

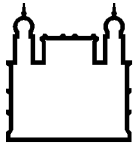
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: CORRELAÇÃO DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA COM A CARGA PARASITÁRIA E A VARIABILIDADE GENÉTICA
DO PARASITA**

AMANDA DOS SANTOS CAVALCANTI

Rio de Janeiro
Dezembro 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AMANDA DOS SANTOS CAVALCANTI

Leishmaniose Visceral Canina: correlação da resposta imunológica com a carga parasitária e a variabilidade genética do parasita

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dr. Renato Porrozi
Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

RIO DE JANEIRO
Dezembro 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C376 Cavalcanti, Amanda dos Santos

Correlação da Leishmaniose visceral canina com a resposta imunológica, carga parasitária e variabilidade genética do parasita / Amanda dos Santos Cavalcanti. – Rio de Janeiro, 2014.

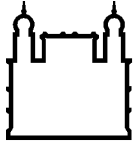
xxiii, 136 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 117-140

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Leishmania infantum. 3. Resposta imune. 4. Baço. 5. Fígado. 6. Carga parasitária. 7. Genética de populações. 8. Genótipos. 9. Microsatélites. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: AMANDA DOS SANTOS CAVALCANTI

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: CORRELAÇÃO DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA COM A CARGA PARASITÁRIA E A VARIABILIDADE GENÉTICA
DO PARASITA

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Renato Porrozzini
Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Claude Pirmez – Presidente (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Gustavo Romero (Universidade de Brasília)

**Prof. Dr. Fabiano Figueiredo (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro
Chagas/FIOCRUZ)**

Profa. Dra. Kátia Calabrese (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Gabriel Melim Ferreira (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 15 de Dezembro de 2014.

Dedicatória

***A todos os professores e
pesquisadores que me estimularam e
continuam estimulando na longa
caminhada da ciência***

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, Renato Porrozzi, pela oportunidade, apoio e incentivo. A ele nunca faltou determinação e compreensão;

Ao pesquisador e co-orientador, Milton Ozório Moraes, pela sua valiosa participação e por plantar a semente da busca por novidades;

À grande pesquisadora Elisa Cupollillo, pelo exemplo de perseverança, ética e pela sua contagiante busca pelas respostas. Pessoalmente um grande exemplo de profissional e mulher multi-tarefas.

À dedicada jovem cientista Patrícia Cuervo, pela sua constante visão crítica e construtiva além de ser uma pessoa admirável;

À Dra Claude Pirmez pela cuidadosa revisão desta tese;

À minha eterna amiga e brilhante pesquisadora, Mariana Côrtes Boité, pelo exemplo de sucesso e eficiência além da nossa grande amizade;

À querida Bárbara Neves pelo constante apoio profissional e pessoal;

Ao amigo Marcelo Ribeiro Alves, pela sua valiosa colaboração e pelo cuidado com que revisou os resultados;

Ao pesquisador Gabriel Ferreira, colaborador indispensável, o meu agradecimento pela sua eterna paciência;

À Fernanda Morgado, pela sua doce firmeza nas correções e comprometimento com a continuidade do projeto;

A todos os amigos do LPL e da CLIOC, Mônica Losada, Andrés Rodriguez, Nathalia Pinho, Camila Rodrigues, Caroline Batista, Leonardo Saboia, Virgínia Andrade, Pírcila Tostes, Cintia Souza, Ulisses Gonçalves e Camila Braga pela constante troca e pela ótima convivência diária. Vocês contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional;

À indescritível Eugenia Duarte, impossível dizer em poucas palavras o quanto sou grata por tê-la por perto, por acreditar em mim, pelas oportunidades lançadas e pelo apoio sincero e incondicional;

À admirável e criteriosa Suzana Assad Kahn, pelo seu contagiante amor à ciência;

Aos meus novos amigos e colaboradores Danielle Bonfim, Rafaela Sartore, Ema Torrado, Eduardo Branco e Diego Aguiar, cada dia aprendo um pouco com cada um de vocês;

Às minhas amigas da vida e minha família pela felicidade de tê-las;

Aos meu amados sobrinhos, Nina e Thiago, pelo colorido da infância e pelas boas risadas;

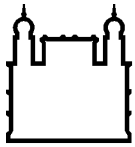
Ao Danilo Cantana, pelo companheirismo e pela leveza da vida;

À minha mãe, Elizabeth Cavalcanti, pelo constante apoio e pela vida.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e à amada FIOCRUZ pela sua importância no desenvolvimento do país.

