário em tecido nervoso de cães do Brasil (Ikeda et al., 2007). Esses autores identificaram formas amastigotas de *Leishmania* em células ependimárias, linfócitos e macrófagos do plexo coróide, em histiócitos das meninges, em nervos espinhais, medula espinhal e parênquima do cérebro (Nieto et al., 1996; Viñuelas et al., 2001; Schwardt et al., 2012; Márquez et al., 2013).

Na medicina humana, também em um relato de caso, em um paciente HIV positivo, residente no Rio Grande do Norte, foram detectadas formas amastigotas e

material antigênico particulado em células da micróglia e na luz dos vasos do cérebro pela técnica de imuno-histoquímica (Ramos et al., 1994).

Na Índia, temos outro relato, onde uma criança de 10 anos foi submetida á esplenectomia, pois se encontrava em tratamento prolongado (mais de vinte meses) contra *L. donovani* sem apresentar resultados satisfatórios. Após remoção do baço o paciente apresentou quadro clínico de meningite, sendo realizada punção de líquido, que se encontrava turvo e apresentava diversas formas amastigotas de *Leishmania* intracelular e extracelular. O autor argumentou que, provavelmente, após esplenectomia os parasitos migraram para o líquido em busca de um sítio seguro, uma vez que a maioria das drogas anti-*Leishmania* utilizadas não alcançam o sistema nervoso devido à presença da barreira hematoencefálica (Prasad & Sen, 1996).

No estudo de Abreu - Silva et al. (2003), mencionado anteriormente, dos 6 camundongos inoculados com *L. amazonensis*, foram observadas formas amastigotas em cortes histológicos de cérebro em dois deles (33,3%). Já no trabalho de Oliveira et al. (2011) *L. infantum* foram inoculados em 18 hamsters e foram avaliados o baço, fígado, rim, pulmão, coração e cérebro desses animais quatro meses após inoculação. No exame direto houve uma alta porcentagem de animais que apresentaram formas amastigotas no cérebro (83,3%) ficando abaixo somente de amostras de baço e fígado onde o parasito foi detectado em todos os animais infectados (100%). Ambos os trabalhos foram realizados em animais imuno-competentes e não tratados para a doença, o que demonstra a circulação do parasito no SNC mesmo na ausência de tratamento prévio.

Adicionalmente, em alguns estudos prévios foi relatada a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em líquido de cães por meio da técnica de Elisa (Lima et al., 2003; Feitosa et al., 2005; Grano et al., 2014), sendo que, no trabalho realizado por Lima et al. (2003), dos 30 cães naturalmente infectados examinados, três apresentavam alterações neurológicas e todos possuíam altos níveis de anticorpos no líquido .

Segundo alguns autores, a observação de neuroinflamação assim como a presença de imunoglobulinas no líquido sugerem que houve ruptura na barreira hematoencefálica, pois a mesma em condições fisiológicas impede a passagem de estruturas microscópicas e grandes moléculas hidrofílicas através de junções

apertadas entre as células (Garcia-Alonso et al.,1996; Abreu-Silva et al.,2003; Lima et al., 2003; Feitosa et al., 2005; Engerhardt & Sorokin, 2009; Melo et al., 2009). Porém, em trabalho feito por Feitosa et al. (2005) no qual foram utilizados cães com e sem sintomas neurológicos, foi relatada a presença de dois cães sem sintomatologia nervosa e um com sintomatologia nervosa que apresentaram IgG em líquido cefalorraquidiano mas não no sangue, sugerindo produção de anticorpos de forma intratecal.

1.4 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA (BHE)

1.4.1 Histórico

No final do século XIX, na Alemanha, o cientista Paul Ehrlich injetou corantes nos vasos sanguíneos de animais e constatou que todos os órgãos se coraram, com exceção do cérebro e medula espinhal, levando à hipótese da existência de dois compartimentos. Além disto, Hugh Davson em sua revisão cita estudos de Bield e Kraus em 1898 e de Lewandowsky em 1900, onde relatam a ausência de efeitos farmacológicos no sistema nervoso central (SNC) quando os fármacos eram administrados de forma sistêmica (Davson, 1976). Em 1913, Edwin Goldmann (um dos estudantes de Ehrlich) injetou corante diretamente no líquido cefalorraquidiano de animais, onde foi corado todo o SNC, mas nenhum órgão periférico (Wiesendanger, 2010). Nos anos 60 as experiências de Ehrlich e Goldman foram repetidas a nível estrutural e através da microscopia eletrônica foram identificados os capilares do SNC e a célula endotelial como sítio da barreira hematoencefálica (Davson, 1976).

1.4.2 Estrutura e função da BHE

O SNC é fortemente protegido pela barreira hematoencefálica (BHE) que se situa entre o cérebro e células endoteliais de vasos sanguíneos cerebrais, e pela barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BSLCR) que fica entre o líquido cefalorraquidiano (líquor) e as células epiteliais do plexo coróide (Correale & Villa, 2009; Engelhardt & Sorokin, 2009).

A BHE é formada por junções endoteliais apertadas, não fenestradas e com muito baixa atividade picnótica (Figura 2). Em condições fisiológicas esta barreira transporta nutrientes para o SNC e inibe a passagem de moléculas prejudiciais a este tecido (Engelhardt & Sorokin, 2009).

Além das funções de permeabilidade seletiva a BHE possui funções neuroimunes, incluindo a secreção de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico. A BHE pode receber o estímulo do compartimento sistêmico e, simultaneamente, responder com secreções para o sistema nervoso central, sendo esta função de papel central na resposta neuroimune (Banks & Erickon, 2010).

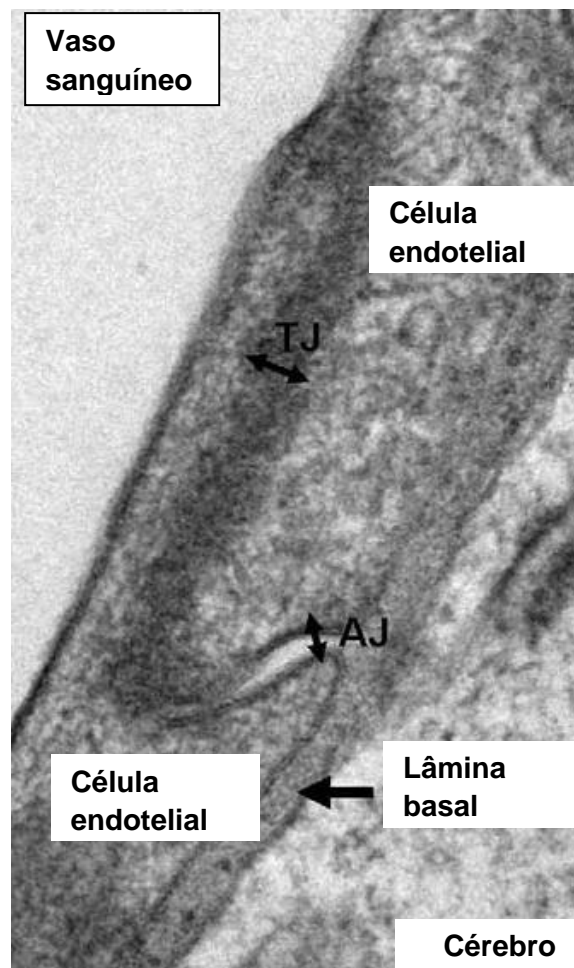


Figura 2. Estrutura da BHE. Esquema demonstrando estrutura normal da BHE entre o cérebro e vaso sanguíneo, composta por célula endotelial onde se encontram as junções apertadas (*tight junction*- TJ) e moléculas de Junções Associadas (AJ) que permitem a interação entre essas células. Mais abaixo se encontra a lamina basal composta pela matriz extracelular, onde se encontram as metaloproteinases (MMPs).

Fonte: Adaptado de Weiss et al., (2009)

1.4.3 Disfunção da BHE

A disfunção da BHE, também chamada de “abertura da BHE”, tem sido descrita como um elemento-chave da progressão de várias doenças do SNC. Provavelmente isto esteja relacionado à exposição do tecido nervoso a substâncias potencialmente nocivas, podendo resultar em uma perda da homeostase, comprometimento da oferta de sinalização neuronal e morte celular (Weiss et al., 2009).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas geralmente encontradas na forma inativa e sua regulação e ativação são complexas e bem controladas. A perda desse controle se encontra envolvido na fisiopatologia da quebra da BHE. O papel central das MMPs na degradação da matriz neurovascular e a gênese de diferentes processos patológicos têm sido demonstrados em vários modelos de neuroinflamação. Desta forma se permite que circulem substâncias neurotóxicas para o parênquima cerebral, com a infiltração de leucócitos e ativação da micrógliia (Candelario-Jalil et al., 2009; Cardoso et al., 2010; Zhang et al., 2010).

Já se sabe que microorganismos patogênicos parecem usar diversas vias para entrar no SNC, podendo romper a BHE sendo transportados através de leucócitos infectados. Adicionalmente, podem penetrar através de células epiteliais do plexo coróide, atingindo o líquido (Tuomanen, 1996).

1.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Para o diagnóstico da LVC é preciso levar em consideração aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, pois há animais que não apresentam sinais clínicos aparentes, há os que se autocuram e os que só vão desenvolver a doença após longo período. Além disso, sinais clínicos de LVC podem ser confundidos com os de

outras doenças como babesiose, ehrlichiose, rickettsiose, neoplasia cutânea, entre outras (Barbosa-de-Deus et al. 2002; Reis et al. 2006).

1.5.1 Testes imunológicos

Este tipo de diagnóstico baseia-se na resposta imune celular ou humoral frente à presença do parasito. Em cães as metodologias mais utilizadas se baseiam na detecção de anticorpos (Cañavate et al., 2005).

Os testes sorológicos mais utilizados no Brasil são o ensaio imunoenzimático (ELISA), a tecnologia Dual Path Platform (DPP) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). A RIFI é realizada através de diluições seriadas do soro do hospedeiro na presença de antígenos de promastigotas de *Leishmania* sp. Os resultados são interpretados com base em uma reação fluorescente que ocorre a partir da ligação de anticorpos anti-*Leishmania* com antígenos do parasito (Shaw & Voller 1964; Gradoni 2002).

O teste ELISA é considerado um importante avanço tecnológico, pois permite o exame de grande número de amostras em um curto espaço de tempo, seu protocolo é ajustado facilmente a diferentes antígenos e a leitura é automatizada. O resultado final se caracteriza por reação enzimática colorimétrica expressa em densidade óptica, o que torna a leitura mais objetiva (Voller et al. 1976, Reithinger et al., 2002). Em comparação ao RIFI, o ELISA é considerado mais sensível, porém menos específico (Mancianti et al., 2002). A RIFI envolve uma reação dispendiosa e exige um treinamento maior para sua execução (Gontijo & Melo 2004). Além disso, pode apresentar reação cruzada com a leishmaniose tegumentar e a triponossomíase americana em regiões onde haja sobreposição dessas doenças (Sundar & Rai 2002; Porrozzini et al., 2007; Madeira et al. 2009b).

A RIFI possui menor sensibilidade do que o ELISA em animais assintomáticos (Miró et al., 2008). Além disso, a utilização de diferentes antígenos e a variedade de procedimentos para obtenção do ponto de corte (*cut off*) na RIFI dificultam a sua padronização (Maia & Campino, 2008). Outro ponto importante a ser ressaltado é que, a acurácia destes exames depende também da resposta imune do hospedeiro uma vez que há animais com claros sinais da doença, porém com sorologia duvidosa ou negativa devido à imunossupressão. Há também animais infectados

que são resistentes e soropositivos, caracterizados por apresentarem altos níveis de interferon-gama e que podem permanecer sem sinais clínicos por toda a vida (Fisa et al., 2001; Alvar et al., 2004).

Além do soro, o teste ELISA tem sido utilizado para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em líquido, com o objetivo de avaliar ocorrência de lesão e ruptura da barreira hematoencefálica, o que culmina no acometimento do SNC em cães com LV (Lima et al., 2003; Feitosa et al., 2005; Melo et al., 2009).

Badaró et al. (1996), desenvolveram o Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* (TRALd) que se baseia num método imunocromatográfico utilizando a proteína recombinante rK39. A técnica é simples, rápida e apresenta alta sensibilidade e especificidade em cães de área endêmica. Apesar de, em um determinado estudo, não conseguir identificar cães com sorologia entre 1:40 e 1:320 no RIFI, o TRALd é bastante promissor para aplicações em maior escala à campo, pois requer pequena quantidade de sangue e sua execução e leitura são bastante práticas (Genaro et al. 1997; Ferreira, 2012).

O teste de aglutinação direta (DAT) é um método alternativo, baseia-se no uso de antígeno estável e liofilizado para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em soros caninos. Em estudos comparativos envolvendo diferentes testes sorológicos, o DAT mostrou sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade semelhante ao ELISA (Silva et al., 2006; Ferreira et al., 2007).

O DAT apresenta baixo custo e simplicidade, o que é bom para levantamentos epidemiológicos e trabalhos de campo (Rami et al., 2003). Mas a sua especificidade varia de acordo com o antígeno utilizado e a obtenção dos resultados é demorada, pois a técnica exige incubação de 18 horas e diluições seriadas dos soros, tornando a técnica mais trabalhosa (Schallig et al., 2002; Alvar et al., 2004).

O teste *Fast Agglutination Screening Test* (FAST) é um aperfeiçoamento do DAT em que o resultado sai em até 3 horas. Porém tanto o DAT como o FAST necessitam de estudo em larga escala para sua validação (Ferreira, 2012).

O teste sorodiagnóstico mais recente é o teste rápido imunocromatográfico, TR DPP® (Biomanguinhos), também chamado *Dual Path Platform technology* (DPP®). É uma inovadora tecnologia de imunoensaio cromatográfico para testes de diagnóstico rápido. Trata-se de um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza a proteína recombinante K28 (fragmentos K26, K39 e K9) como antígeno. O resultado é dado em cerca de 15 minutos e é um teste bastante

prático para uso no campo. Em testes experimentais, essa técnica apresentou alta sensibilidade para cães com sinais clínicos e alta especificidade para cães sem expressão clínica para LV (Grimaldi Jr. et al., 2012; Funed, 2013).

Em 2011, o diagnóstico imunológico da LVC passou por grandes modificações, anunciadas pelo Ministério da Saúde (MS) em nota técnica. Essas modificações foram baseadas nos resultados de um estudo multicêntrico realizado sob a coordenação do MS, onde foram avaliadas as metodologias de RIFI, ELISA e o teste rápido imunocromatográfico TR DPP® (Biomanguinhos). A recomendação foi para que o TR DPP® fosse utilizado como teste de triagem e o ELISA, como teste confirmatório para diagnóstico sorológico da infecção por *L. infantum* em cães. Este novo protocolo de diagnóstico da LVC abriu novas perspectivas para o controle da doença, ao agilizar o diagnóstico, possibilitando maior rapidez na retirada dos cães reagentes, com a consequente diminuição dos casos humanos (Funed, 2013).

1.5.2 Testes parasitológicos

Entre estes testes estão a cultura parasitológica, a citologia, a histopatologia e a imuno-histoquímica. A citologia pode ser realizada através da punção ou *imprint* dos tecidos (Alvar et al. 2004). Em estudos sobre a ocorrência do acometimento do SNC em cães com LV, as técnicas de imuno-histoquímica e histopatologia se mostraram eficazes para identificação de alterações histológicas e detecção de formas amastigotas de *Leishmania*, sendo importante para melhor compreensão do mecanismo de lesão em SNC (Ramos et al., 1994; García- Alonso et al., 1996; Nieto et al., 1996; Viñuelas et al., 2001; Ikeda et al., 2007; Melo & Machado, 2009; Melo et al., 2009; Petersen & Greenlee, 2011; Schwardt et al., 2012; Marquéz et al., 2013; Mendonça et al., 2013).

Materiais obtidos por biopsia ou aspirados podem ainda ser inoculados em animais de laboratório, geralmente *hamsters*, nos quais é avaliado o posterior desenvolvimento da doença. Nesta metodologia, o parasito pode ser posteriormente recuperado a partir de necropsia do animal experimentalmente infectado (Herwaldt 1999).

A cultura parasitológica possui sensibilidade que varia de 78% a 80% e a caracterização de espécie pela técnica de eletroforese enzimática multilocus é o método de referência para identificação de *Leishmania* ao nível de espécie (Madeira et al., 2006; Madeira et al., 2009a). Porém, nenhum trabalho realizado no Brasil realizou o uso desta técnica para diagnóstico do parasito *L. infantum* em tecidos do SNC e líquido de cães. Há apenas um relato do uso da cultura parasitológica para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* no SNC de cães, que foi feito por Viñuelas et al. (2001) na Espanha. Nesse estudo, foi realizada a cultura das meninges de dois animais, apresentando o crescimento de elevado número de formas promastigotas de *L. infantum* (Viñuelas et al., 2001).

A técnica de hibridização *in situ* foi recentemente introduzida como técnica de diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães (Dinhopl et al., 2011) detectando de maneira inequívoca, espécies de *Leishmania* em tecidos fixados com formol a 10% e emblocados em parafina (Dinhopl et al., 2011; Menezes et al., 2013). Apresenta elevada sensibilidade e especificidade, com isso permite uma melhor avaliação da associação das lesões em tecidos com o parasitismo por *L. infantum* em cães. Entretanto, nenhum trabalho até o presente momento cita o uso da mesma em SNC de cães.

1.5.3 Biologia molecular aplicada ao diagnóstico da LVC

Neste campo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem grande versatilidade, permitindo serem utilizadas pequenas quantidades de diversas amostras. Apresenta alta sensibilidade e especificidade para detecção de DNA de *Leishmania* em amostras de cães e humanos (Silva et al., 2001). A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma inovação que permite quantificar sequências de ácidos nucléicos de forma mais rápida, acurada, reprodutível e sensível (Mary et al., 2004; Paiva-Cavalcanti et al. 2010; Martínez et al. 2011). Com isso, é possível mensurar a carga parasitária a partir de tecidos infectados de maneira mais precisa, podendo ser usada tanto para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* quanto para a avaliação do sucesso de tratamento quimioterápico em modelos experimentais (Pennisi et al. 2005; Francino et al. 2006; Manna et al. 2008). A combinação da PCR com métodos sorológicos quantitativos aumenta a eficácia do diagnóstico da LVC

(Solano-Gallego et al. 2009). Além disso, a associação da qPCR com a sorologia quantitativa abre novas perspectivas para a avaliação das relações existentes entre a carga parasitária e a produção de anticorpos no hospedeiro (Alves et al., 2009).