“O poder nasce do querer. Sempre que alguém aplica a veemência e a perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá todos os obstáculos, e, se por acaso não atingir o alvo, fará pelo menos coisas admiráveis.”

José de Alencar



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

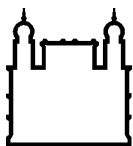
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: CORRELAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA COM A CARGA PARASITÁRIA E A VARIABILIDADE GENÉTICA DO PARASITA

RESUMO

DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Amanda dos Santos Cavalcanti

A Leishmaniose Visceral causada pela *Leishmania infantum* é uma doença zoonótica no Novo Mundo em que o cão é o principal hospedeiro doméstico. O conhecimento prévio dos mecanismos imunopatogênicos associados à infecção por *L. infantum* é necessário para o desenvolvimento de vacinas e outras estratégias de controle. O objetivo geral desta tese foi correlacionar a expressão clínica, a carga parasitária, a resposta imunológica do hospedeiro e a diversidade genética dos parasitos em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. O presente estudo é uma avaliação transversal de noventa e dois cães naturalmente infectados por *L. infantum* provenientes do estado do Mato Grosso. A infecção dos animais incluídos no estudo foi confirmada por sorologia, cultura e /ou PCR. O diagnóstico etiológico foi realizado por PCR-RFLP para o gene hsp70 e por eletroforese de enzimas nos parasitos isolados. Foram ainda analisados os sinais clínicos, a resposta imune pela expressão gênica de citocinas, a carga parasitária por qPCR, as alterações histológicas no baço e fígado e a as populações e genótipos de *L. infantum* circulantes por meio da análise do polimorfismo de microssatélites. Foram definidos grupos de acordo com a carga parasitária esplênica e hepática. Os animais com alta carga parasitária apresentaram altos títulos de anticorpos específicos anti-*Leishmania* e mais sinais clínicos da doença. A carga parasitária no baço foi maior do que no fígado e houve correlação com o rompimento da arquitetura esplênica, caracterizado principalmente pela desorganização da polpa branca. No fígado, a carga parasitária foi correlacionada positivamente à ocorrência de granulomas, à degeneração dos hepatócitos bem como à intensidade do infiltrado inflamatório. Mostramos que a maior carga parasitária promoveu menor expressão gênica de IL-12, IFN γ , TNF, IL-6, TGF β e IL-10 no baço e maior expressão de CCL2, CXCL8 e MAP4K4 no fígado. A análise genética dos parasitos é indicativa de que há infecção policlonal e tropismo tissular de alguns clones, mais evidente na análise das amostras pareadas (tecidos e isolados do tecido). Foi observada baixa variabilidade genética em que a maioria (96%, 49/51) das amostras foi caracterizada como pertencente a POP2, dentre as populações circulantes no Brasil previamente descritas pelo nosso grupo. Não houve associação entre a variabilidade genética dos parasitos e os parâmetros clínicos, parasitológicos ou imunológicos. Apesar disso, os dados gerados pelos ensaios *in vitro* com as cepas de diferentes populações sugerem que há sim diferenças na infectividade entre cepas com genótipos de microssatélites distintos. Foi reunida uma série de dados que, em conjunto, mostram que na região estudada a Leishmaniose Canina é causada por população geneticamente homogênea não tendo sido observada nenhuma correlação entre genótipos específicos e o fenótipo da infecção canina.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CORRELATION OF IMMUNE RESPONSE, PARASITE LOAD AND GENETIC VARIABILITY IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Amanda dos Santos Cavalcanti

Visceral leishmaniasis is a zoonotic disease in the New World and the domestic dog is the main host of *Leishmania infantum*. Prior knowledge of the immunopathogenic mechanisms associated with infection by *L. infantum* is required for the development of vaccines and other control strategies. The overall aim of this thesis was to compare the clinical expression, parasite load, the host immune response and genetic diversity of parasites in dogs naturally infected with *L. infantum*. This study is a cross-sectional assessment of ninety-two dogs naturally infected by *L. infantum*. Infection was confirmed by serology, parasite culture and / or PCR. The etiology was assessed by *hsp70* PCR-RFLP and MLEE. We further analyzed clinical signs, immune response by cytokine gene expression, molecular parasite load by qPCR, histological changes in splenic and hepatic compartments and also *L. infantum* populations and genotypes through microsatellite analysis. Groups according to the spleen and liver parasite load were defined. Animals with high parasite load had high titers of anti-*Leishmania* antibodies and more clinical signs. The parasite load in the spleen was higher than in liver and correlated with disruption of splenic architecture, mainly characterized by white pulp disorganization. Liver parasite load was correlated with the occurrence of granulomas, degeneration and intensity of the inflammatory infiltrate. We show that the higher parasite load promoted lower gene expression of IL-12, IFN γ , TNF, IL-6, IL-10 and TGF β in the spleen and increased expression of CCL2, CXCL8 MAP4K4 in the liver. Genetic analysis of parasites is indicative of polyclonal infection and tissue tropism of some clones, more evident in the analysis of paired samples (strain isolated and tissue). We also found low genetic variability, in which the majority (96%, 49/51) of the samples was characterized as belonging to POP2, among three populations previously described by our group. There was no association between the genetic variability of the parasites and the clinical, parasitological and immunological parameters. Nevertheless, the data generated by *in vitro* assays with strains from different populations suggest that there are differences in infectivity between strains with distinct microsatellite genotypes. Taken together, these results show that in the region studied Canine Leishmaniasis is caused by genetically homogeneous population without any correlation between specific genotypes and the phenotype of canine infection.

SUMÁRIO
RESUMO
ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Leishmaniose	23
1.2 Leishmaniose Visceral Canina	27
1.2.1 Epidemiologia	27
1.2.2 Características clínicas	29
1.2.3 Diagnóstico Laboratorial	31
1.2.4 Estratégias de Controle da LV Voltadas para o Cão	36
1.3 Imunopatogênese na Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	43
1.4 Diversidade Genética do Parasita	47
2. OBJETIVOS	51
2.1 Objetivo Geral	51
2.2 Objetivos Específicos	51
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 Desenho do Estudo	52
3.2 Animais e Avaliação Clínica	52
3.3 Coleta e Armazenamento de Amostras	54
3.4 Sorologia	54
3.5 Diagnóstico Molecular (PCR e PCR-RFLP)	56
3.6 Determinação da Carga Parasitária por qPCR	57
3.7 Análise Histopatológica	58
3.8 Extração do RNA e Quantificação da Expressão Gênica de Citocinas por qRT-PCR	59
3.9 Ensaio Multiplex de Quantificação da Expressão Gênica de Citocinas	60
3.10 Microssatélites	61
3.11 Ensaio de Infecção de Macrófagos	63
3.12 Análise Estatística	64
4. RESULTADOS	67
4.1 Grupos do Estudo	67