Na Europa, há apenas o relato do uso de PCR em líquor de um cão, que foi positivo para *L. infantum* (Márquez et al., 2013). Em um recente trabalho realizado no Brasil por Grano et al. (2014) foi utilizada a técnica de qPCR para avaliar amostras de encéfalo de 20 animais positivos para LV. Os encéfalos foram divididos em 2 hemisférios e posteriormente em 5 regiões. Em todas as regiões encefálicas examinadas foram detectados DNA de *L. infantum*, com exceção apenas de duas regiões de dois cães. Segundo Grano et al. (2014) esses resultados indicam uma forte evidência da presença do parasito no SNC, mesmo em cães com infecções recentes, uma vez que no Brasil, os cães infectados são sacrificados logo após diagnóstico, seguindo a legislação vigente (Grano et al., 2014). Almeida et al. (2011) detectaram DNA de *L. infantum* em cerebelo de cachorro vinagre (*Speothos venaticus*). Paralelamente, em trabalho realizado por Silva et al. (2008), um cão com sorologia bastante alta e apresentando sintomatologia clássica de LVC apresentou resultado positivo no PCR realizado em cerebelo sendo que, na histopatologia e imuno-histoquímica não foi evidenciado presença de amastigotas. Este relato reforça a importância do emprego da biologia molecular para uma maior sensibilidade na identificação de *Leishmania*.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de terem sido descritos sinais clínicos neurológicos, presença de anticorpos anti-*Leishmania* no líquido, alterações histológicas em tecidos do SNC e detecção de DNA de *L. infantum* em cães infectados por *L. infantum*, ainda são raros os trabalhos sobre ocorrência de envolvimento do SNC com confirmação parasitológica em cães com leishmaniose visceral (Schwardt et al., 2012). Os poucos trabalhos que relatam a identificação de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em tecido nervoso, são relatos de casos em cães da Europa (Ikeda et al., 2007). Prasad & Sen (1996) em seu estudo argumentou que a presença de formas amastigotas de *L. donovani* em líquido de paciente humano, pode ter ocorrido pelo fato do parasito ter buscado refúgio em um sítio privilegiadamente protegido contra as drogas anti-*Leishmania*. Em trabalho feito por Ikeda et al. (2007), os cães com sintomas neurológicos apresentavam alterações histológicas mais graves que os cães sem sinal neurológico. Com isso, foi sugerido que a cronicidade da doença favorece o envolvimento do SNC em cães com LV. Como no Brasil, logo após o diagnóstico, os animais são submetidos à eutanásia, é possível que, se os animais sem sintomatologia neurológica não fossem sacrificados, eles poderiam evoluir para um quadro neurológico da doença (Melo et al., 2009). Com isso, são necessários mais estudos para uma melhor compreensão do mecanismo de lesão e migração do *L. infantum* em SNC de cães.

Adicionalmente, a dificuldade de encontrar o protozoário *L. infantum* no SNC de cães pode estar relacionada às limitações de sensibilidade das técnicas utilizadas nos estudos realizados no Brasil, que foram a histopatologia e imuno-histoquímica na maioria dos trabalhos. As técnicas de PCR, cultura parasitológica e hibridização *in situ* apresentam alta sensibilidade e especificidade, mas ainda são raros os relatos do uso delas para pesquisa de *L. infantum* em SNC de cães (Silva et al., 2001; Madeira et al., 2006; Madeira et al., 2009a; Dinhopl et al., 2011; Menezes et al., 2013). Nesse contexto, o uso de diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas no presente estudo será importante para aumentar as chances de detecção de *L. infantum* no SNC.

Além disso, o cão pode ser considerado o principal modelo experimental de infecção por *Leishmania* para produção de vacinas e de novas drogas contra a leishmaniose (Mascarenhas, 2013). Assim, os resultados obtidos neste estudo também terão importância para compreensão da patologia de *L. infantum* no SNC de humanos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de *Leishmania infantum* em diferentes tecidos do sistema nervoso central (SNC), identificar alterações histológicas associadas e isolar o parasito nestes tecidos e no líquido, em cães naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ocorrência de *L. infantum* em cérebro, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal de cães por meio das técnicas de cultura parasitológica, histopatologia, imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e PCR.
- Avaliar a ocorrência de *L. infantum* no líquido dos cães por meio de cultura parasitológica e PCR.
- Avaliar a frequência de anticorpos anti *Leishmania* no líquido de cães por meio do teste rápido DPP®.
- Avaliar as alterações histológicas associadas à infecção por *L. infantum* no cérebro, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal de cães pela técnica de histopatologia.
- Avaliar a carga parasitária de *L. infantum* no líquido, tecidos do SNC e baço usando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).
- Correlacionar a carga parasitária de *L. infantum* e alterações histológicas associadas no baço com a carga parasitária desse parasito nos órgãos do SNC e no líquido.
- Correlacionar a carga parasitária de *L. infantum* no SNC com os sinais clínicos e alterações histológicas encontradas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo seccional para verificar a ocorrência de *L. infantum* no SNC de cães por meio de cinco técnicas de diagnóstico. Foram analisadas amostras de tecido do SNC (cérebro, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal) e líquido de cães provenientes do município de Barra Mansa, área endêmica do estado do Rio de Janeiro, coletadas durante o período de fevereiro a novembro de 2014. Foi estudada uma amostra de conveniência de 50 animais, sorologicamente positivos para infecção por *Leishmania* sp. nas técnicas de imunocromatografia (DPP®) e no ensaio imunoenzimático (ELISA). O DPP® foi realizado pelas Secretarias Municipais de Saúde dos municípios estudados, e o ELISA foi utilizado como teste confirmatório e realizado pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do estado do Rio de Janeiro. Os cães soropositivos em ambos os testes foram encaminhados para eutanásia no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), como medida de controle preconizada pelo Ministério da Saúde (2006).

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo animais que além de apresentarem sorologia positiva no DPP® e no ELISA, foram positivos para o parasito na cultura, histopatologia ou na imuno-histoquímica, realizadas com amostras de sistema nervoso central, pele, baço, linfonodo ou medula óssea.

4.2 EXAME CLÍNICO, NECROPSIA E COLETA DE AMOSTRAS

Os cães inseridos no estudo foram submetidos à sedação através de administração via intramuscular de cloridrato de quetamina (10 mg/kg) em associação a maleato de acepromazina (0,2 mg/kg).

Foi realizado exame físico constituído de inspeção de pele e de mucosas oral e ocular, palpação de linfonodos superficiais e órgãos abdominais. Foram considerados sinais clínicos de LVC: emagrecimento, alopecia geral ou localizada, apatia, lesões cutâneas como úlceras e descamação, onicogribose, aumento de linfonodos superficiais, do fígado ou do baço à palpação, sinais clínicos de anemia como mucosas hipocoradas, ceratoconjuntivite e paraparesia (Marzochi et al., 1985; Souza et al. 2014) Os cães foram classificados como sintomáticos ou assintomáticos de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos.

Depois do exame os animais foram submetidos à eutanásia através de administração por via endovenosa de tiopental sódico, em *overdose*.

Posteriormente foi coletado 1 a 3 mL de líquido do espaço atlanto - occipital, utilizando agulha e seringa estéreis (Figura 3A). Uma parte desse líquido foi imediatamente semeado em meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) / Schneider Medium Insect (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e enviado para o Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (INI – FIOCRUZ). Outra parte foi acondicionada em tubos de polipropileno estéreis DNA free e congelada a -20°C para posterior realização de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e DPP®.

Na necropsia, os órgãos foram avaliados macroscopicamente e foram coletadas amostras dos seguintes tecidos: cérebro, cerebelo, tronco encefálico, medula espinhal (região cervical, torácica e lombar) (Figuras 3B, C) e baço. Um *pool* de amostras de encéfalo (cérebro, cerebelo e tronco encefálico), um *pool* de amostras de medula espinhal (regiões cervical, torácica e lombar) e uma amostra de baço de cada cão foram imersos em solução salina estéril, para realização de cultura, e também acondicionados em tubos de propileno estéreis e livres de DNA, para realização de qPCR (Figura 3D). Adicionalmente, fragmentos de cérebro, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal (regiões cervical, torácica e lombar) foram fixados em formalina tamponada neutra 10% para realização das técnicas de imuno-histoquímica (IHQ), hibridização *in situ* (ISH) e histopatologia, sendo que a

ISH foi realizada somente nos tecidos de cães que apresentaram amostras do SNC positivas na cultura. Além disso, Fragmentos de baço foram fixados em formalina e submetidos à histopatologia e imuno-histoquímica. O fluxograma da coleta de líquido encontra-se na Figura 4 e o fluxograma das coletas teciduais encontra-se na Figura 5.

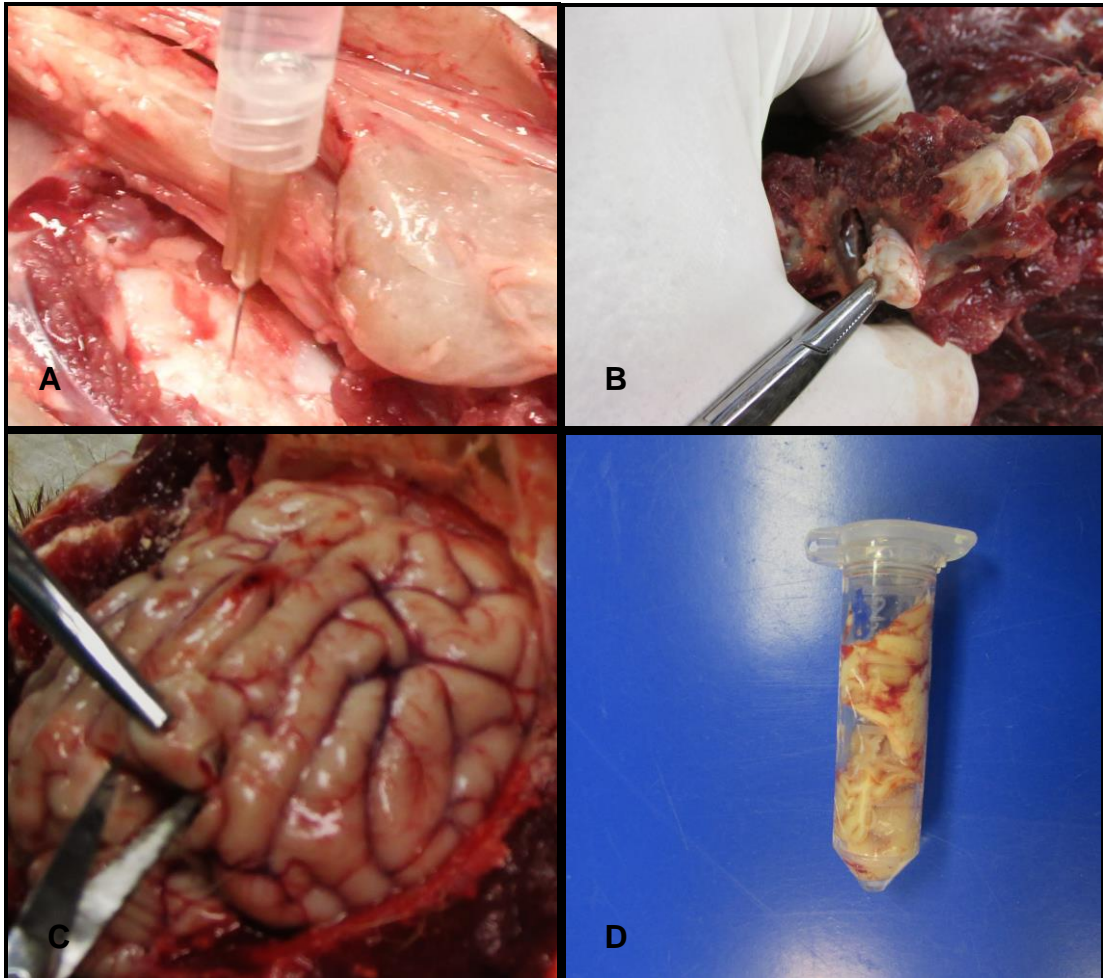


Figura 3. Coleta de amostras de SNC de cão infectado por *L. infantum*. Punção de líquido da região atlanto- occipital (A). Coleta medula espinhal (B). Corte de fragmento de cérebro (C). Fragmento de medula espinhal cervical, torácica e lombar (*pool* de medula espinhal) armazenados em tubo de polipropileno estéril e livre de *DNA* para realização de qPCR (D).

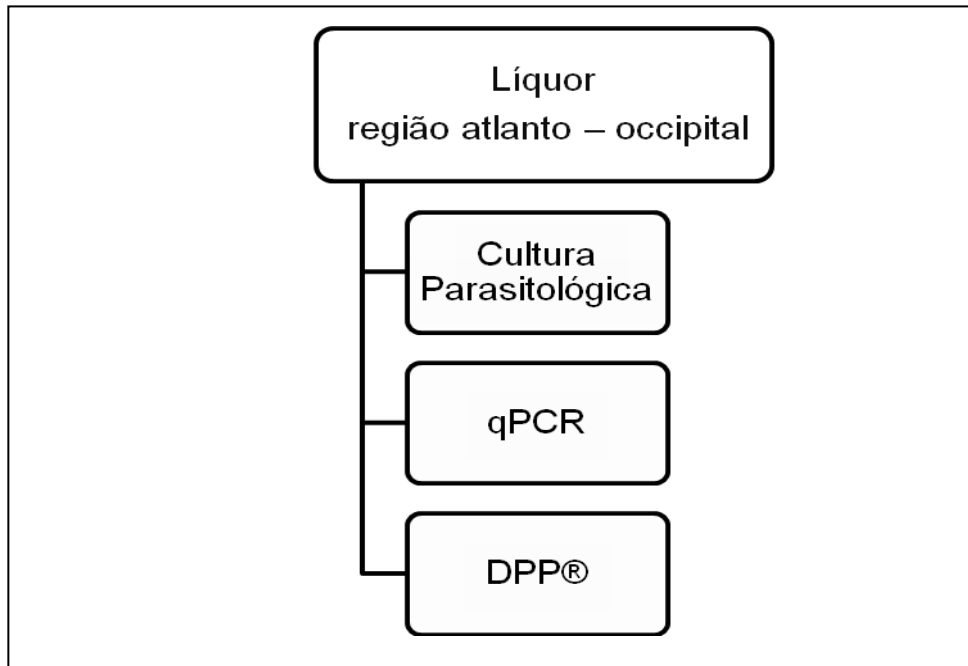


Figura 4. Fluxograma da coleta de líquido dos cães incluídos no estudo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

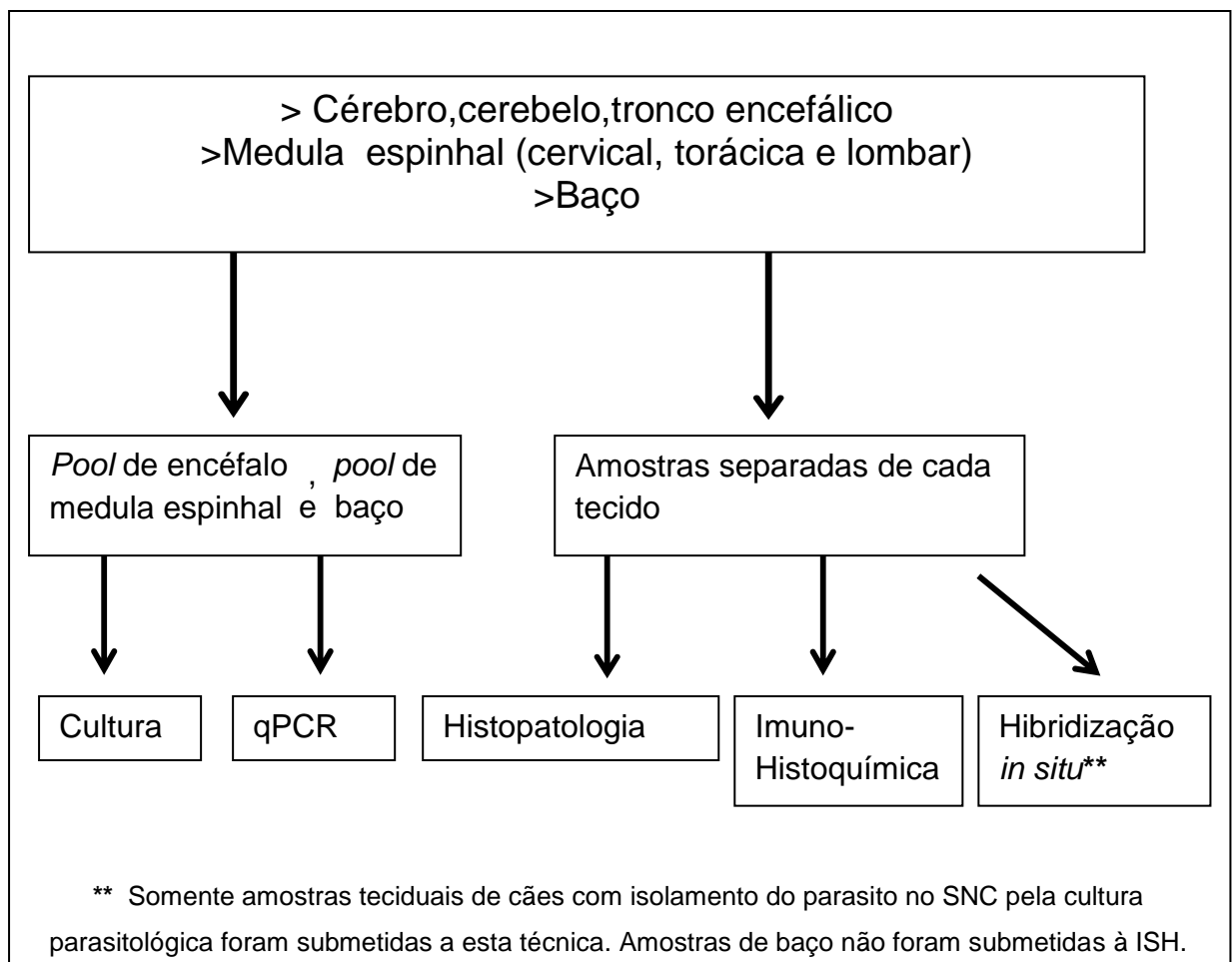


Figura 5. Fluxograma das coletas teciduais dos cães incluídos no estudo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após término da necropsia foi realizado o preenchimento da ficha clínica do animal, onde foram anotados o sexo, a faixa etária, as alterações clínicas (quando presentes) e a análise macroscópica dos órgãos.

O exame clínico, necropsias e coletas de amostras foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do INI/Fiocruz.

4.3 CULTURA PARASITOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA

Para realização da cultura parasitológica, o *pool* de amostras de encéfalo, o *pool* de amostras de medula espinhal e o fragmento de baço coletados de cada cão foram mergulhados imediatamente em solução salina, e após 24 horas, foram semeados em meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) / Schneider Medium Insect (Sigma-Aldrich) contendo 10% de SFB e incubados a 26-28 °C, durante 4 semanas. As formas promastigotas de *Leishmania* isoladas foram identificadas por eletroforese enzimática multilocus, utilizando cinco sistemas enzimáticos (Cupolillo et al., 1994; Madeira et al., 2009a). As culturas parasitológicas e a identificação isoenzimática foram realizadas no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do INI/ Fiocruz.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ) E HISTOPATOLOGIA

Os fragmentos fixados em formalina tamponada neutra a 10% foram processados para emblocamento em parafina (Carson & Hladick, 2009).

Para histopatologia, cortes seriados de 5 µm dos blocos de parafina contendo os tecidos foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) (Carson & Hladick, 2009).