4.2	Confirmação Diagnóstica	68
4.3	Resposta Imune Humoral (IgG e IgM) em Cães Naturalmente Infectados com L. infantum.....	72
4.4	Padronização dos Ensaios de Quantificação Parasitária por qPCR.....	74
4.5	Carga Parasitária no Baço e Fígado de Cães Naturalmente Infectados com Leishmania infantum	76
4.6	Correlação entre a Carga Parasitária e a Resposta Imune Humoral.....	78
4.7	Aspectos Histopatológicos de Cães Naturalmente Infectados	80
4.8	Correlação entre a Carga Parasitária e a Resposta Imune Celular	84
4.9	Resposta Imune Hepática.....	86
4.10	Caracterização das Populações e Genótipos de L. infantum através da Análise do Polimorfismo de Microssatélites.....	90
4.10.1	Análise da Diversidade Alélica dos Marcadores de Microssatélites	90
4.10.2	Heterozigosidade	91
4.10.3	Grupos de Genótipos.....	93
4.10.4	Análise das Populações Genéticas definidas pelos Marcadores de Microssatélites	94
4.11	Infectividade In Vitro das Cepas Geneticamente Distintas.....	99
5.	DISCUSSÃO	102
5.1	Apresentação Clínica da LVC e Confirmação Diagnóstica.....	102
5.2	Parasitismo Tissular em Cães Naturalmente Infectados com Leishmania infantum.....	107
5.3	Expressão Gênica de Citocinas Tissulares e Aspectos Histopatológicos de Cães Naturalmente Infectados	108
5.4	Caracterização das Populações e Genótipos de L. infantum através da Análise do Polimorfismo de Microssatélites.....	114
6.	CONCLUSÕES	118
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
8.	ANEXOS	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral (Chappuis <i>et al.</i> , 2007, <i>Nature Review Microbiology</i> , vol 5, 873- 882).....	23
Figura 1.2 Distribuição dos casos de Leishmaniose Visceral Humana no Brasil, 1981-2009 (Harhay <i>et al.</i> , 2011. <i>Trends in Parasitology</i> , vol 27, no 9, 403-409).	25
Figura 1.3 Ciclo biológico de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Adaptado de <i>National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID)</i> . Disponível em http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis.aspx . Acesso em 8 de maio de 2014.	26
Figura 1.4 Soroprevalência da infecção de cães por <i>Leishmania infantum</i> no Brasil. ¹ Cortada <i>et al</i> (2004); ² Camargo-Neves <i>et al.</i> (2001); ³ Falqueto <i>et al.</i> (2009); ⁴ França-Silva <i>et al.</i> (2003); ⁵ dos-Santos <i>et al.</i> (2008); ⁶ Aguiar <i>et al.</i> (2010); ⁷ Abreu-Silva <i>et al.</i> (2008), ⁸ Barboza <i>et al.</i> , 2009; ⁹ Saraiva <i>et al.</i> (2012), ¹⁰ Paulan <i>et al.</i> , 2013, ¹¹ Morais <i>et al.</i> , 2013; ¹² Mestre <i>et al.</i> , 2011; ¹³ de Almeida <i>et al.</i> , 2012; ¹⁴ Cabrera <i>et al.</i> , 2003; ¹⁵ Nunes <i>et al.</i> , 2001; ¹⁶ Mestre <i>et al.</i> , 2007; ¹⁷ Frehse <i>et al.</i> , 2010); ¹⁸ de Oliveira <i>et al.</i> , 2010.....	29
Figura 1.5 Manifestações clínicas comumente encontradas em cães com Leishmaniose Visceral. (A) Dermatite exfoliativa, (B) Úlceras cutâneas, (C) Epistaxe, (D) Caquexia, (E) Lesões cutâneas no focinho e (F) Uveíte. Imagens arquivo pessoal.....	31
Figura 1.6 Esfregaço de medula óssea de cão com Leishmaniose Visceral. Células do sistema mononuclear fagocitário com amastigotas no citoplasma (seta). Coloração por Giemsa. Microscopia óptica, 100X. Arquivo pessoal.	33
Figura 1.7 Manejo sugerido para o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (Adaptado de Otranto e Dantas-Torres, 2013. <i>Trends in Parasitology</i> , Vol. 29, No. 7).	38
Figura 1.8 Mecanismos e marcadores de resistencia e susceptibilidade na Leishmaniose Visceral Canina. (Adaptado de Reis <i>et al</i> , 2010. <i>Trends in Parasitology</i> , Vol. 26, No. 7).....	44
Figura 3.1 Desenho experimental do estudo.....	52
Figura 3.2 Teste imunocromatográfico rápido DPP®CVL (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) utilizado para triagem sorológica da Leishmaniose Visceral Canina. (A) Teste positivo apresentando coloração nas bandas T e C; (B) Teste negativo	