Para IHQ, cortes seriados foram desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em solução de peróxido de hidrogênio a 30% e metanol (45 mL de peróxido de hidrogênio e 55 mL de metanol) por 40 min a temperatura ambiente. A recuperação

antigênica foi realizada em tampão de citrato de sódio (pH = 6,0) a 65 °C durante 30 min em banho-maria. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, os cortes foram incubados com a solução bloqueadora de proteínas Lab Vision™ Ultra V Block (Thermo Fisher, Cheshire, Reino Unido) por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com soro de coelho policlonal anti-*Leishmania* na diluição de 1:500, *overnight*, a 4°C. A reação foi desenvolvida usando o kit de detecção por polímeros HiDef Detection HRP Polymer System (Thermo Fisher, Cheshire, Reino Unido) de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes histológicos de tecidos intensamente parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* foram incubados com soro homólogo não-imune como controle negativo e com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* como controle positivo.

4.5 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* (ISH)

A técnica de ISH foi realizada em amostras de cérebro, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal (cervical, torácica e lombar) somente em cães que apresentaram isolamento de *L. infantum* em cultura parasitológica em líquido ou em qualquer tecido do SNC.

Cortes de 5 µm de espessura dos blocos de parafina contendo amostras teciduais de cérebro, cerebelo, tronco encefálico, medula espinhal cervical, torácica e lombar foram colocados em lâminas silanizadas. As lâminas foram então desparafinizadas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida, foram lavadas em água corrente durante 3 min e em água destilada durante 2 min. Para realização da hibridização *in situ* foi utilizado kit ZytoFastPlus CISH implementation kit AP-NBT/BCIP® (Zytovision GmbH, Bremerhaven, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante, com exceção da etapa de condicionamento celular. Nessa etapa, realizada após o tratamento proteolítico com pepsina, as lâminas foram colocadas em solução tampão citrato de sódio (pH = 6,0) a 98 °C durante 30 min em banho-maria. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de etanol e secas em estufa a 37° durante 10 min.

Em seguida, as lâminas foram colocadas no aparelho hibridizador Thermobrite (StatSpin, Inc., Westwood, MA, EUA), cobertas com solução tampão de hibridização (H7782, Sigma-Aldrich, Co, St Louis, MO, EUA) contendo sonda de oligonucleotídeos específica para *L. infantum* (5'-GCCCTACCCGGAGGACCAGAAAAGTT-3') ligada a digoxigenina na extremidade 5' (Menezes et al., 2013), na diluição de 1:500. Para incubação com a sonda, os cortes histológicos foram cobertos com lamínula plástica Hybri-slips (Sigma-Aldrich, Co, St Louis, MO, USA), que foi selada com cola Fixo Gum® (Marabu GmbH & Co. KG, Bietigheim-Bissingen, Alemanha). No hibridizador, foi realizada desnaturação a 75°C por 5 min e, logo a seguir, hibridização a 37°C *overnight*. No dia seguinte, seguindo as recomendações do kit, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submetidas a três banhos de estringência, seguidas de incubação com anticorpos anti-digoxigenina produzidos em coelhos, incubação com anticorpos anti-anticorpos de coelhos conjugados com polímero e fosfatase alcalina, revelação do sinal com 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP) e 4-nitro blue cloreto de tetrazolium (NBT), contracoloração com corante nuclear vermelho rápido e montagem. Cortes histológicos de tecidos intensamente parasitados com formas amastigotas de *L. infantum* foram incubados com a sonda como controle positivo e somente com a solução de hibridização como controle negativo.

As técnicas de ISH, IHQ e histopatologia foram realizadas no Serviço de Anatomia Patológica do INI/ Fiocruz.

4.6 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM TECIDOS DO SNC

Nos tecidos do SNC o infiltrado inflamatório foi classificado em granulomatoso ou não granulomatoso (Ackerman, 2007). O infiltrado inflamatório granulomatoso foi classificado em supurativo, quando apresentava neutrófilos e não supurativo, quando era composto somente por células mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos). O tipo celular detectado no infiltrado inflamatório foi descrito e quantificado com auxílio de um retículo óptico gradeado de 1 mm² e de um contador manual de células. A quantificação das células foi feita em cortes histológicos

corados em HE, utilizando aumento de 400x, em um campo, na área mais celular da lesão.

4.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNO- HISTOQUÍMICA DO BAÇO

Amostras de baço dos animais do estudo foram avaliadas quanto à presença de esplenite, periesplenite, número de folículos linfóides/mm², e positividade para formas amastigotas de *Leishmania*. A esplenite foi classificada como granulomatosa ou não granulomatosa. O infiltrado granulomatoso do parênquima foi classificado como bem organizado ou mal organizado (Ackermann, 2007; Miranda et al., 2010). O número de folículos linfóides foi contado com auxílio de retículo óptico gradeado de 1 mm² e de um contador manual de células. A quantificação foi realizada em cortes histológicos corados em HE em dez campos com objetiva de 10x e posteriormente foi calculado o número médio de folículos em cada baço. A positividade desse órgão foi avaliada por meio da técnica de imuno-histoquímica e cultura parasitológica previamente descritas neste trabalho.

4.8 REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)

O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para detecção de DNA de *L. infantum* e quantificação da sua carga parasitária em *pool* de amostras de encéfalo (cérebro, cerebelo e tronco encefálico), *pool* de amostras da medula espinhal (regiões cervical, torácica e lombar), líquido e baço. Fragmentos de baço fixados com formol e embebidos em parafina (FFEP) foram utilizados na técnica de qPCR nos animais que tiveram perda do tecido congelado deste órgão.

4.8.1 Extração e purificação de DNA a partir de tecidos congelados do SNC e do baço

Para a extração de DNA foram utilizados tecidos congelados pesando ≤ 25 mg utilizando o *kit* DNeasy[®] Blood & Tissue (Qiagen[®], Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram armazenadas em microtubos livres de DNA. Dentro destes tubos, foram adicionados 180 μ L de solução de lise e 20 μ L de proteinase K e os fragmentos foram macerados com a ajuda de um pistilo. Após a maceração, as amostras foram homogeneizadas durante 15 segundos, e em seguida incubadas em banho-seco a 56°C por 1 h. Após incubação a amostra foi homogeneizada durante 15 segundos, sendo posteriormente adicionados 200 μ L de solução de lise, seguido de homegeneização, adição de 200 μ L de etanol a 100%, e homogeneização. Depois, as amostras foram transferidas para colunas de purificação acopladas a tubo coletor, e submetidas à centrifugação a 8.000 rpm por 1 min. Em seguida, os resíduos foram descartados, sendo adicionados 500 μ L de solução de lise e realizada nova centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Os resíduos resultantes foram então descartados, sendo realizada a adição de 500 μ L de tampão de lavagem. Foi realizada centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. Posteriormente, as colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, sendo adicionadas de 100 μ L de tampão de eluição para fragmentos do SNC e 200 μ L para fragmentos de baço, e após 1 minuto de incubação a temperatura ambiente, foram centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto.

As amostras de DNA provenientes de tecidos congelados foram identificadas com a data do processamento, tipo de amostra, código da extração e foram conservadas a -20°C.

4.8.2 Extração e purificação de DNA a partir de amostras de líquido

Para a extração de DNA de amostras de líquido foi utilizado o mesmo *kit* citado anteriormente. Inicialmente, 100 μ L de líquido foram adicionados em microtubos

livres de DNA onde foi adicionado 20 µL de proteinase K, 100 µL de salina fosfatada tamponada (PBS) e 200 µL de solução tampão. A mistura foi homogeneizada durante 15 segundos e incubada a 56°C por 10 minutos. Depois, foram adicionados 200 µL de etanol a 100%. A mistura foi novamente homogeneizada e transferida para colunas de purificação acopladas a tubo coletor, e submetidas à centrifugação a 8.000 rpm por 1 min. Em seguida, os resíduos foram descartados, sendo adicionados 500 µL de solução de lise e realizada nova centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Os resíduos resultantes foram descartados, sendo realizada a adição de 500 µL de tampão de lavagem. Foi realizada nova centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. As colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, sendo adicionadas de 50 µL de tampão de eluição e, após 1 minuto de incubação à temperatura ambiente, foram centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto.

As amostras de DNA de líquido foram identificadas da mesma forma como citado anteriormente para tecidos congelados, e também foram conservadas a -20°C.

4.8.3 Extração e purificação de DNA a partir de amostras fixadas com formol e embebidas em parafina (FFEP)

Amostras de baço embebidas em parafina foram processadas no laboratório de Anatomia Patológica (INI-Fiocruz), sendo realizados cinco cortes histológicos de 5 µm de espessura utilizando-se micrótomo (Microm HM 315 R). Antes do processamento dos cortes o micrótomo foi higienizado com etanol a 70%, e a navalha era substituída por uma nova ao início do processamento de cada amostra. Os cortes histológicos foram coletados com auxílio de pinças estéreis e transferidos diretamente para microtubos de 1,5 mL, previamente identificados.

A desparafinização das amostras foi realizada com a adição de 1 mL de xilol, seguida de centrifugação a 13.000 rpm por dois minutos. Depois, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de etanol a 100%. As amostras foram submetidas a uma nova centrifugação a 13.000 rpm por dois minutos, e o sobrenadante foi

descartado. Posteriormente, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1h para a evaporação do etanol.

As demais etapas da extração e purificação do DNA ocorreram de acordo com o citado previamente para tecidos congelados, sendo utilizado também o mesmo *kit* de extração.

4.8.4 Quantificação de DNA por fluorimetria

O DNA extraído foi quantificado por fluorimetria utilizando corantes fluorescentes, que foram detectados pela plataforma Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen®) e o kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit, seguindo as instruções do fabricante.

Inicialmente foram estabelecidas curvas de concentração de DNA utilizando os dois padrões do “kit”, sendo que um representou o menor ponto da curva (padrão 1) e o outro o maior (padrão 2). Em um microtubo de 2 mL, a solução de trabalho foi preparada, utilizando-se 199 µL de tampão Qubit e 1 µL de reagente Qubit para cada amostra. Para a preparação dos padrões da curva (padrão 1 e padrão 2) foram adicionados 190 µL da solução de trabalho e 10 µL do padrão correspondente, sendo em seguida homogêneas em vórtex e incubadas a temperatura ambiente por dois minutos. Para obter a quantificação de DNA das amostras, foram adicionados 199 µL da solução de trabalho e 1 µL da amostra de DNA a ser quantificada. Posteriormente, a mistura foi incubada a temperatura ambiente por dois minutos. A concentração de DNA foi então obtida através de leitura no fluorímetro, após a definição da curva- padrão, sendo os valores expressos em nanogramas por microlitro (ng/µL). A concentração de DNA de cada amostra foi registrada, e o limite de detecção desta metodologia foi de 0,0005ng de DNA em 1 µl de diluente.

4.8.5 Processo de amplificação da qPCR

4.8.5.1 Confecção da curva padrão

Formas promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) (*sin.L. infantum*) foram quantificadas e utilizadas para a curva padrão para a determinação do número de cópias genômicas. A quantificação foi feita através de cultura em fase exponencial do crescimento, utilizando o hemocitômetro (câmara de Neubauer).

Cerca de 20 mL de cultura (amostra) foi lavada duas vezes em salina acrescida de fosfatos (PBS, pH 7.2). Posteriormente, foi retirada pequena alíquota de 100 μ L para fazer diluição de 1:100, sendo utilizado o corante Trypan Blue a 0.01%. Através do uso de uma micropipeta, a amostra foi colocada na subcâmara, preenchendo todo o quadrículo da câmara. Foram utilizados os 4 quadrantes para a quantificação, respeitando as linhas limites dessa área, ou seja, as células que tocam as linhas superiores e direitas do quadrado não devem ser contadas.

A confecção da curva-padrão foi realizada pelo Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (INI/Fiocruz). Um ajuste para 1×10^6 parasitos foi realizado após a contagem e a amostra foi centrifugada à 7000 rpm por 10 minutos e o sedimento foi mantido congelado à -20°C até o momento da extração do DNA.

Para a extração do DNA de culturas de *L. infantum* foi utilizado o mesmo *kit* utilizado para extração de DNA das amostras deste estudo, obedecendo as recomendações do fabricante. Uma amostra contendo 1×10^6 parasitos obtidos de cultura de *L. infantum* foi centrifugada a 190 rpm por cinco minutos. O sedimento foi ressuspenso em 200 μ L de PBS, sendo adicionado 20 μ L de proteinase K e 200 μ L do tampão AL, e em seguida homogeneizado.

Depois, foram adicionados 200 μ L de etanol a 100% e novamente foi realizada homogeneização. A amostra foi transferida para uma coluna de purificação, e submetida à centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto, sendo a coluna posteriormente transferida para um novo tubo de coleta (2 mL). Em seguida, foram adicionados 500 μ L de solução AW1 e realizada centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi novamente transferida para um novo tubo de coleta, adicionada de 500 μ L de solução AW2, e centrifugada a 14.000 rpm por 3 minutos. Para conclusão do processo de extração a coluna foi transferida para um microtubo de

1,5 mL, sendo adicionados 200 µL de tampão AE, com incubação por 1 minuto a temperatura ambiente. Após esse tempo foi realizada uma última centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto e o microtubo contendo DNA purificado foi identificado e estocados a -20°C. Considerando um rendimento de 100% no processo de extração de DNA, a amostra de DNA resultante, referente a 1×10^6 parasitos eluída em 200 µL de tampão, apresentou uma concentração de 5.000 cópias equivalentes de genoma (gEq) de *L. infantum*/µL. Utilizando esta amostra de DNA, foram feitas diluições seriadas na base de 10 para a montagem da placa de reação, e cada ponto da curva foi realizada em triplicata, utilizando-se 5 µL de cada diluição. Foram utilizadas as diluições referentes a 500, 50, 5, 0,5 e 0,05 gEq de *L. infantum*/µL, que representam os pontos de 2.500, 250, 25, 2,5, 0,25 gEq de *L. infantum*/reação de qPCR. A curva-padrão está relacionada às concentrações conhecidas de DNA presentes em cada reação e ao o ciclo em que a reação se tornou positiva. Em outras palavras, relaciona-se com o momento em que o sinal de fluorescência da amplificação da sequência-alvo de DNA ultrapassa o limiar basal, sendo este limiar basal definido pelo *threshold*. Com isso, através de diferentes pontos com concentrações pré-determinadas de DNA é definida uma curva de regressão linear, onde é efetuada a quantificação do número de cópias do DNA alvo nas amostras testadas.

4.8.5.2 Protocolo de amplificação de DNA por qPCR

Após a extração, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação por qPCR, sendo utilizado a plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®) e sondas TaqMan®. Cada amostra foi testada em triplicata.

Para a amplificação foram utilizados os iniciadores LEISH-1 (5'-AACTTTTCTG-GTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTT TCCCGCC-3') e a sonda TaqMan- MGB (FAM- 5'AAAATGGGTGCAGAAAT- 3'- NFQ –MGB), descritos anteriormente no protocolo de Francino et al. (2006). A sonda TaqMan® MGB e os iniciadores foram desenhados para identificar as regiões conservadas do kDNA de *L. infantum*.

O volume final da reação foi de 25 µL, 5 µL de amostra e 20 µL da mistura de reação contendo 12,5 µL de Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems,

Carlsbad, CA, USA), 1,5 µL dos iniciadores LEISH-1 e LEISH-2 a 900 nM, 2,5 µL da sonda a 200 nM e 2 µL de água ultrapura.

Para as reações foram utilizadas placas de 48 poços (Applied Biosystems), que após pipetagem foram vedadas com filme adesivo (Applied Biosystems) e o protocolo dos ciclos foi: 1 ciclo de 50° C por 2 minutos, 1 ciclo de 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 40 ciclos de 60° C por 1 minuto. Em cada placa de amplificação foram usados controles positivos e negativos, sendo o *threshold* determinado de 0,1 para todas as amostras, para determinação do ponto em que a fluorescência emitida ultrapassou o limite considerado negativo. O ponto de corte considerado foi de 37 ciclos, com isso, amostras que apresentaram amplificação de DNA após o 37° ciclo, foram consideradas indetectáveis. A técnica foi realizada no LAPCLIN-DERMZOO/INI/FIOCRUZ.

4.8.5.3 Teste de inibição do DNA

Em amostras com resultado indetectável foi realizado um teste para identificar a presença de inibidores da reação ou de DNA degradado com a finalidade de identificar resultados falsos negativos. Para isso, foi utilizado o ensaio Taqman® Gene Expression Assay system (Applied Biosystems, Foster City, CA), que contém par de iniciadores e sonda predefinidos para a amplificação de um segmento de gene canino que codifica para a subunidade proteica β-actina (Cf03023880_ g1), num volume final de reação de 25 µL, contendo 5 µL de DNA e 20 µL de mistura de reação composta de 12,5 µL de Universal Mastermix, 1,25 µL da solução de iniciadores e sonda e 6,25 µL de água ultrapura. O resultado foi expresso como positivo ou negativo, sendo que as amostras que apresentaram amplificação foram consideradas livres de inibidores, contendo DNA íntegro.

4.9 ANÁLISE DE LÍQUOR PELO DPP®

Amostras de líquido foram testadas para identificação de anticorpos anti *L. infantum* através do teste rápido imunocromatográfico TR DPP® (Biomanguinhos),

sendo a técnica realizada de acordo com a recomendação do fabricante para testagem em amostras de soro.

As amostras de líquido foram analisadas independente do resultado obtido na qPCR.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio do software Statistical Package for Social Sciences (versão 16.0) para Windows. Foram descritas frequências simples do sexo, da raça, da faixa etária, da classificação clínica (sintomáticos e assintomáticos), dos sinais clínicos gerais, dos sinais clínicos neurológicos, dos cães positivos para *Leishmania* no SNC (avaliando encéfalo, medula espinhal e líquido) e baço, de positividade nas técnicas de diagnóstico, das alterações histológicas inflamatórias do SNC e baço, da localização das lesões em tecidos do SNC, da classificação do infiltrado inflamatório em tecidos do SNC e no baço, das alterações histológicas inflamatórias em animais com parasitológico de amostras do SNC positiva e negativa, da correlação de positividade em amostras do SNC e baço através das técnicas parasitológicas, da correlação das alterações histológicas de baço com a positividade em SNC nos testes parasitológicos, e de positividade em líquido pelo DPP®. Para verificação da intensidade dos diferentes tipos de células inflamatórias, foram calculados mediana, valores mínimos e máximos de cada tipo celular observado no cérebro, cerebelo, tronco encefálico, medula espinhal cervical, torácica e lombar.

Foi calculado ainda, a média de folículos linfoides no baço em animais com o parasitológico positivo e negativo e média de eficiência, slope, y-intercepto e R^2 na técnica de q PCR. Adicionalmente, foram calculadas as medianas e os valores mínimos e máximos da quantificação de DNA e da carga parasitária nos tecidos do SNC, no líquido e no baço obtidas através da técnica de qPCR.