apresentando coloração apenas na banda C e (C) Teste inválido não apresentando coloração na banda T. Banda teste T e controle C.	55
Figura 4.1 Porcentagem de animais apresentando os seis sinais clínicos mais comumente observados na Leishmaniose Visceral Canina.	68
Figura 4.2 Caracterização isoenzimática de cepas de <i>Leishmania</i> isoladas dos cães incluídos neste estudo. Os testes seguiram metodologia proposta por (Cupolillo <i>et al.</i> , 1994) para identificação de <i>L. infantum</i> , utilizando as enzimas G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase, E.C.1.1.1.43) e 6PGDH (6-phosphogluco-dehydrogenase, E.C. 1.1.1.43). Lg, cepa de referência de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> – IOC/L0565 (MHOM/BR/1975/M4147); Lb, cepa de referência de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> - IOC/L0566 (MHOM/BR/1975/M2903); La, cepa de referência de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> -IOC/L0575 (IFLA/BR/1967/PH8); Li, cepa de referência de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> - IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75). Identificação de cepas isoladas de (1, 2 e 3) medula óssea, (4, 5 e 6) baço e (7,8 e 9) fígado de cães soropositivos.	69
Figura 4.3 PCR-RFLP de <i>hsp70C</i> (234pb) para as cepas de referência de <i>Leishmania</i> e amostras clínicas de cães com LV após a digestão com Hae III. PM - marcador de peso molecular (pares de base); La, cepa de referência de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> -IOC/L0575 (IFLA/BR/1967/PH8); Li, cepa de referência de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> - IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75); 1-2, amostras de baço de cães sintomáticos; 3-4, amostras de baço de cães assintomáticos; 5-6, amostras de fígado de cães sintomáticos; 7-8 amostras de fígado de cães assintomáticos. Gel de poliacrilamida 4% corado pela Prata.	70
Figura 4.4 Resposta humoral específica em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> e não infectados de área não endêmica (controle). Títulos de IgG total (A e D) e de IgM (B e E) foram determinados por ELISA. Os títulos de IgG também foram detectados pelo teste rápido DPP®LVC (C e F). Os animais foram separados de acordo com o escore clínico em (A), (B) e (C) como 0-2 (n=33), 3-6 (n=30) e 7-18 (n=27); ou de acordo com a classificação clínica em (D), (E) e (F) como assintomáticos (n=21) ou sintomáticos (n=69). O soro de cães de área não endêmica foi utilizado como grupo controle (n=15). Ensaio realizado em duplicata para cada amostra. ELISA realizado com antígeno bruto da cepa de <i>L. infantum</i> IOC/L3128 (MCAN/BR/2009/BOB-FÍGADO). Barras indicam média ± erro padrão. Resultados significativos (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001. ANOVA com pós teste de Tukey.	73

Figura 4.5 Curvas padrão utilizadas como referência para a quantificação parasitária em amostras de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. (A) Curva construída com diluição seriada de DNA de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de cão para o gene HPRT. (B) Curva construída com diluição seriada de DNA de *L. infantum* para o gene *ssrRNA* de *Leishmania* sp. Ct (*cycle threshold*): número de ciclos de PCR em que é detectada a máxima fluorescência. 74

Figura 4.6 Curvas padrão no ensaio de PCR em tempo real. (A) Gráfico de amplificação de 5 diluições seriadas do DNA de células caninas para o gene HPRT; (B) Gráfico de amplificação de 7 diluições seriadas do DNA de promastigotas de *L. infantum* para o gene *ssrRNA*; (C) Picos da curva de dissociação para o amplicon de HPRT (74,0°C) e para o amplicon de *ssrRNA* (79,0°C). 75

Figura 4.7 Carga molecular parasitária no fígado e baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. PCR em tempo real para o gene *ssrRNA* de *Leishmania* sp. Concentração inicial de DNA normalizada pelo gene constitutivo HPRT. As barras indicam média \pm erro padrão. (**) $p < 0,01$, teste Mann Whitney. . 76

Figura 4.8 Carga parasitária molecular no fígado e baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* de acordo com a classificação clínica. Carga molecular parasitária no baço (A e B). Carga parasitária molecular no fígado (C e D). PCR em tempo real para o gene *ssrRNA* de *Leishmania* sp. Concentração inicial de DNA normalizada pelo gene constitutivo HPRT. As barras indicam a média \pm erro padrão. (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$. ANOVA com pós teste de Tukey para três grupos clínicos. Teste Mann Whitney para dois grupos clínicos. 77

Figura 4.9 Carga molecular parasitária pareada nos tecidos de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Carga parasitária pareada entre animais classificados como assintomáticos (A) ou sintomáticos (B). (***) $p < 0,001$, teste t pareado. 78

Figura 4.10 Resposta humoral específica em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* com alta e baixa carga molecular parasitária no baço. Títulos de IgG total (A) e de IgM total (B) e valores de reflectância no teste DPP®LVC (C) em animais com baixa (n = 60) ou alta (n = 27) carga molecular parasitária no baço. O soro de cães de área não endêmica foi utilizado como grupo controle (n=15). ELISA realizado em duplicata para cada amostra com antígeno bruto da cepa de *L. infantum* IOC/L3128 (MCAN/BR/2009/BOB-FÍGADO). Valores de reflectância foram determinadas pelo teste DPP®LVC. As barras horizontais indicam os valores

médios. A linha pontilhada indica o cut-off, 0,549 para IgG e IgM para 0,645. (***) $p < 0,0001$; (**) $p < 0,001$, ANOVA com pós teste de Tukey.....79

Figura 4.11 Resposta humoral pelo teste DPP@LVC de acordo com a carga molecular parasitária esplênica. Títulos de IgG foram detectados em 92 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* pelo teste rápido DPP@LVC. Carga parasitária determinada por qPCR em 88 cães. (A) Animais separados em grupos com baixa e alta carga parasitária esplênica. As barras sólidas indicam os valores medianos de reflectância. (B) Correlação entre os valores de reflectância e a carga parasitária. (***) valor $p < 0,001$, Mann-Whitney U test. $p < 0,05$ indica correlação significativa, teste de correlação de Pearson.80

Figura 4.12 Achados histopatológicos no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. (A) Polpa branca organizada com folículo bem formado; (B) Polpa branca moderadamente desorganizada, caracterizada pela polpa branca ainda evidente, mas com regiões fracamente individualizadas ou indistintas; (C) Polpa branca desorganizada, sem distinção dos compartimentos; (D, E e F) periesplenite evidenciada pela presença intenso infiltrado inflamatório na região sub-capsular; (G, H) Amastigotas intracelulares (setas); (I) Granuloma. HE, Barra de escala de 10 μm . Aumento 200X (A – F e I) e 1000X (G e H).82

Figura 4.13 Achados histopatológicos no fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Infiltrado inflamatório difuso no parênquima hepático (A); (B) Infiltrado inflamatório ao redor da veia centro lobular com presença de granuloma (seta); (C) Degeneração dos hepatócitos (seta); (E e F) Granuloma bem formado; (F) Amastigotas intracelulares (seta). HE, Barra de escala de 25 μm (A–D); 10 μm (E e F). Aumento 200X (A – D), 400X (E) e 1000X (F).83

Figura 4.14 Carga parasitária hepática e achados histopatológicos no fígado de animais naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. (A) Correlação entre a quantificação realizada por PCR em tempo real e a contagem de amastigotas no tecido hepático. Porcentagem de campos positivos em função da presença de granulomas (B); do infiltrado inflamatório no espaço porta (C) e no parênquima (D) e do grau de degeneração hepática (E). As barras indicam média \pm erro padrão. Em (A) $p < 0,05$ indica correlação significativa, teste de correlação de Pearson. Em B, C e D (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$. ANOVA com pós teste de Tukey.84