Foi utilizado o teste de Mann- Whitney para avaliar correlação estatística entre carga parasitária de baço e tecidos do SNC (encéfalo e medula), entre carga parasitária em medula espinhal e encéfalo de cães com e sem lesão em SNC, e entre cães com amostras do SNC com parasitológico positivo e negativo. Além

disso, foi calculada a mediana da carga parasitária em encéfalo e medula espinhal de cães com e sem lesão no SNC e em cães com amostras do SNC com parasitológico positivo e negativo. Por último, foi realizado o cálculo da sensibilidade, especificidade e acurácia do teste DPP®.

Foram considerados significativos resultados do teste estatístico Mann-Whitney com p -valor < 0,05.

4.11 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ), licença LW- 54/13.

5.RESULTADOS

Dos 50 cães avaliados, trinta eram machos (60%) e vinte eram fêmeas (40%). A população foi constituída por trinta e nove cães sem raça definida, três da raça Pinscher, dois da raça Labrador, dois da raça Spitz Alemão, um da raça Shar Pei, um da raça Dachshund, um da raça Pit Bull e um da raça Poodle. Em relação à faixa etária, quarenta e um animais (82%) possuíam entre 1 e 7 anos de idade, cinco (10%) possuíam idade acima de 7 anos e quatro (8%) tinham até 12 meses. Sobre os aspectos clínicos, quarenta e dois animais (84%) apresentavam-se sintomáticos e oito (16%) eram assintomáticos. Os sinais clínicos gerais observados e as suas frequências encontram-se na Figura 6. Adicionalmente, dois animais (4%) apresentaram sinais clínicos neurológicos, sendo que um apresentava paraparesia (2%) e o outro ataxia (2%) e desorientação (2%).

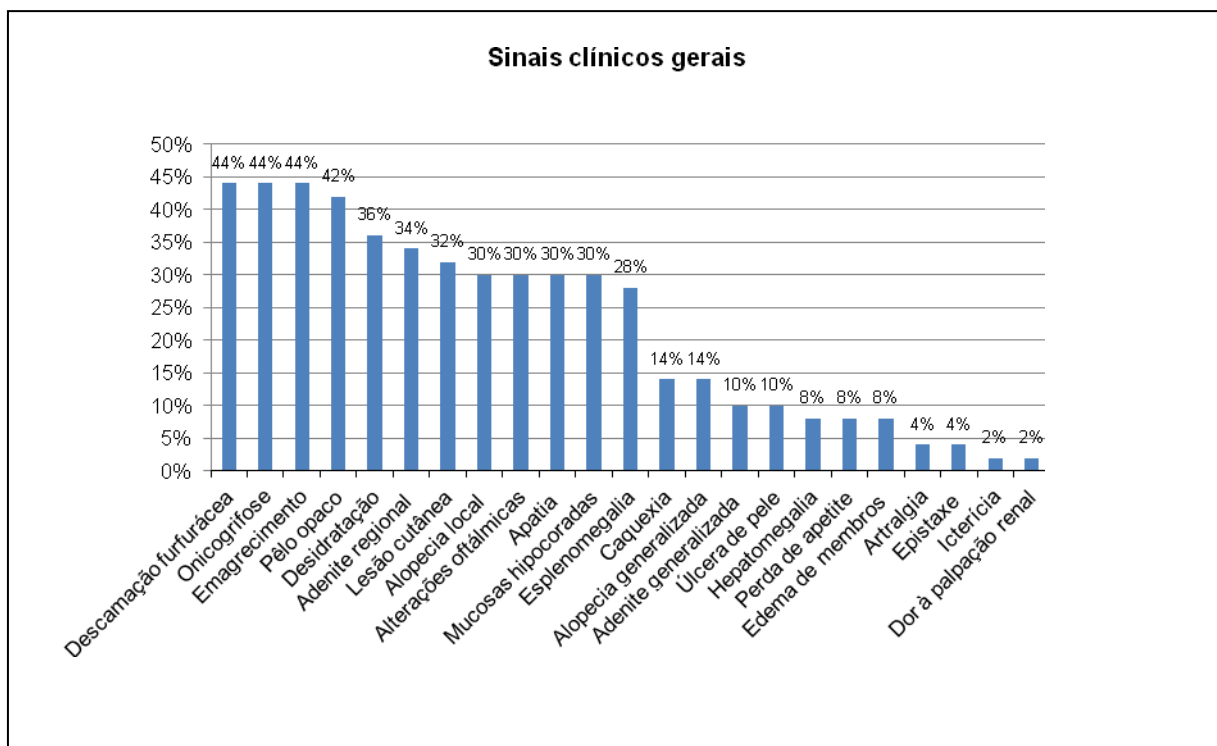


Figura 6. Frequência dos sinais clínicos gerais observados em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Em relação à análise macroscópica, nenhum órgão do SNC apresentava alterações, mas no baço, foram observadas alterações como esplenomegalia e presença de pequenos nódulos esbranquiçados.

Todos os 50 cães examinados apresentavam positividade para *Leishmania infantum* no SNC em pelo menos uma das técnicas de diagnóstico utilizadas. Nas diferentes amostras de SNC as frequências de positividade foram: 98% para o encéfalo, 96% para medula espinhal e 57% para o líquido, considerando os resultados de todas as técnicas de diagnóstico utilizadas. Adicionalmente, avaliando a frequência de positividade no baço, entre os 50 animais avaliados, 98% apresentaram positividade em pelo menos uma das técnicas utilizadas no presente estudo.

5.1 CULTURA PARASITOLÓGICA

Dos 50 cães incluídos neste estudo, 13 (26%) apresentaram positividade em pelo menos uma amostra de SNC. No total, 18 amostras foram positivas, sendo dez (56%) de líquido, sete (39%) de *pool* de amostras de medula espinhal e uma (5%) de *pool* de amostras do encéfalo. Dos 13 cães com cultura positiva em amostras de SNC, dez não possuíam raça definida, um era da raça Spitz Alemão, um da raça Labrador e um da raça Dachshund. Nove eram machos e quatro eram fêmeas. Em relação à sintomatologia clínica, onze eram sintomáticos e dois eram assintomáticos. Apenas um cão apresentava sinais clínicos neurológicos: que era ataxia e desorientação. Onze cães se apresentavam na faixa etária entre 1 e 7 anos e dois deles apresentavam idade superior a 7 anos.

Em relação às amostras de baço, entre os 50 cães avaliados, 43 (86%) apresentaram positividade na cultura parasitológica.

Durante a realização deste estudo, dez amostras de líquido (20%), três amostras de *pool* de medula espinhal (6%), e uma de *pool* de encéfalo (2%) tiveram sua cultura parasitológica interrompida até a segunda leitura, por motivo de contaminação microbiológica e foram consideradas como perdas. Amostras cuja cultura foi interrompida a partir da terceira leitura por motivo de contaminação, não foram consideradas como perdas, uma vez que elas tiveram seguimento pelo período mínimo necessário para avaliação de promastigotas de *Leishmania* sp., que é de duas semanas. Nenhuma amostra de baço teve a cultura interrompida por motivo de contaminação.

5.2 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Dos 50 cães avaliados, em um (2,0%) foi identificado formas amastigotas de *Leishmania* sp. em citoplasma de macrófagos em espaço perivascular na substância branca (funículos lateral e ventral) e cinzenta da medula espinhal cervical (Figura 7 e 8) e substância cinzenta do tronco encefálico pelas técnicas de imuno-histoquímica e histopatologia. No espaço perivascular dessas áreas parasitadas foi observado um infiltrado inflamatório granulomatoso e não supurativo, constituído por macrófagos, plasmócitos e linfócitos (Figuras 7 e 8). Nesse cão, pela técnica de hibridização *in situ*, foram detectadas formas amastigotas de *L. infantum* apenas na medula espinhal (Figura 9). Além disso, esse animal apresentou positividade na cultura parasitológica de medula espinhal e líquido, assim como no baço pelas técnicas de imuno-histoquímica e cultura parasitológica. Esse cão era da raça Spitz Alemão, de 3 anos de idade, macho, que não apresentava sinal neurológico, mas que apresentava como sinais clínicos; mucosas hipocoradas, alopecia local e onicogribose.

Junto com este animal convivia outro cão fêmea, de 3 anos de idade, também da raça Spitz Alemão que apresentava lesões cutâneas, alopecia local, pêlo opaco, úlceras, onicogribose e adenite generalizada. Apesar de apresentar condição clínica pior que o macho, nesta fêmea não foram encontradas formas amastigotas em SNC e a cultura parasitológica de líquido, encéfalo e medula espinhal foram negativas, sendo observado o parasito somente no baço através das técnicas de imuno-histoquímica e cultura parasitológica.

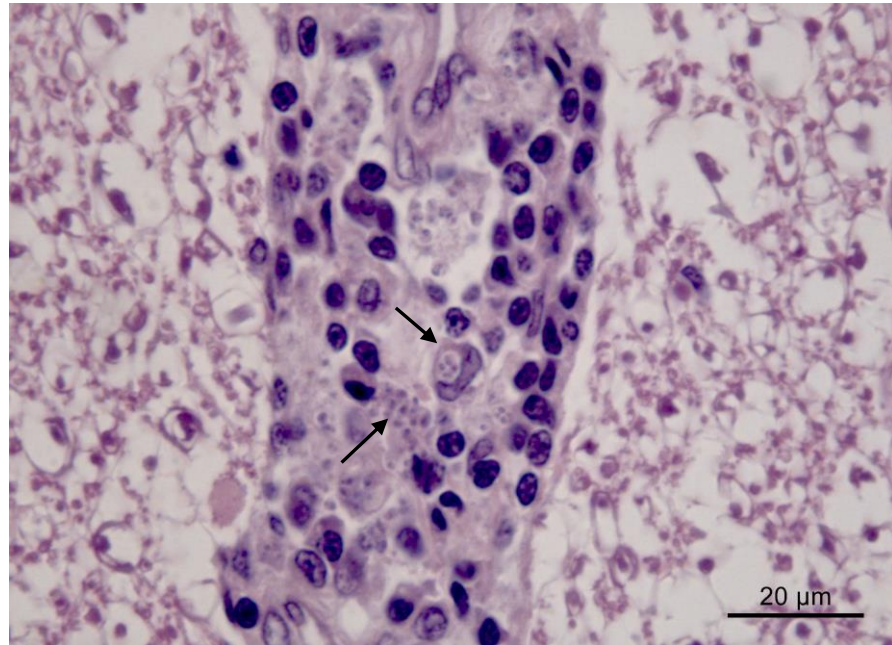


Figura 7. Corte histológico de medula espinhal cervical de cão infectado por *L. infantum* mostrando várias formas amastigotas de *Leishmania* no citoplasma de macrófagos (setas) e infiltrado inflamatório granulomatoso composto por linfócitos, macrófagos e plasmócitos no espaço perivascular da substância branca. Hematoxilina-eosina.

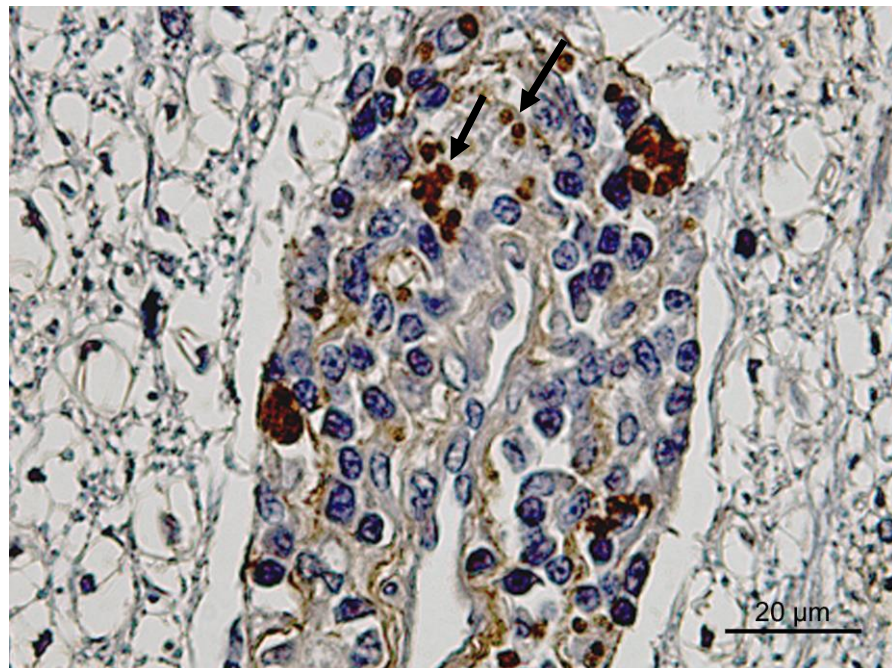


Figura 8. Corte histológico de medula espinhal cervical de cão infectado por *L. infantum* mostrando formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho (setas) no espaço perivascular da substância branca. Imuno-histoquímica.

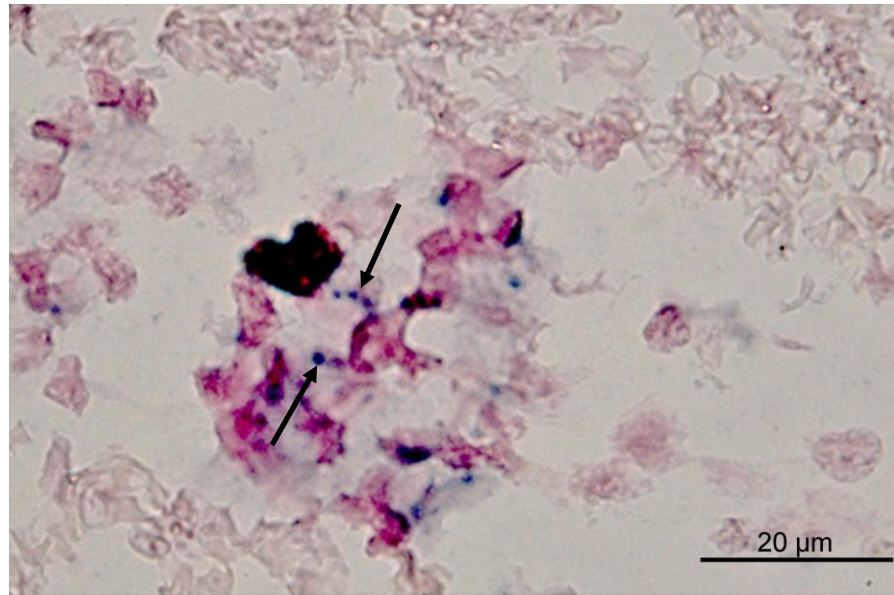


Figura 9. Corte histológico de medula espinhal cervical de cão infectado por *L. infantum* mostrando formas amastigotas de *Leishmania infantum* marcadas em azul (setas) no espaço perivascular da substância branca. Hibridização *in situ*.

Na avaliação histológica de lâminas coradas por HE foram observadas alterações no SNC em 16 cães (32%). Os tipos de alterações inflamatórias observadas foram: meningite (Figura 10), manguito perivascular (Figura 11), coroidite, encefalite e mielite. As frequências de cada tipo de alteração histológica observada encontram-se representadas na Figura 12.

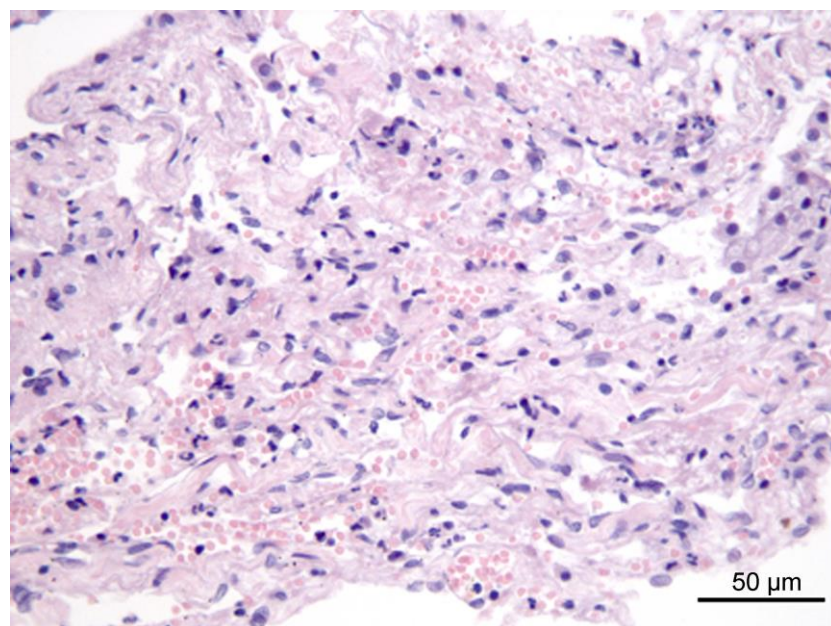


Figura 10. Corte histológico de tronco encefálico de cão infectado por *L. infantum* mostrando meningite supurativa composta por linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Hematoxilina-eosina.

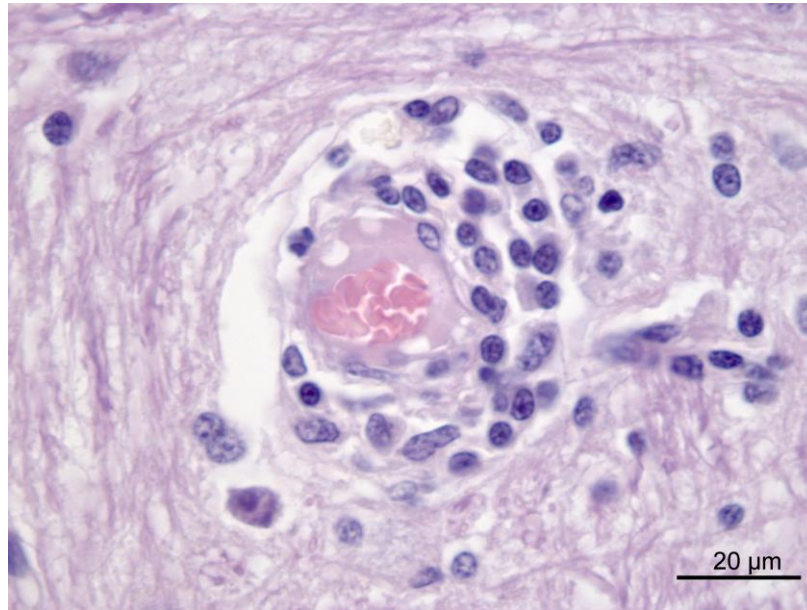


Figura 11. Corte histológico de tronco encefálico de cão infectado por *L. infantum* mostrando manguito perivascular de linfócitos, plasmócitos e macrófagos na substância cinzenta. Hematoxilina-eosina.

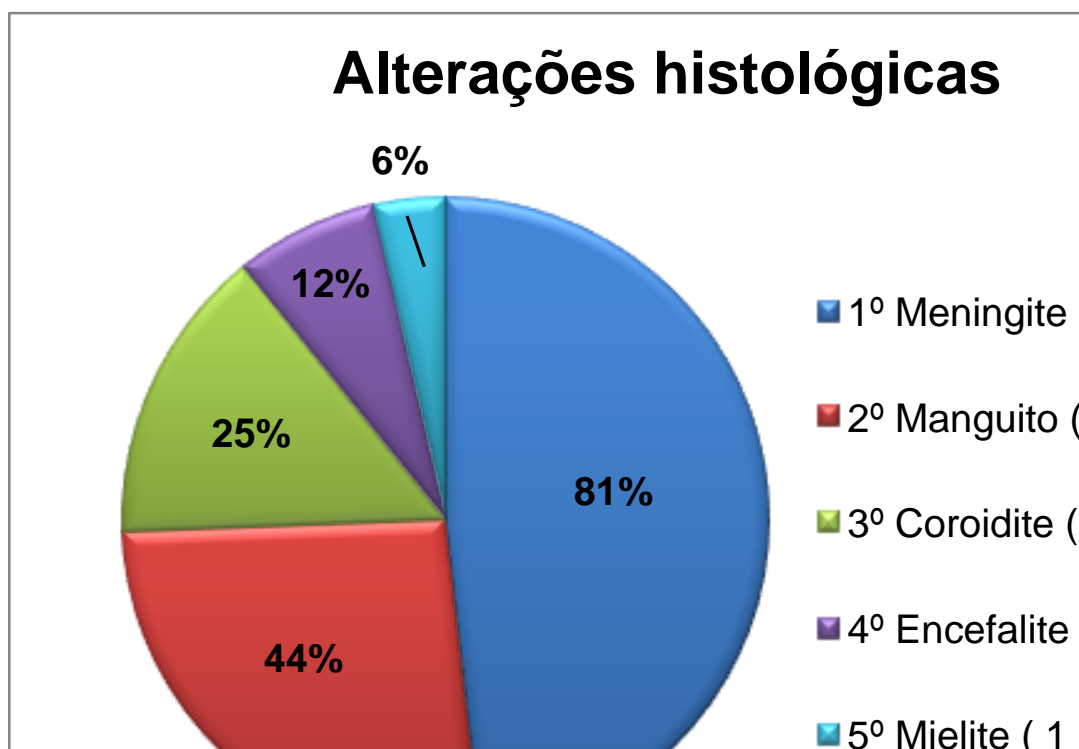


Figura 12. Frequência das alterações histológicas observadas em tecidos do SNC de cães naturalmente infectados, fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Um desses dezesseis cães apresentava além de meningoencefalite e mielite granulomatosas, uma desmielinização acentuada e difusa da matéria branca da

medula espinhal e cerebelo, diversas células *gitter* e astrócitos (gemistócitos) contendo inclusões de Lentz intranucleares. Essas lesões foram causadas pelo vírus da cinomose.

Alterações inflamatórias foram observadas em todas as regiões do SNC estudadas, sendo a frequência do acometimento em cada região representada na Figura 13.

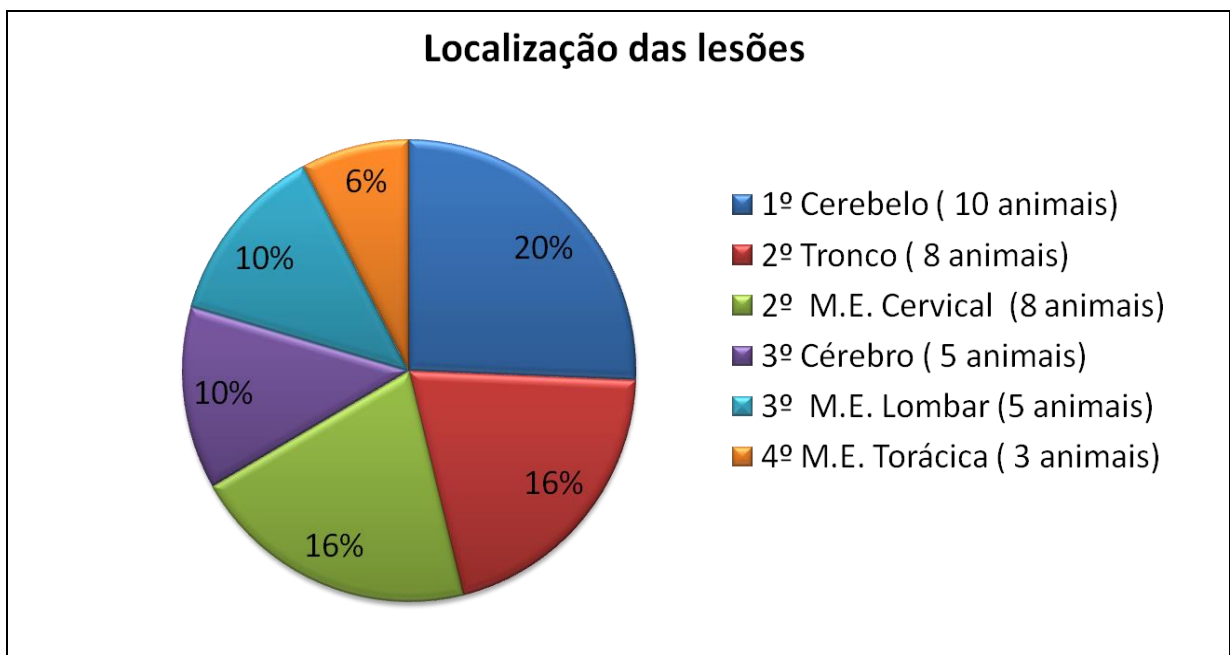


Figura 13. Frequência de regiões do SNC acometidas por alterações inflamatórias em cães naturalmente infectados, fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil). M.E.=medula espinhal.

Dentre os 16 cães que apresentaram alterações histológicas, foi observado que, em alguns deles, havia a presença de diferentes tipos de alterações histológicas e de infiltrados inflamatórios, dentro do mesmo órgão ou em órgãos diferentes. Os tipos de infiltrados inflamatórios observados foram: granulomatoso e não supurativo, granulomatoso e supurativo e não granulomatoso e não supurativo (linfoplasmocitário) (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência dos diferentes tipos de infiltrado inflamatório observados nas lesões inflamatórias do SNC em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil)

Alteração inflamatória	Tipo de infiltrado inflamatório			Total de lesões
	Granulomatoso		Linfoplasmocitário	
	Não supurativo N (%)	Supurativo N (%)		
Meningite	23 (85%)	1 (4%)	3 (11%)	27
Manguito	13 (93%)	0 (0%)	1 (7%)	14
Coroidite	3 (75%)	0 (0%)	1 (25%)	4
Encefalite	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2
Mielite	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2

N= número de cães.

Células inflamatórias foram observadas em todos os tipos de tecidos do SNC, sendo a mediana e a variação de intensidade de cada uma delas descrita na Tabela 2.

Tabela 2 Intensidade dos diferentes tipos de células inflamatórias observados nos tecidos do SNC com alterações inflamatórias em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil)

Amostras	Intensidade de células inflamatórias/ mm ²							
	Macrófagos		Plasmócitos		Linfócitos		Neutrófilos	
	Med	VI	Med	VI	Med	VI	Med	VI
Cérebro	39	11-66	5	1-17	38	14-173	0	0-1
Cerebelo	42	7-156	7	0-24	46	18-101	0	0-2
Tronco	42	8-224	0	0-5	58,5	8-154	0	0-23
M.E. Cervical	19,5	5-67	1,5	0-6	33	21-56	0	0-6
M.E. Torácica	40	15-43	1	0-14	51	5-102	0	0-5
M.E. Lombar	27	12-86	1	0-3	33	5-62	0	0-1

Med= Mediana; VI= Variação de Intensidade; M.E.= medula espinhal.

Alterações histológicas inflamatórias foram observadas em animais que apresentaram positividade nas técnicas parasitológicas e em animais que apresentaram resultado negativo nestas técnicas. A correlação dessas alterações em animais com parasitológico positivo e negativo está exposta na Tabela 3.

Tabela 3. Correlação das alterações histológicas inflamatórias nos tecidos do SNC com a positividade para *L. infantum* nos exames parasitológicos em amostras de SNC em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil).

Alterações histológicas SNC		Testes parasitológicos no SNC				Total
		Positivo (n=13)		Negativo (n=37)		
		N	%	N	%	
Meningite	Sim	7	54%	6	16%	13
	Não	6	46%	31	84%	37
M. perivascular	Sim	4	31%	3	8%	7
	Não	9	69%	34	92%	43
Coroidite	Sim	1	8%	3	8%	4
	Não	12	92%	34	92%	46
Encefalite	Sim	2	15%	0	0%	2
	Não	11	85%	37	100%	48
Mielite	Sim	1	8%	0	0%	1
	Não	12	92%	37	100%	49

M= manguito; N= número de cães

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E CULTURA PARASITOLÓGICA DO BAÇO

Na avaliação histológica do baço foi observado que a lesão mais frequente foi a esplenite, no qual quarenta e nove animais (98%) apresentaram este tipo de lesão. Infiltrado granulomatoso foi observado em quarenta e cinco animais (90%), sendo que em vinte e sete (60%) o tipo de granuloma era mal organizado e em dezoito (40%) era do tipo bem organizado. A presença de periesplenite foi observada em trinta e quatro animais (68%) (Figuras 14, 15 e 16).

Quarenta e sete animais (94%) apresentaram positividade no baço pelas técnicas de imuno-histoquímica e cultura parasitológica, com média de folículos linfóides de 0,6 mm², variando de 0,0 a 1,2 folículos por mm². Três animais (6%) apresentaram resultado negativo, com média de folículos de 0,4 mm², variando de 0,2 a 0,8 folículos por mm².

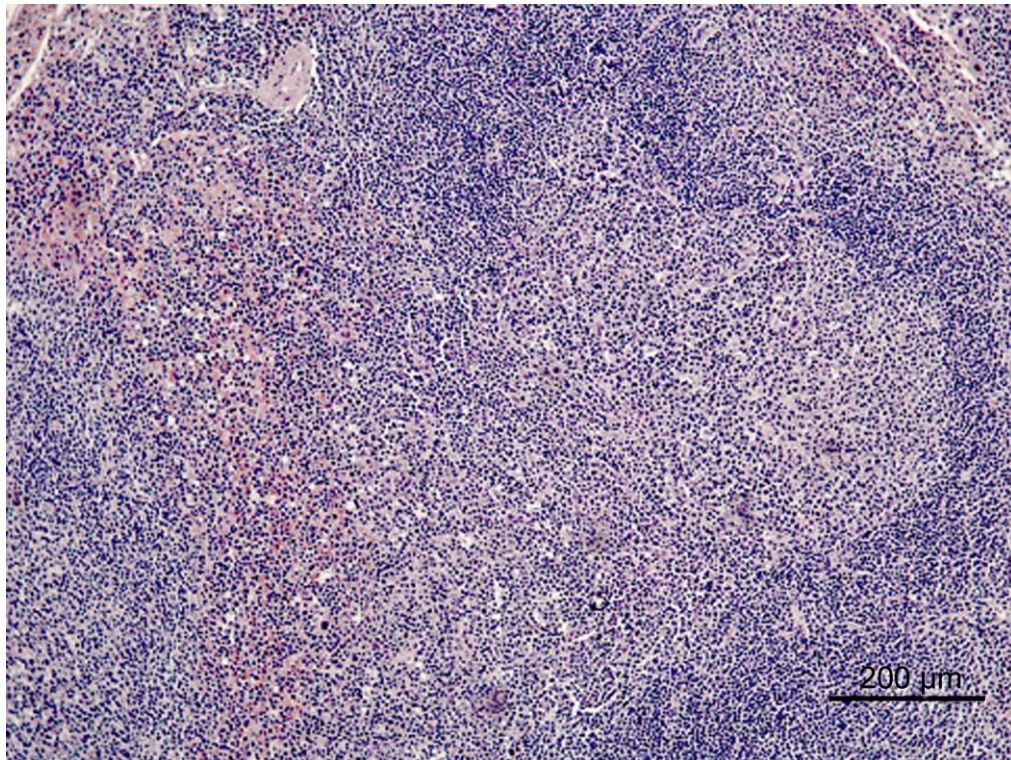


Figura 14. Corte histológico de baço de cão infectado por *L. infantum* mostrando acentuada esplenite granulomatosa com formação de granuloma mal organizado no parênquima. Hematoxilina-eosina.

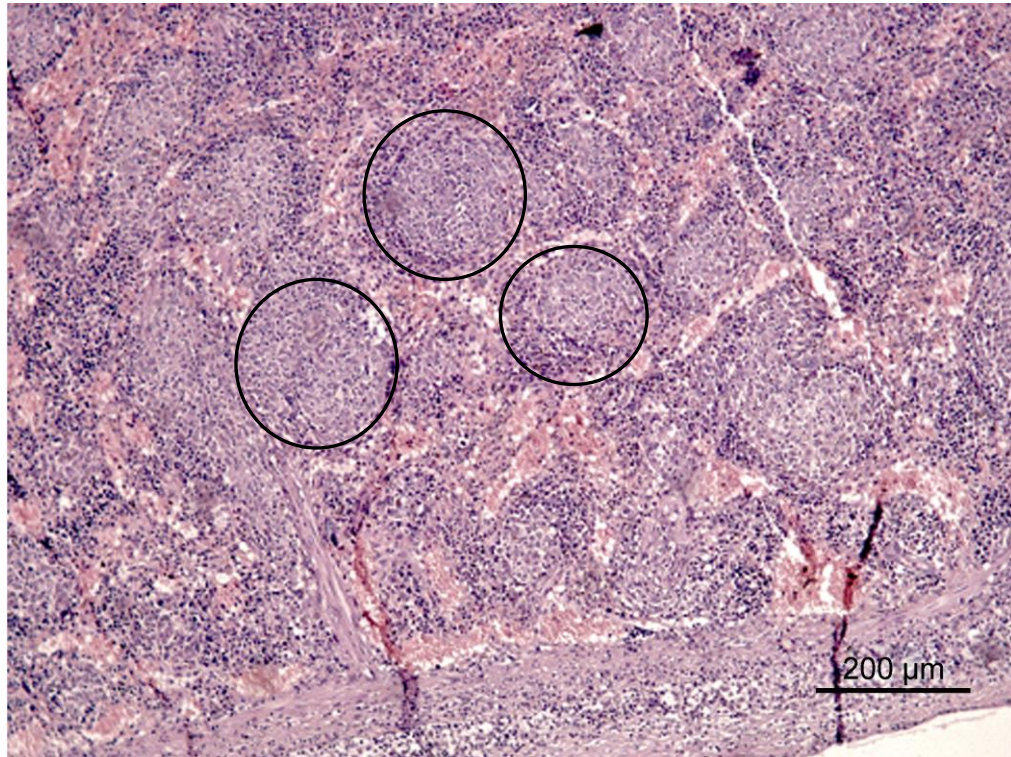


Figura 15. Corte histológico de baço de cão infectado por *L. infantum* mostrando acentuada periesplenite e esplenite granulomatosas com múltiplos granulomas bem organizados (nodular) no parênquima (círculo). Hematoxilina-eosina.

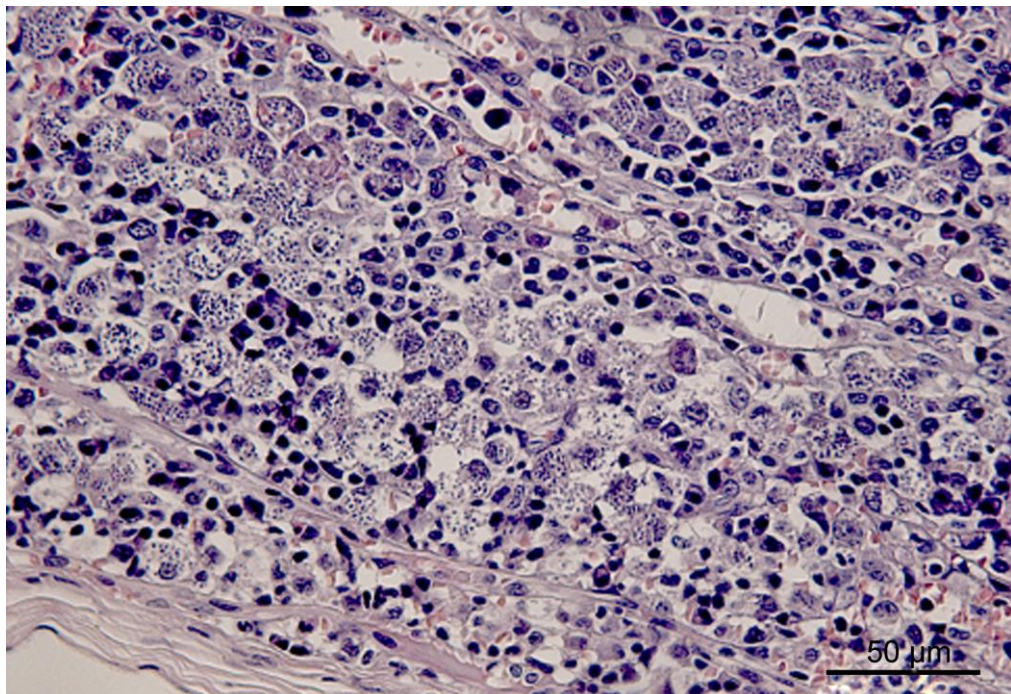


Figura 16. Corte histológico de baço de cão infectado por *L. infantum* mostrando acentuada periesplenite e esplenite granulomatosas com infiltrado inflamatório mal organizado constituído por macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Abundantes formas amastigotas de *Leishmania* foram observadas no interior de macrófagos. Hematoxilina-eosina.

Todos os treze cães que apresentaram testes parasitológicos (cultura e técnicas histológicas) positivos para *L. infantum* em amostras de SNC foram positivos para esse parasito nos testes parasitológicos de baço. No baço desses treze animais, em dez (76,9%) foram detectados parasitos por meio da cultura parasitológica e em todos eles (100%) foram identificadas formas amastigotas de *Leishmania* pela imuno-histoquímica (Figura 17). Nos trinta e sete cães que apresentaram testes parasitológicos negativos para *L. infantum* em amostras de SNC, trinta e quatro (92%) apresentaram positividade para *L. infantum* nos testes parasitológicos de baço. A correlação das alterações histológicas encontradas no baço com a positividade para *L. infantum* em amostras de SNC detectadas pelos testes parasitológicos nos cães examinados está descrita na Tabela 4.