Figura 4.15 Mapa de intensidade de expressão gênica de citocinas nos animais com baixo (0-2), médio (3-6) ou alto (7-18) escore clínico. Expressão gênica determinada

por PCR em tempo real com valores normalizados para os genes constitutivos HPRT e RP32. Vermelho – alta expressão; verde – baixa expressão.....	85
Figura 4.16 Correlação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras/anti-inflamatórias com a carga parasitária esplênica. Análises <i>ex-vivo</i> dos níveis de mRNA no baço de cães infectados com <i>Leishmania infantum</i> detectado por qPCR para o gene <i>ssrRNA</i> de <i>Leishmania</i> sp. Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e RP32. Para os valores de carga parasitária, o gene HPRT para DNA canino foi utilizado para normalizar as concentrações iniciais de DNA em cada amostra. $p < 0,05$ indica correlação significativa, teste de correlação de Pearson.	86
Figura 4.17 Expressão gênica de citocinas no baço de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> . Análise <i>ex-vivo</i> por qPCR dos níveis de mRNA baço de cães classificados de acordo com a carga parasitária esplênica em baixa ou alta. Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e RP32. Para os valores de carga de parasita, o gene HPRT para DNA canino foi utilizado para normalizar as concentrações iniciais de DNA em cada amostra. (·) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, teste-T não paramétrico com 1,000 permutações.....	86
Figura 4.18 Correlação entre a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras/anti-inflamatórias e a carga parasitária molecular no fígado de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> . Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e RP32. Para os valores de carga parasitária, o gene HPRT para DNA canino foi utilizado para normalizar as concentrações iniciais de DNA. $p < 0,05$ indica correlação significativa, teste de correlação de Pearson.	88
Figura 4.19 Análise <i>ex-vivo</i> por qPCR multiplex dos níveis de mRNA no fígado de cães infectados com <i>Leishmania infantum</i> . Os cães foram classificados de acordo com a carga parasitária hepática como baixa ou alta. Os valores de expressão de mRNA de citocinas estão normalizados em relação à expressão dos genes HPRT e RP32. Para os valores de carga de parasita, o gene HPRT para DNA canino foi utilizado para normalizar as concentrações iniciais de DNA em cada amostra. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ teste-T não paramétrico com 1,000 permutações.....	89
Figura 4.20 Expressão de citocinas no fígado e baço de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> . Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e RP32. (***) $p < 0,001$, teste t pareado.	89