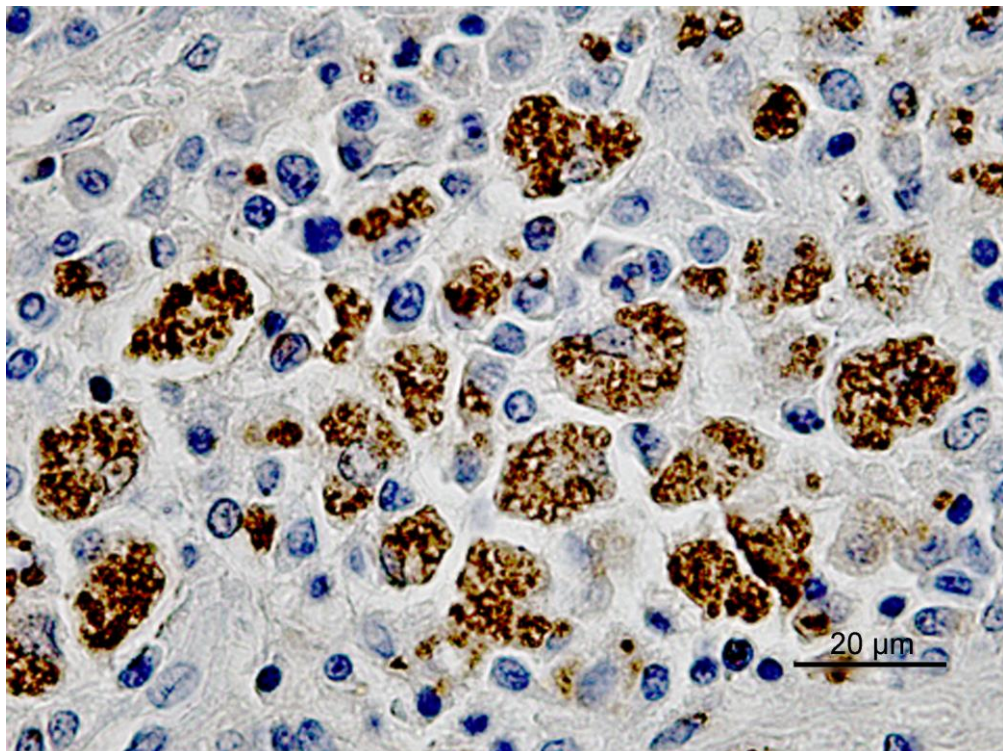


Figura 17. Corte histológico de baço de cão infectado por *L. infantum* mostrando diversas formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho. Imuno-histoquímica.

Tabela 4. Correlação das alterações histológicas encontradas no baço com a positividade para *L. infantum* em amostras de SNC detectadas pelos testes parasitológicos (cultura e técnicas histológicas) em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil)

Baço (n=50)		Testes parasitológicos no SNC				Total N
		Positivo (n=13)		Negativo (n=37)		
		N	%	N	%	
Periesplenite	Sim	9	69%	25	68%	34
	Não	4	31%	12	32%	16
Esplenite granulomatosa	Sim	12	92%	33	89%	45
	Não	1	8%	4	11%	5
Granuloma organizado	Sim	5	39%	13	35%	18
	Não	8	61%	24	65%	32
Média folículos/mm ²		N= 0,63 mm ²		N= 0,56 mm ²		

5.4 ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA DE *L. Infantum* PELA TÉCNICA DE qPCR

5.4.1 Total de amostras analisadas e resultados

No total foram avaliadas 50 amostras de cérebro, 50 de medula espinhal, 37 de líquido e 49 amostras de baço (sendo 46 de tecido congelado e três de tecido parafinado).

5.4.2 Avaliação da qPCR, quantificação e avaliação da carga parasitária

Foram estabelecidas curvas-padrão em cada placa de reação para determinar o número de cópias equivalentes do genoma (gEq) de *L. infantum* nas amostras avaliadas, sendo observada uma eficiência média da qPCR de 100% (valor mínimo de 95,9% e valor máximo de 110,1%). A média de *slope* foi de -3,3 (valor mínimo de

-3,1 e valor máximo de -3,4), e a média Y-intercepto foi de $C_q = 33$ (valor mínimo de 30,7 e valor máximo de 34,9), com média de ajuste dos valores à curva (R^2) de 0,99 (valor mínimo de 0,99 e valor máximo de 1) (Figura 18).

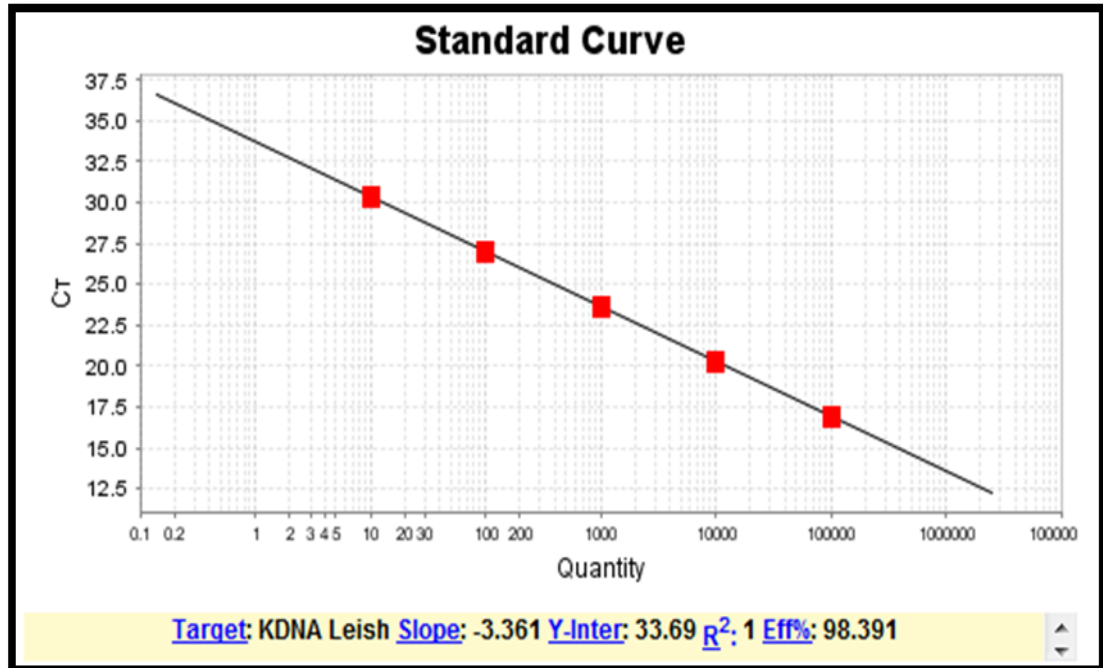


Figura 18. Gráfico representativo da curva-padrão com os índices Slope, Y-inter, R^2 e eficiência da qPCR. Os pontos da curva indicam a diluição seriada na base 10 de 500 a 0,05 gEq de *L. infantum*/μL.

A mediana de concentração de DNA por fluorimetria em amostras de baço, cérebro, medula espinhal e líquido e os seus valores mínimos e máximos estão descritos na Tabela 5. Dentre as 37 amostras de líquido examinadas, vinte e uma amostras (57%) apresentaram carga de DNA indetectável.

Tabela 5. Mediana e valores mínimos e máximos (ng/ μ L) da quantificação de DNA por fluorimetria em amostras de baço, cérebro, medula espinhal e líquido em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil)

Amostra	Nº amostras	Mediana (ng/μL)	Mínimo (ng/μL)	Máximo (ng/μL)
Baço (congelado)	46	35,9000	5,2800	120,0000
Baço (FFPE)	3	1,7200	0,7440	1,9600
Encéfalo	50	26,5000	3,5800	118,0000
Medula espinhal	50	2,0050	0,3480	25,4000
Líquor	37	0,0005	0,0005	2,2000

Todos os animais avaliados apresentaram positividade para DNA de *L. infantum* na técnica de qPCR em pelo menos uma das amostras de SNC. Nas diferentes amostras de SNC as frequências de positividade foram: 98% para o encéfalo, 96% para medula espinhal e 51% para o líquido. Para as amostras de baço a frequência de positividade foi de 96%.

As medianas e valores mínimos e máximos do número de cópias de equivalente genômico (gEq) de *L. infantum*/ ng de DNA do encéfalo, medula espinhal, líquido e baço encontrados no presente estudo estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6. Mediana e valores mínimos e máximos do número de cópias de gEq de *L. infantum*/ ng de DNA no encéfalo, medula espinhal, líquido e baço de cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil)

Amostra	Nº amostras	Mediana	Mínimo	Máximo
Baço	49	815,492	0,059	243277,500
Medula espinhal*	50	1,996	0,001	538,155
Encéfalo*	50	0,075	0,001	877, 201
Líquor	37	0,712	0,002	3753,254

*Utilizando teste de Mann–Whitney houve correlação estatística entre carga parasitária de baço e medula espinhal ($p= 0,006$ e coeficiente de correlação= 0,400) e entre baço e encéfalo ($p= 0,005$ e coeficiente de correlação= 0,406)

Em um desses cães com sinais clínicos neurológicos, que apresentou positividade na cultura parasitológica para *L. infantum* nas amostras de líquido e medula espinhal, o gEq de DNA de *L. infantum*/ ng foi de 0,004 em encéfalo, 2,922 em medula espinhal e 15,126 em líquido. Esse animal apresentava coinfeção pelo vírus da cinomose diagnosticada pelo exame histopatológico.

O outro cão com sinais clínicos neurológicos, que foi negativo para *L. infantum* na cultura parasitológica de amostras do SNC, apresentou carga de gEq de DNA de *L. infantum*/ ng de 4,011 no encéfalo e 2,423 na medula espinhal. A amostra de líquido deste animal não foi analisada pela técnica de qPCR.

Em relação a alterações histológicas, os animais foram separados em grupo com e sem lesão microscópica no SNC e os valores das medianas e os valores mínimos e máximos do número de cópias do gEq de *L. infantum*/ ng de cada grupo estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7. Carga parasitária em gEq de DNA de *L. infantum*/ ng em amostras de cérebro e medula espinhal de cães naturalmente infectados, com e sem lesão microscópica em SNC, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil)

Amostra	Mediana e valores mínimos e máximos da carga parasitária (gEq de DNA de <i>L. infantum</i> /ng)		
	Com lesão no SNC (n=16)	Sem lesão no SNC (n=34)	P valor*
Medula Espinhal (n=50)	4,662 (0,001-106,682)	1,798 (0,001- 538,155)	0,347
Encéfalo (n=50)	0,096 (0,001- 25,234)	0,066 (0,001- 877, 201)	0,765

*Teste de Mann-Whitney

As cargas parasitárias em gEq de DNA de *L. infantum*/ ng no SNC e baço dos cães estudados de acordo com a positividade para *L. infantum* no SNC pelas técnicas parasitológicas encontra-se na Tabela 8.

Tabela 8. Carga parasitária em gEq de DNA de *L.infantum*/ ng em amostras de SNC e baço de acordo com a positividade para *L. infantum* no SNC pelas técnicas parasitológicas (cultura e técnicas histológicas) em cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil)

Amostra	Carga parasitária (gEq de DNA de <i>L.infantum</i> / ng)				P valor**
	SNC Positivo (n=13)*		SNC Negativo (n=37)*		
	Med	Min-Max	Med	Min-Max	
Baço	1383,993	8,649 - 114477,300	485,246	0,001 - 243277,500	0,134
Líquor	15,126	0,005 - 3753,250	0,622	0,002 - 6,040	0,165
Medula espinhal	2,920	0,001 - 48,69	0,904	0,001 - 419,690	0,494
Encéfalo	0,134	0,001 - 25,230	0,157	0,001 - 877,200	0,751

*Exames parasitológicos (HE, IHQ, ISH e cultura parasitológica).

**P valor encontrado no teste Mann-Whitney

5.4.3 Teste de Inibição de DNA

Das vinte e três amostras que apresentavam resultado indetectável na qPCR, dezoito eram amostras de líquido, duas eram amostras de medula espinhal, duas eram amostras de baço e uma era amostra de encéfalo.

Dentre essas vinte e três amostras com carga indetectável, todas apresentaram resultado positivo no teste de inibição indicando que não havia presença de inibidores da reação ou de DNA degradado. Dentre elas, três apresentaram positividade em técnicas parasitológicas, sendo que duas eram amostras de líquido, e uma era de baço.

5.5 ANÁLISE DE LÍQUOR PELO DPP®

No total, 37 amostras de líquido foram submetidas ao teste rápido imunocromatográfico TR DPP® (Biomanguinhos, Fiocruz) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. Vinte e quatro amostras (65%) apresentaram resultado positivo (Tabela 9). A sensibilidade, especificidade e acurácia da técnica de DPP para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de líquido de cães

naturalmente infectados, usando como padrão de referência os resultados das técnicas de cultura parasitológica e qPCR em líquido foram, respectivamente: 79% (68-90%), 50% (37-63%) e 65% (52-77%), considerando intervalo de confiança (IC) de 95%.

Tabela 9. Resultados das análises de líquido pelas técnicas de DPP[®], usando como padrão de referência as técnicas de cultura parasitológica e qPCR realizadas no líquido de cães naturalmente infectados, período de fevereiro a novembro de 2014 (Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, Brasil)

DPP	Líquor		
	Positivo N (%)	Negativo N (%)	Total N (%)
Positivo	15 (79%)	9 (50%)	24 (65%)
Negativo	4 (21%)	9 (50%)	13 (35%)
Total	19 (100%)	18 (100%)	37 (100%)

6. DISCUSSÃO

A ocorrência de DNA de *L. infantum* no SNC foi muito elevada nos cães avaliados, sobretudo no encéfalo e medula espinhal. Entretanto, a frequência de parasitos viáveis detectados pelas técnicas parasitológicas nas amostras de SNC foi bem inferior, tendo predominado no líquido, seguido de medula espinhal e encéfalo. Essa menor frequência de positividade pelas técnicas parasitológicas já era esperada, pois são consideradas técnicas menos sensíveis para diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães, com frequências de positividade variando entre 48 e 83% (Furtado et al., 2015), enquanto a sensibilidade do PCR é de cerca de 98% (Queiroz et al., 2011). Entretanto, são técnicas de certeza, bastante específicas, que demonstraram, no presente estudo, que formas viáveis de *L. infantum* são comuns no SNC de cães soropositivos no DPP® e ELISA. A técnica de cultura parasitológica é considerada a mais sensível dentre as técnicas parasitológicas, com sensibilidades entre 62 e 82% em cães soropositivos (Madeira et al. 2006, Mello et al., 2014). Nesse estudo essa técnica foi pela primeira vez empregada para levantamento da ocorrência da infecção por *L. infantum* no SNC. Outros estudos já haviam utilizado técnicas de imuno-histoquímica, histopatologia e hibridização *in situ* como técnicas parasitológicas para esse tipo de estudo no SNC de cães (Ikeda et al., 2007; Melo & Machado, 2009). Porém, esses estudos não detectaram o parasito, provavelmente pela sensibilidade inferior dessas técnicas quando comparadas à cultura parasitológica.

A alta ocorrência de DNA de *L. infantum* em encéfalo de cães naturalmente infectados observada no presente estudo está de acordo com o relatado por Grano et al. (2014). Esses autores identificaram por qPCR o DNA do parasito em diferentes regiões do encéfalo de todos os vinte cães analisados, que eram naturalmente infectados e provenientes do estado de São Paulo. Entretanto, em estudo de Melo et al. (2015), também realizado em cães naturalmente infectados da mesma região, foi observada uma frequência inferior, igual a 53,3% de cães com DNA de *L. infantum* no encéfalo pela técnica de qPCR. DNA de *L. infantum* foi também relatado no cerebelo de um cão naturalmente infectado (Silva et al., 2008). Apesar da ocorrência

de DNA de *L. infantum* ser comum no encéfalo de cães naturalmente infectados por esse parasito, formas amastigotas são raramente encontradas.

No presente estudo, foram pela primeira vez relatadas formas amastigotas de *L. infantum* no tronco encefálico de um cão. A infecção do encéfalo por formas amastigotas de *L. infantum* já havia sido descrita em estudos de relatos de casos em meninges (Viñuela et al., 2001), plexo coróide (Nieto et al., 1996; Márquez et al., 2013) e tálamo (Márquez et al., 2013). Em diversos estudos de levantamento da ocorrência de *L. infantum* no encéfalo de cães naturalmente infectados (Ikeda et al., 2007; Grano et al., 2014; Melo et al., 2015), não foram encontradas formas amastigotas neste órgão apesar de algumas dessas pesquisas terem detectado a presença de DNA (Grano et al., 2014; Melo et al., 2015).

Na medula espinhal, a ocorrência de DNA de *L. infantum* foi alta e semelhante ao observado no encéfalo. A detecção de DNA de *L. infantum* na medula espinhal ainda não havia sido reportada. Entretanto, a observação de formas amastigotas foi rara e já havia sido descrita em relatos de casos em cães na Europa (Cauduro et al., 2011; Márquez et al., 2013). Márquez et al. (2013) relataram pela primeira vez a presença de formas amastigotas localizadas na substância branca do parênquima da medula espinhal cervical, na região dos funículos ventral e lateral, e também nos nervos espinais. Cauduro et al. (2011) observaram formas amastigotas de *Leishmania* spp. em granuloma localizado em espaço epidural, ventralmente à medula espinhal lombar. No Brasil, Ikeda et al. (2007) não encontrou formas amastigotas de *Leishmania* por meio das técnicas de histopatologia e imunohistoquímica na medula espinhal cervical, torácica e lombar de 39 cães naturalmente infectados por *L. infantum* do estado de São Paulo. No presente estudo, a localização de formas amastigotas na substância branca da medula cervical esteve de acordo com Márquez et al. (2013). Entretanto, formas amastigotas em espaço perivascular da substância cinzenta da medula espinhal foram pela primeira vez observada no presente estudo.

A ocorrência de DNA de *L. infantum* no líquido foi alta, porém inferior a do encéfalo e medula. Entretanto, quase metade das amostras de líquido não apresentaram amplificação na qPCR. Essa alta frequência de carga indetectável no líquido, ocorrendo inclusive em animais com parasitológico positivo, pode ser explicada pelo fato ter sido encontrada uma quantidade de DNA muito baixa, inferior à necessária para leitura no fluorímetro, em mais da metade das amostras

analisadas. Essa baixa quantidade de DNA possivelmente atrapalhou o processo de amplificação de DNA de *L. infantum*. Talvez, se fosse utilizada uma quantidade maior de amostra ou se fosse realizada centrifugação prévia permitindo a extração de mais células do líquido, a frequência de positividade poderia ter sido maior nesta amostra. O resultado encontrado no presente estudo é o primeiro levantamento da ocorrência de DNA de *L. infantum* em líquido de cães infectados por *L. infantum* usando a técnica de qPCR. O uso dessa técnica em líquido de cães infectados por este parasito somente havia sido descrita em um relato de caso feito por Márquez et al. (2013).

Entre as amostras de SNC, no líquido foi encontrada a maior ocorrência de positividade na cultura parasitológica. O isolamento de formas viáveis de *Leishmania* em líquido só havia sido descrito em uma criança com sinais neurológicos e a espécie identificada foi *L. donovani* (Prasad & San, 1996). Adicionalmente, as técnicas histológicas detectaram formas amastigotas de *L. infantum* em macrófagos no espaço perivascular, região de circulação do líquido. Portanto, os resultados positivos para *L. infantum* nos exames parasitológicos de líquido demonstram que formas viáveis do parasito são capazes de atingir e circular neste fluido em cães naturalmente infectados.

A frequência de anticorpos anti-*Leishmania* no líquido de cães deste estudo foi próxima às frequências relatadas por Feitosa et al. (2005) e Grano et al. (2014), iguais, respectivamente, a 69% e 62%, e superior à frequência de 48% relatada por Garcia-Alonso et al. (1996), em cães naturalmente infectados. Essa diferença de frequência pode ter sido influenciada pelo fato desses autores terem usado o teste de ELISA. Tanto no presente estudo, como no de Grano et al. (2014) a frequência de anticorpos no líquido foi inferior a encontrada nas amostras de soro. Porém, segundo Grano et al. (2014) não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos no soro e líquido. Diversos autores já haviam relatado a presença de anticorpos no líquido de cães naturalmente infectados utilizando técnicas diferentes como ELISA e imunoblot (Garcia -Alonso, 1996; Viñuelas et al., 2001; Lima et al., 2003; Feitosa et al., 2005; Melo et al., 2009; Grano et al., 2014). Pela primeira vez, foi utilizado o teste rápido DPP® para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostra de líquido, que foi capaz de detectar anticorpos em mais de metade dos cães estudados, sendo útil no diagnóstico da infecção do SNC por *L. infantum*. Entretanto, a sensibilidade e especificidade desse teste foram menores que as

observadas em amostras de soro de cães naturalmente infectados, iguais a 83% e 73% (Peixoto et al., 2015). A sensibilidade mais baixa do DPP no líquido com relação ao soro pode ser devido às frequências e concentrações mais baixas de anticorpos anti-*Leishmania* nesse tipo de amostra. Similarmente ao presente estudo, Grano et al. (2014) detectaram DNA de *L. infantum* no encéfalo sem a presença de anticorpos no líquido. A baixa especificidade do DPP no líquido pode ter ocorrido por reação cruzada com outros agentes patogênicos como *Babesia canis* (Leandro Júnior, 2014). A detecção de anticorpos no líquido indica que houve falha na barreira hematoencefálica ou barreira sangue-líquido cefalorraquidiano, uma vez que essas barreiras em condições normais não permitiriam a passagem desses anticorpos (Maia et al., 2015).

Até o presente estudo nenhum trabalho havia detectado formas viáveis do parasito em SNC em cães no Brasil. Entretanto, em cães da Europa, é um fato conhecido (Nieto et al., 1996; Viñuelas et al., 2001; Márquez et al., 2013). Para Prasad & Sen (1996), em humanos, frente à presença de fármacos anti-*Leishmania*, o parasito invade o SNC em busca de um sítio seguro, uma vez que a barreira hematoencefálica dificulta a passagem de diversas substâncias, inclusive de fármacos. Seguindo este raciocínio, a dificuldade em detectar o parasito poderia ser explicada pelo fato dos cães no Brasil não receberem tratamento para LV, enquanto que na Europa esse tratamento é permitido. Contrariando essa hipótese, no presente estudo, no qual os cães não foram tratados com fármacos anti-*Leishmania*, vários animais apresentaram formas viáveis de *L. infantum* em SNC através de cultura parasitológica e um cão apresentou diversas formas amastigotas nestes tecidos.

As possíveis formas pelas quais teria ocorrido a infecção por *L. infantum* no SNC dos cães deste estudo seriam por via hematogênia, na qual os parasitos podem ter atravessado a barreira hematoencefálica ou a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano no plexo coróide e chegado ao líquido (Tuomonen, 1996; Drevets & Leenen, 2000; Zachary, 2007). Apesar de não ter sido observado neste estudo, Márquez et al. (2013) detectaram formas amastigotas desse parasito no interior de vasos sanguíneos das leptomeninges e encéfalo e Nieto et al. (1996) detectaram esses protozoários no plexo coróide, mostrando que a via hematogênica é uma provável rota de migração de *L. infantum* para infectar o SNC. Outra possível forma de invasão do SNC por esse protozoário seria via tráfego normal de macrófagos

entre capilares sanguíneos e SNC, que é um mecanismo de defesa inata do SNC (Zachary, 2007). Nesse caso, macrófagos parasitados atravessariam as barreiras hematoencefálicas e sangue-líquido cefalorraquidiano e chegariam ao líquido e parênquima do SNC. Essa última via de infecção seria a mais provável no presente estudo, uma vez que muitos macrófagos parasitados foram observados no líquido do espaço perivascular de medula e tronco encefálico de um cão. Em camundongos infectados experimentalmente com *L. amazonensis*, Abreu-Silva et al. (2003) também levantaram como hipótese a infecção do SNC via leucócitos parasitados.

Adicionalmente, não está descartada a hipótese de que formas amastigotas de *L. infantum* tenham invadido o SNC dos cães estudados via vasos linfáticos. Esses vasos foram recentemente descritos nos seios durais do SNC de camundongos e humanos e estão conectados aos linfonodos cervicais, sendo capazes de transportar fluídos e células do sistema imune para o líquido (Louveau et al., 2015). Entretanto, no presente estudo, apesar de formas amastigotas terem sido observadas em líquido no espaço perivascular de medula espinhal e encéfalo de um dos cães examinados, esses parasitos não foram observados no parênquima. Essa não invasão do parênquima pode ter ocorrido pelo fato das formas amastigotas de *L. infantum* não terem conseguido atravessar a barreira formada pela glia limitante, que é formada por processos podais de astrócitos e fica situada imediatamente subjacente a pia mater (Zachary, 2007).

O uso crônico de corticóides em pacientes infectados por *L. infantum* está associado a exacerbação da doença (Pittalis et al., 2006), pois são drogas imunossupressoras, que bloqueiam a expressão de citocinas e podem afetar várias funções das células T citotóxicas (Boumpas et al., 1993). Portanto, o tratamento crônico de um cão com prednisolona pode ter sido fator predisponente para infecção do SNC associada a lesões e sinais neurológicos desse animal (Márquez et al., 2013). Todavia, nenhum dos cães estudados apresentava histórico de uso crônico de corticóides, não sendo este um fator que explicaria a alta ocorrência de do parasito em SNC dos animais estudados.

Apesar de diversos sinais clínicos da LVC já estarem descritos na literatura, relatos de sinais neurológicos ainda são escassos (Marzochi et al, 1985; Schwardt et al., 2012). Os principais sinais neurológicos já descritos em cães naturalmente infectados por *L. infantum* são: convulsões, deficiências motoras, alterações visuais, sinais de paralisia de nervos cranianos, andar em círculos, vocalização, paraparesia

e paralisia dos membros posteriores (Ikeda et al., 2007; Lima et al., 2003). No presente estudo, a frequência de sinais neurológicos foi baixa e igual à encontrada por Feitosa et al., (2000) em cães naturalmente infectados em área endêmica de LVC no estado de São Paulo, Brasil. Os sinais clínicos neurológicos observados no presente estudo já haviam sido relatados em estudos prévios (Feitosa et al., 2005; Ikeda et al., 2007). Entretanto, os sinais clínicos neurológicos apresentados por animais com LVC são pouco específicos e apresentam variedade muito ampla, o que dificulta relacionar estes sinais à presença de infecção por *L. infantum* (Feitosa et al., 2005; Ikeda et al., 2007; Maia et al., 2015). Além disso, a identificação de sinais clínicos neurológicos no cão é difícil, principalmente quando não se dispõe de avaliação clínica realizada por neurologista e de equipamentos específicos para exames neurológicos. Essa dificuldade de identificação de sinais clínicos neurológicos pode ter influenciado na baixa frequência de detecção desses sinais em cães infectados por *L. infantum* neste estudo.

Em um dos cães do presente estudo, provavelmente os sinais neurológicos de ataxia e desorientação estiveram associados à infecção com o vírus da cinomose (*Morbillivirus*). Essa hipótese baseia-se na observação de corpúsculos de Lentz e graves meningite, mielite e encefalite não supurativas com intensa desmielinização, compatíveis com a infecção por esse vírus (Gebara et al., 2004; Silva et al., 2009). Entretanto, este animal também apresentava formas viáveis de *L. infantum* em cultura de líquido e medula espinhal, o que indica coinfeção do SNC por estes dois agentes. Portanto, também não está descartada a hipótese de que a infecção por *L. infantum* no SNC tenha contribuído para os sinais clínicos observados. No outro cão com sinal neurológico, apesar de não haver positividade nos exames parasitológicos e alterações histológicas, encéfalo e a medula espinhal possuíam DNA de *L. infantum* com carga parasitária maior que a mediana da carga parasitária dos animais estudados. No encéfalo, essa carga excedeu em quase 54 vezes a mediana da carga parasitária dos demais animais. Adicionalmente, nenhum outro agente foi detectado no exame histopatológico. Portanto, é possível que os sinais neurológicos observados estivessem associados à infecção por *L. infantum*. A ausência de observação de alterações microscópicas neste cão pode ser explicada pelo fato de que nas técnicas histológicas somente uma pequena porção do sistema nervoso foi avaliada, sendo possível que demais regiões do tecido nervoso deste animal

estivessem lesionadas, porém não foram contempladas durante a coleta ou clivagem do fragmento.

Apesar da alta frequência de positividade em SNC, poucos animais apresentaram sinais neurológicos. Adicionalmente, semelhante aos resultados de Ikeda et al. (2007), grande parte dos cães que apresentaram alterações histológicas inflamatórias não possuíam sinais clínicos neurológicos. Essa ausência de sinais clínicos em cães com parasitismo e lesões no SNC pode ser devido ao fato do parasito não ter conseguido penetrar e causar lesões no parênquima do SNC, conforme observado por Márquez et al. (2013), não havendo comprometimento da função deste sistema nos cães avaliados. Outra explicação seria a ocorrência de coroidite e meningite menos graves do que às observadas por outros autores em cães com sinais neurológicos (Nieto et al. 1996; e Viñuelas et al., 2001). Concordando com Grano et al. (2014), a detecção do DNA de *L. infantum* no SNC pode representar uma fase inicial de disseminação desse parasito no SNC e os cães podem ter sido submetidos à eutanásia com pouco tempo de infecção. Consequentemente, não houve tempo suficiente para desenvolvimento de lesões neurológicas mais graves e a manifestação de sinais clínicos neurológicos associados à infecção.

A frequência de lesões histológicas encontradas em SNC dos cães estudados foi menor que a relatada em estudo de Grano et al. (2014), no qual 80% dos cães tinham meningite, 73% coroidite, 73% gliose subventricular e 53% manguito perivascular de células mononucleares no parênquima. Entretanto, a meningite, manguito perivascular, coroidite, encefalite e mielite observados no presente estudo foram achados comuns aos relatados em estudos prévios em cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Nieto et al., 1996; Viñuelas et al., 2001; Font et al., 2004; Ikeda et al., 2007; Melo & Machado, 2009; Melo et al., 2009; Márquez et al., 2013; Mendonça et al., 2013; Sakamoto et al., 2013; José- Lopez et al., 2014). Outras alterações histológicas como congestão vascular, gliose, neurônios escuros, neuronofagia, satelitose, áreas de micro-hemorragias, necrose e presença de substância hialina na parede dos vasos sanguíneos não foram observadas no SNC dos cães deste estudo, diferindo de outros autores (Nieto et al., 1996; Feitosa et al., 2005; Ikeda et al., 2007; Melo & Machado, 2009; Márquez et al., 2013; Mendonça et al., 2013; Sakamoto et al., 2013).

As alterações histológicas observadas nesse estudo no SNC não são específicas da infecção por *L. infantum* e não foi possível comprovar a associação delas com o parasitismo. A exceção foi o infiltrado inflamatório granulomatoso e não supurativo observado em espaço perivascular do tronco encefálico e medula espinhal cervical, que esteve associado à infecção por formas amastigotas em um cão. Entretanto, apesar de não terem sido observadas formas amastigotas nos demais cães, não se pode excluir a participação do parasito na formação dessas lesões, uma vez que todos os cães possuíam SNC infectado por *L. infantum* detectado na técnica de qPCR ou cultura parasitológica. Mesmo na ausência de formas amastigotas associadas, as lesões inflamatórias podem ser causadas quando estímulos periféricos causados por antígenos ou DNA dos parasitos ou mediadores inflamatórios atingem o SNC e ativam o processo inflamatório (Melo et al., 2015).

Poucos estudos encontraram alterações histológicas em medula espinhal de cães infectados com *L. infantum* e todos estes trabalhos são de relatos de caso de animais com sinais neurológicos tais como paraplegia (Font et al., 2004), paraparesia (Cauduro et al., 2011), tetraplegia (Márquez et al., 2013) e hemiparesia (José-Lopez et al., 2014). A ocorrência de infiltrado perivascular granulomatoso havia sido relatada por Márquez et al. (2013), porém somente atingia a substância branca e não a substância branca e cinzenta como no presente estudo. A ausência de sinais neurológicos observado nesse estudo provavelmente esteve relacionada a uma menor gravidade das lesões quando comparadas às observadas na medula espinhal de cães com sinais neurológicos, tais como necrose no parênquima com presença de células *gitter*, hemorragia, vasculite, trombose, granuloma no espaço epidural, massa intramedular, inflamação e destruição de fibras em nervos espinhais (Font et al., 2004; Cauduro et al., 2011; Márquez et al., 2013; José- López et al., 2014).

A ocorrência de infiltrado dos tipos granulomatoso e linfoplasmocitário observados no SNC neste estudo está de acordo com o relatado em estudos anteriores no SNC de animais naturalmente e experimentalmente infectados por *L. infantum* (Nieto et al., 1996; Viñuelas et al., 2001; Abreu-Silva et al., 2003; Ikeda et al., 2007; Melo & Machado, 2009, Melo et al., 2009; Cauduro et al., 2011; Schwardt et al., 2012; Márquez et al., 2013; Mendonça et al., 2013; Sakamoto et al., 2013). Diferente do presente estudo, houve uma maior frequência de infiltrado

linfoplasmocitário nos trabalhos de Ikeda et al. (2007) e de Melo & Machado (2009). Entretanto, nos trabalhos nos quais foi verificada a presença de formas amastigotas no SNC, o infiltrado descrito foi do tipo granulomatoso (Nieto et al., 1996; Viñuelas et al., 2001; Abreu-Silva et al., 2003; Cauduro et al., 2011; Márquez et al., 2013), corroborando com os achados deste estudo. Neutrófilos foram raramente observados no infiltrado inflamatório desse estudo e, diferindo de Márquez et al. (2013), eosinófilos e células gigantes estiveram ausentes.

Na técnica de qPCR, a medula espinhal foi, dentre as amostras do SNC, a que apresentou a maior mediana de carga parasitária de DNA de *L. infantum* seguido do líquido e encéfalo. Alterações histológicas graves já foram relatadas em medula espinhal de cães com LVC tais como hemorragias, granulomas, vasculites e necrose (Font et al., 2004; Cauduro et al., 2011; Márquez et al., 2013; José- López et al., 2014). Essas alterações e os achados deste estudo em relação à carga parasitária e ocorrência de formas amastigotas associadas a alterações histológicas neste órgão sugerem que a medula espinhal seja uma das regiões do SNC mais suscetíveis à infecção por esse parasito. Entretanto, como esse é o primeiro relato da utilização da técnica de qPCR em medula espinhal, tornam-se necessários mais estudos para esclarecimento da suscetibilidade deste órgão frente à infecção por *L. infantum*.

Nos animais que apresentaram sinais clínicos neurológicos, não foi possível avaliar a presença de correlação estatística entre a carga parasitária deles com a carga parasitária dos animais sem sinais neurológicos, uma vez que somente dois animais apresentaram sintomatologia nervosa, e um deles apresentava coinfeção pelo vírus da cinomose. Porém, em trabalho realizado por Melo et al., (2015), foi realizada a técnica de qPCR em amostra de encéfalo e não houve correlação entre carga parasitária dos cães com e sem sinais clínicos gerais da LVC. A baixa frequência de sinais clínicos neurológicos em animais com LVC dificulta avaliar se os animais com maior carga parasitária em órgãos do SNC são os animais que tendem a apresentar sinais de acometimento deste sistema. Porém, o animal com sinal neurológico não coinfectado com o vírus da cinomose apresentou carga parasitária de encéfalo e medula espinhal acima da mediana de carga parasitária dos cães sem sinais neurológicos. Com isso faz-se necessário mais estudos para avaliar a correlação entre carga parasitária e manifestação clínica neurológica em cães com LVC.

Avaliando a carga parasitária dos tecidos do SNC (medula espinhal e encéfalo) foi observado que a mediana da carga parasitária dos animais com lesão microscópica em SNC foi maior que a mediana da carga parasitária dos animais sem lesão. Essa diferença foi notada principalmente na medula espinhal, onde a carga parasitária dos animais com lesão foi mais que o dobro da mediana da carga parasitária dos animais sem lesão. Entretanto, não houve correlação estatística. Isso provavelmente ocorreu devido ao pequeno número de cães com lesões no SNC observados, sendo necessários mais estudos para avaliar a carga parasitária nesses diferentes grupos.

A mediana da carga parasitária no SNC e baço em animais com parasitológico positivo em amostras do SNC foi maior quando comparados à mediana da carga parasitária dos animais com parasitológico negativo, com exceção apenas para o encéfalo. O baço de animais com amostras de SNC positiva na parasitologia apresentou mediana de carga parasitária quase três vezes maior que a mediana da carga parasitária dos animais com parasitológico negativo. Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre esses valores observados. A explicação para esse resultado seria o baixo número de cães positivos no exame parasitológico das amostras do SNC. Adicionalmente, o cão que apresentou formas amastigotas em SNC apresentou carga parasitária da medula espinhal e do líquido muito acima da mediana da carga parasitária dos animais estudados. Este é mais um indício de que o baixo número de animais estudados tenha comprometido a análise estatística.

Corroborando com os resultados de Maia et al. (2015), foi observada no presente estudo correlação positiva entre carga parasitária de baço e órgãos do SNC (encéfalo e medula). Esses resultados sugerem que o acometimento do SNC por *L. infantum* está ligado à presença de cargas parasitárias mais altas no baço. Entretanto, não houve correlação estatística entre os tipos de alterações histológicas encontradas no baço e positividade no exame parasitológico para *L. infantum* em amostras do SNC. As frequências de periesplenite e ocorrência de granuloma no parênquima foram altas e semelhantes às observadas por Santana et al. (2008), iguais a 72% e 28%, respectivamente, em cães naturalmente infectados e potencialmente susceptíveis à infecção por *L. infantum*. Adicionalmente, esses autores detectaram formas amastigotas somente em cães potencialmente susceptíveis, com uma frequência de 40%. A observação da alta ocorrência de

periesplenite, granulomas e de formas amastigotas nos baço dos cães estudados, sugerem que eles seriam cães potencialmente susceptíveis de acordo com a classificação de Santana et al. (2008). Entretanto, não foi possível comparar o número de folículos entre os dois estudos, pois o critério adotado por Santana et al. (2008) para essa contagem foi subjetivo. Segundo Lima et al. (2014), baços com polpa branca moderadamente a extensivamente desorganizada estiveram associados a apresentações clínicas mais severas em cães com LV.

7.CONCLUSÕES

- A frequência de positividade em amostras do SNC se apresentou bastante alta, sendo observados DNA e formas viáveis do parasito, demonstrando que a *L.infantum* é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.
- A presença de formas amastigotas foi rara no SNC sendo observada em meio a infiltrado perivascular granulomatoso na medula espinhal cervical e tronco encefálico.
- Pela primeira vez foram detectadas formas amastigotas de *L. infantum* em tronco encefálico de cães, demonstrando que este órgão pode ser acometido em cães com LVC.
- Pela primeira vez formas viáveis de *L. infantum* foram detectadas em SNC de cães com LVC no Brasil, demonstrando que esse parasito é capaz de alcançar o SNC mesmo em animais que nunca foram tratados com drogas anti *Leishmania*.
- O líquido foi a amostra que apresentou maior frequência de positividade na técnica de cultura parasitológica, demonstrando ser uma possível rota para chegada da *L. infantum* nos tecidos do SNC.
- Pela primeira vez foi utilizado o teste DPP® para análise de líquido e a frequente detecção de anticorpos anti *Leishmania* neste fluido indica a perda de integridade da barreira hematoencefálica em cães naturalmente infectados.
- Os sinais neurológicos foram raros apesar da alta frequência de positividade para *L. infantum* no SNC, indicando que as lesões associadas a esse parasito não foram graves.
- Alterações histológicas inflamatórias do SNC foram frequentes demonstrando que cães infectados por *L. infantum* podem apresentar lesões nesses tecidos mesmo na ausência de sinais clínicos neurológicos e de formas amastigotas de *L. infantum*.

- Entre as amostras de SNC, a medula espinhal foi a que apresentou carga parasitária mais elevada, demonstrando que este tecido é um importante alvo de infecção da *L. infantum*.
- A infecção do SNC por *L. infantum* esteve relacionada à presença de cargas parasitárias mais altas no baço.
- Alterações inflamatórias no baço não foram associadas a ocorrência de positividade em amostras do SNC de cães naturalmente infectados.

REFERÊNCIAS

1. Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol.* 1991; 77(4): 557-61.
2. Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Tedesco RC, Mortara RA, Da Costa SCG. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68(6): 661-5.
3. Ackermann MR. Chronic Inflammation and wound healing. In: Zachary JF, McGavin MD. *Pathologic bases of infectious diseases*, 4th ed. USA: Mosby, 2007. p. 153-191.
4. Almeida ABPF, de Paula DAJ, Colodel EM, Dutra V, Nakazato L, Sousa VRF. Leishmaniose visceral e hepatite infecciosa em cachorro-vinagre mantido em cativeiro no Brasil- Relato de caso. *Ciências Veterinárias.* 2011; 32(1):333-8.
5. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer MD, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21: 334-359.
6. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004; 57: 1-88.
7. Alves CF, Amorim IFG, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, et al. Expression of IFN- γ , TNF-, IL-10 and TGF- in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Apr 15 ; 128(4): 349-358.
8. Arruda MM. Ministério da Saúde [homepage na Internet]. Leishmanioses. Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde . [acesso em 12 out 2013]. Disponível em: www.saude.gov.br/

9. Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, et al. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1996; 173(3): 758-61.
10. Banks WA, Erickson MA. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis.* 2010; 37(1): 26-32.
11. Barbosa-de-Deus R, Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, et al. *Leishmania major*- Like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(6): 1361–1366.
12. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med.* 1993; (119):1198–1208.
13. Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* 1998; 76(3): 173-180.
14. Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2003; 45(2): 79-83.
15. Camargo-Neves VL, Katz G, Rodas LA, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana, Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad. de Saúde Pública.* 2001; 17(5): 1263-67.
16. Cañavate C, Cruz I, Flores M. Leishmaniosis canina: diagnóstico. *Información Veterinária: La leishmaniosis canina, 1a parte, 2005.p. 28-32.*

17. Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2009;158(3):983-94.
18. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood– brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*. 2010;64(2):328-63.
19. Carson FL, Hladick C. *Histotechnology: a self instructional text*, 3 rd ed. ASCP Press Chicago, IL. 2009.
20. Cauduro A, Favole P, Lorenzo V, Simonetto L, Barda B, Cantile C, et al. Paraparesis caused by vertebral canal leishmaniotic granuloma in a dog. *J Vet Intern Med*. 2011; (25):398–399.
21. Chang, KP. *Cell Biology of Leishmania*. In:DJ Wyler (ed.): *Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects*. New York:Freeman WH & co.; 1990.p. 79-90.
22. Correale J, Villa A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochem Res*. 2009;34(12):2067-77.
23. Cuervo-Escobar S , Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Porrozzi R, Saboia-Vahia L, Miranda H. M. L, et al. T-Cell Populations and Cytokine Expression Are Impaired in Thymus and Spleen of Protein Malnourished BALB/c Mice Infected with *Leishmania infantum*. *Plos One*. 2014; 9(12): 1-22.
24. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 50(3):296-311.
25. Da Silva AS, França RT, Richini-Pereira VB, Langoni H, Monteiro SG, Lopes STA. First Autochthonous Case of Canine Visceral Leishmaniasis in the Center of Rio Grande do Sul State, Brazil. *Acta Sci Vet*. 2011; 39(2): 1-4.

26. Davson H. Review lecture. The blood-brain barrier. *J Physiol.* 1976;255(1):1-28.
27. De Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira MF. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(1): 77-8.
28. Dinhopf N, Mostegl MM, Richter B, Nedorost N, Maderner A, Fragner K, et al. In situ hybridisation for the detection of *Leishmania* species in paraffin wax-embedded canine tissues using a digoxigenin-labelled oligonucleotide probe. *Vet Rec.* 2011; 169(20):525.
29. Diniz LMO, Duani H, Freitas CR, Figueiredo RM, Xavier CC. Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43(6):743-5.
30. Drevets DA, Leenen PJ. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. *Microbes Infect.* 2000;2(13):1609-18.
31. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluids barriers: function and dysfunction. *Semin immunopathol.* 2009; (31): 497-511.
32. Feitosa MM, Ikeda FA, Bonello FL, Ciarlini PC, Gonçalves ME, Lima VMF, et al. Avaliação líquórica de cães, com e sem sintomatologia neurológica, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. *Vet Not.* 2005;11(2): 61-69.
33. Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Aracatuba – São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária.* 2000; 5 (28) :36-44.
34. Ferreira AS. Avaliação do potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina por PCR [tese]. Belo Horizonte: UFMG. Instituto de Ciências Biológicas; 2012.

35. Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol.* 2007 May 31; 146(3-4): 235-241.
36. Figueiredo FB, Filho CJLB, Schubach EYP, Pereira SA, Nascimento LD, Madeira MF. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43(1): 98-9.
37. Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol.* 2001 Aug 1; 99 (2): 105-111.
38. Font A, Mascort J, Altimira J, Closa JM, Vilafranca M. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis . *J Small Anim Pract.* 2004;(45): 199-201.
39. Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2006;137(3-4): 214-221.
40. Funed [homepage na Internet]. Manual do Programa de Avaliação da Qualidade da Leishmaniose Visceral Canina. Brasil:Fundação Ezequiel Dias; Nov 2013.[acesso em 12 nov 2014]. Avaliação da Qualidade do TR DPP® no Campo Disponível em: [http://funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2011/07/Manual-PAQ-Programa deAvalia%C3%A7%C3%A3o-da-Qualidade-da-leishmaniose-visceral-canina-para-o-campo.pdf](http://funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2011/07/Manual-PAQ-Programa-deAvalia%C3%A7%C3%A3o-da-Qualidade-da-leishmaniose-visceral-canina-para-o-campo.pdf)
41. Furtado MC, Menezes RC, Kiupel M, Madeira MF, Oliveira RVC, Langohr IM, et al. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors.* 2015; 8:620.

42. García- Alonso M, Nieto CG, Blanco A, Requena JM, Alonso C, Navarrete I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol.* 1996; (18):539-546.
43. Gebara CMS, Wosiacki SR, Negrão FJ, Alfieri AA, Alfieri AF. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004; 56 (2): 168-174.
44. Genaro O, Costa RT, Silva JCF, Reis AB, Vieira EP, Arias JR, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis of dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi*, in Brasil. *Tuérk Parazitol Derg.* 1997; 21 Suppl1: 93.
45. Gontijo CM, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev bras epidemiol.* 2004; 7(3):1-12.
46. Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Sevilla(Spain); 2002.* p. 7-14.
47. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005; 35(11-12): 1169-80.
48. Grano FG, Melo GD, Belinchón-Lorenzo S, Gómez-Nieto LC, Machado GF. First detection of *Leishmania infantum* DNA within the brain of naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2014; 204(3-4).p.376-80
49. Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto IS, de-Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP ® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(1): 54-59.

50. Hashim FA, Ahmed AE, EL- Hassan M, EL- Mubarak MH, Yagi H, Ibrahim EN, et al. Neurologic changes in visceral leishmaniasis. *Am J Trop med Hyg.* 1995;(52):149-154.
51. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999; 354: 1191-1199.
52. Ikeda FA, Ciarlini PC, Feitosa MM. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba- SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. *Revista clínica veterinária.* 2003; 8: 42-48.
53. Ikeda FA, Laurenti MD, Corbett CE, Feitosa MM, Machado GF, Perri SHV. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Braz J Res Anim Sci.* 2007; 44(1):5-11.
54. José-López R, de la Fuente C, Pumarola M, Añor S. Intramedullary spinal cord mass presumptively associated with leishmaniasis in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 2014; 244: 200-4.
55. Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VLR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol.* 2013; 196: 296-300.
56. Leandro-Júnior MVS. Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP-Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Curso de medicina. Programa de Fisiopatologia experimental, 2014.
57. Lima IS, Silva JS, Almeida VA, Junior FGL, Souza PAN, Laranjeira DF, et al. Severe Clinical Presentation of Visceral Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs with Disruption of the Splenic White Pulp. *PLoS One.* 2014; 9(2).

58. Lima VMF, Gonçalves ME, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Feitosa MM. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36(4):485-9.
59. Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanoscuentas A, Orrego C, et al. Diagnosis of leishmania using the polimerase chain reaction; a simplified procedure for field. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 49(3): 348-56.
60. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature.* 2015; 523: 337-341.
61. Machado FG, Melo DG, Moraes CO, Souza SM, Marcondes M, Perri HVS, et al. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 136: 340–345.
62. Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci.* 2009a; 87(2): 260-2.
63. Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pereira AS, Figueiredo FB, Baptista C, et al. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil *Vet Parasitol.* 2006; 138(3-4):366- 70.
64. Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol.* 2009b; 136: 411-23.
65. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008; 158(4): 274-287.

66. Maia C, Campino L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. J Trop Med. 2012; 2012: 1-7.
67. Maia CSF, Monteiro MC, Gavioli EC, Oliveira FR, Oliveira GB, Romão PRT. Neurological disease in human and canine leishmaniasis – clinical features and immunopathogenesis. Parasite Immunol. 2015; 37,385–393.
68. Mancianti F, Tardoni S, Melosi M. Evaluation of the effectiveness of commercial immunomigration tests in the diagnosis of canine leishmaniasis. Parasitologia. 2002; 44: 99.
69. Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE . Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. Vet J. 2008; 177(2): 279-282.
70. Márquez M, Pedregosa JR, López J, Marco-Salazar P, Fondevila Dolors, Pumarola M. *Leishmania amastigotes* in the central nervous system of a naturally infected dog. J Vet Diagn Invest. 2013; 25(1):142-6.
71. Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. Parasite Vectors. 2011; 4: 2-5.
72. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. J Clin Microbiol. 2004; 42(11): 5249-5255.
73. Marzochi MC, Coutinho SG, Souza WJ, Toledo LM, Grimaldi GJr, Momen H, et al. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro- Brasil. Cad. Saúde Pública, n.1, p.432-446, 1985.

74. Mascarenhas LA. Utilização do modelo canino, para o desenvolvimento de vacina contra Leishmaniose visceral. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária [periódico na internet]. 2013 Jan [acesso em 2013 Oct 24]; XI (20):[aproximadamente 13 p.]. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/cYGy0Pq2kewSSjH_2013-6-21-15-38-51.pdf
75. Mello CX, Figueiredo FB, Mendes-Júnior AAV, Furtado MC, Miranda LFC, Madeira MF. Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. SBMT. 2014; 47(6):788-790.
76. Melo GD, Machado GF. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral leishmaniasis: a histopathological investigation. Braz J Vet Pathol. 2009;2(2): 69-74.
77. Melo GD, Marcondes M, Vasconcelos RO, Machado GF. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. Vet Parasitol. 2009; (162): 248-25.
78. Melo GD, Silva JES, Grano FG, Souza MSB, Machado GF. Leishmania infection and neuroinflammation: Specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally-infected dogs. J Neuroimmunol. 2015; 289: 21-29.
79. Mendonça CC, Costa BMP, Brandão KM, Maruo VM, Maiorka PC, Machado GF, et al. Description of Visceral, Lymphatic and Central Nervous System Lesions in Dogs Infected with *Leishmania* spp. Braz J Vet Pathol. 2013; 6(1): 89 - 94
80. Menezes RC, Figueiredo FB, Wise AG, Madeira MF, Oliveira RVC, Schubach TMP, et al. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for the diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. J Clin Microbiol. 2013; 51(1):206-11.
81. Ministério da Saúde [homepage na Internet]. Leishmaniose Visceral. Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde. [acesso em 21 out 2013]. Disponível em: www.saude.gov.br/

82. Miranda LHM, Quintella LP, Santos IB, Oliveira RV, Menezes RC, Figueiredo FB, et al. Comparative Histopathological study of sporotrichosis and american tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro. *J Comp Path* 2010; 143: 1-7.
83. Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 2008; 24: 371-377
84. Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Michalsky EM, Dias ES. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(1): 76-8.
85. Nieto CG, Viñuelas J, Blanco A, Garcia-Alonso M, Verdugo SG, Navarrete I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. *Vet Rec.* 1996;(139): 346-7.
86. Oliveira, E, Oshiro ET, Pinto RV, Castro BC, Daniel KB, Oliveira JM, et al. Presence of amastigotes in the central nervous system of hamsters infected with *Leishmania* sp. *Rev Bras Parasitol.* 2011; 20 (2): 97-102.
87. PAHO;WHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas, 2014. [acesso em 31 out 2014]. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=21608&Itemid=
88. Paiva-Cavalcanti M, Regis-da-Silva CG, Gomes YM. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *J Venomous Animals Toxins Trop Dis.* 2010;14: 537-542.
89. Peixoto HM, Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health.* 2015; 20 (3) : 334–352.

90. Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, Caracappa S, Vitale M, et al. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun.* 2005; 29 Suppl 2: 301-303
91. Petersen CA, Greenlee MHW. Neurologic manifestations of *Leishmania spp.* Infection. *J Neuroparasitology.* 2011;(2):1-9.
92. Pimentel MIF, Alves ELM, Silva MHFF, Moza PG, Mello CX, Schubach AO et al. High lethality of visceral leishmaniasis in Barra Mansa, a new area of transmission in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47: 521-23.
93. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994; 62(1): 229-35.
94. Pittalis S, Nicastrì E, Spinazzola F, Ghirga P, De Marco M, Paglia MG, et al. *Leishmania infantum* leishmaniasis in corticosteroid-treated patients. *BMC Infect Dis.* 2006; 6:177.
95. Porrozzì R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14: 544-8.
96. Prasad LSN, Sen S. Migration of *leishmania donovani* amastigotes in the cerebrospinal fluid. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(6):652-4.
97. Queiroz NMGP, Silveira RCV, Noronha Jr ACF, Oliveira TMFS, Machado RZ, Starke-Buzetti W.A. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Vet Parasitol.* 2011; 178: 1-8.
98. Rami M, Atarhouch T, Sabri M, Cadi Soussi M, Benazzou T, Dakkak A . Canine leishmaniasis in the Rif mountains (Moroccan Mediterranean coast): a seroepidemiological survey. *Parasite.* 2003; 10: 79-85.

99. Ramos CCF, Duarte MIS, Ramos AMO. leishmaniose visceral fatal associada à síndrome de imunodeficiência adquirida: relato de caso com achados necroscópicos e estudo imuno-histoquímico. *Rev Soc Bras de Med Trop.* 1994; 27:245-250.
100. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, Franca-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006; 81: 68-75.
101. Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2352–2356.
102. Sakamoto KP, Melo GD, Machado GF. T and B lymphocytes in the brains of dogs with concomitant seropositivity to three pathogenic protozoans: *Leishmania chagasi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *BMC Res Notes.* 2013; 6:226.
103. Santana CC , Vassallo J, De Freitas LAR, Oliveira GGS, Pontes De Carvalho LC, Dos Santos WLC. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. *Parasite immunol.* 2008; 30: 515-524.
104. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RU, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol.* 1998; 12:315-317.
105. Schallig HDFH, Schoone GJ, Beijer EGM, Kroon CCM, Hommers M, Özbel Y, et al. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet Parasitol.* 2002;109: 1-8.
106. Schwardt TF, Vides JP, Pacheco AD, Langoni H, Generoso D, Machado GF, et al. Estudo da imunopatogenia das lesões no sistema nervoso central de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2012; 49(6):442-451.

107. Secretaria de Saúde do estado do Rio de Janeiro. Boletim Epidemiológico nº2/2013 – Leishmaniose Visceral. 2013; 8p.
108. Shaw J, Voller A. The detection of circulating antibody to kala-azar by means of immunofluorescent techniques. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964; 58: 349-352.
109. Silva AL, Prata A. Calazar. In: Coura JR. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. In: 2ªed(Guanabara Koogan). Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 2012, p.761-7.
110. Silva ES, Gontijo CMF, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;(65):896-8.
111. Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM, Schallig HD, Brazil RP. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun.* 2006; 30: 637-643
112. Silva MC, Figuera RA, Mazzanti A, Brum JS, Pierezan F, Barros CSL. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008) *Pesq Vet Bras.* 2009; 29 (8): 643-652.
113. Silva MR, Marques MJ, Romanha AJ, Santa-Rosa ICA, Carneiro CM, Reis AB. Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic área: Bom Sucesso, Minas Gerais State, Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 2008; 24(2): 281-6.
114. Solano-Gallego, L. Fernández-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Histological and Immunoistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum*- infected Dogs. *J Comp Pathol.* 2004; 130 (1): 7-12.

115. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2009;165: 1-18.
116. Souza CC, Barreto TO, da Silva SM, Pinto AWJ, Figueiredo MM, Rocha OGF, et al. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. *Int J Exp Path.* 2014; 95: 260-270.
117. Souza MB, Carvalho RW, Machado RNM, Wermelinger ED. Flebotomíneos de áreas com notificações de casos autóctones de leishmaniose visceral canina e leishmaniose tegumentar americana em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Entomol.* 2009; 53(1): 147-50.
118. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9: 951-958.
119. Tonini MA, Lemos EM, Reis AB, Vital WC, Dias ES, Dietze R. First description of autochthonous canine visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(6):754-6.
120. Tuomanen E. Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev.* 1996;(18): 289-299.
121. Viñuelas J, García-Alonso M, Fernando L, Navarrete I, Molano I, Mirón C, et al. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2001; (101): 23-7.
122. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1976; 70: 98-106.
123. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(4):842-57

124. WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva; 2010 In WHO Technical Report Series:1-186

125. WHO. Leishmaniasis: A Global Brief on Vector Borne Diseases. 2014: 1-56

126. Wiesendanger M. Constantin von Monakow (1853–1930) and Lina Stern (1878–1968): early explorations of the plexus choroideus and the blood-brain-barrier. Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie. 2010;161(4):140-4.

127. Zachary JF. Nervous system. In: Zachary JF, McGavin MD. Pathologic basis of veterinary disease. 4 th ed (Mosby). USA: Mosby; 2007. p.833-955.

128. Zhang H, Adwanikar H, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ. Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes. Neuroscientist. 2010;16(2):156-70.