Figura 4.21 Distribuição de alelos nos marcadores de microssatélites em tecidos e cepas de cães infectados com <i>Leishmania infantum</i> . L – Lm2TG; M – Lm4TA; E – Li22-35; G – Li45-24; P – LI71-33.	91
Figura 4.22 Padrão dos picos de marcadores de microssatélites nas amostras de tecido de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> . (A) Picos duplos, sugestivos de infecção mista ou presença de heterozigoto; (B) Pico único característico de amostras homozigotas. Imagens obtidas no programa PeakScanner®. Marcador Li71-33 (P).	93
Figura 4.23 Distribuição geográfica dos genótipos de <i>L. infantum</i> . (A) Mapa do Brasil e (B) mapa do Mato Grosso com indicação do local de coleta das amostras. (C) Mapa dos municípios de coleta das amostras. Os gráficos em pizza indicam os genótipos compartilhados encontrados na região e os pontos azuis indicam os genótipos únicos. (D) Mapa em relevo da região mostrada em C, com indicação de distância em Km.	94
Figura 4.24 Estrutura estimada da população de <i>Leishmania infantum</i> inferida pelo programa STRUCTURE com base na amplificação de 14 marcadores de microssatélites de 210 amostras de cepas e tecidos caninos. Os gráficos de barras foram gerados utilizando o programa Excel a partir da distribuição dos valores alinhados de Q para os diferentes valores de K. Segundo análise hierárquica o número mais provável de populações é 3.	96
Figura 4.25 Rede filogenética construída no programa <i>SplitsTree</i> entre os genótipos de <i>Leishmania infantum</i> aplicando-se os valores da matriz de distância. Genótipos idênticos para os 14 marcadores de microssatélites foram agrupados e estão representados por “tipos”.	98
Figura 4.26 Índice de infecção (A) e percentual de células infectadas (B) com cepas de <i>L. infantum</i> . As cepas foram agrupadas em três populações geneticamente distintas (Ferreira et al., 2012).	100
Figura 4.27 Número médio de amastigotas por 400 células DH82. As cepas de <i>Leishmania infantum</i> foram agrupadas em três populações geneticamente distintas (Ferreira et al., 2012).	100
Figura 4.28 Infecção de macrófagos da linhagem DH82 por cepas geneticamente distintas de <i>L. infantum</i> . Cepas classificadas como POP 1 (A) e POP 3 (B). Microscópio óptico, 400X, barra de calibração 10µm.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Incidência bruta de Leishmaniose Visceral no Brasil por região e ano. ...24	24
Tabela 3.1 Genes alvos e desenho dos iniciadores para DNA.....58	58
Tabela 3.2 Genes alvos e desenho dos iniciadores para cDNA. S, senso; AS, anti-senso, pb, pares de bases.60	60
Tabela 3.3 Informação descritiva dos 14 marcadores de microssatélites utilizados. TA, temperatura de anelamento; pb, pares de bases62	62
Tabela 4.1 Descrição dos grupos experimentais67	67
Tabela 4.2 Positividade da cultura a partir de diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> . Os animais foram classificados pelo escore clínico (Quinnell, Courtenay, Shaw, <i>et al.</i> , 2001) ou como assintomáticos e sintomáticos.69	69
Tabela 4.3 Positividade das amostras de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> nos diferentes métodos de diagnóstico.71	71
Tabela 4.4 Concordância entre o diagnóstico molecular por hsp70 e o diagnóstico por kDNA e pelos testes sorológicos DPP®LVC e ELISA para IgG total.71	71
Tabela 4.5 Concordância nos diferentes métodos de diagnóstico usados para detecção da infecção canina por <i>L. infantum</i> . Os animais foram classificados pelo escore clínico (Quinnell, Courtenay, Shaw, <i>et al.</i> , 2001) ou como assintomáticos e sintomáticos.72	72
Tabela 4.6 Grupos de estudo de acordo com a carga parasitária molecular no baço e fígado78	78
Tabela 4.7 Histopatologia esplênica em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> com baixa (n=33) e alta (n=26) carga parasitária.....81	81
Tabela 4.8 Achados histopatológicos no baço e fígado de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> e sua relação com a carga molecular parasitária tissular. Os animais foram divididos quanto a relação entre a carga parasitária do baço/fígado do mesmo animal estava maior no fígado (Fígado > Baço) ou menor no fígado (Fígado < Baço).....90	90
Tabela 4.9 Heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) em tecidos e cepas de cães infectados com <i>Leishmania infantum</i> nos marcadores de microssatélites. L – Lm2TG; M – Lm4TA; E – Li22-35; G – Li45-24; P – Li71-33.....91	91
Tabela 4.10 Amostras pareadas que mostraram perfis distintos na análise de microssatélites.....92	92

Tabela 4.11 Descrição do grupo de amostras analisadas nos ensaios de microssatélites.....	97
Tabela 4.12 Descrição das cepas analisadas.....	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCL2/MCP-1	Proteína quimiotóxica de monócitos-1
CP	Carga parasitária
Ct	Ciclo de corte (<i>cycle threshold</i> , Ct)
CXCL8	Interleucina 8
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
H _e	Heterozigosidade esperada
H _o	Heterozigosidade observada
HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferase
Hsp70	Proteína do choque térmico
IFN γ	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-27	Interleucina 27
kDNA	Ácido deoxirribonucléico dos minicírculos do cinetoplasto de <i>Leishmania</i>
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAP4K4	Proteína quinase (“mitogen-activated protein kinase kinase 4”)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MLEE	Eletroforese multilocus de isoenzimas multilocus
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NO	Óxido nítrico
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase com restrição de fragmentos (“Restriction Fragment Length Polymorphism”)
qPCR	Reação em cadeia da polymerase quantitativa
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RP32	Proteína ribossomal 32
SFB	Soro fetal bovino

ssrRNA	Subunidade 18S do RNA ribossomal de <i>Leishmania</i> sp.
TE	Tampão tris–EDTA
TGFβ	Fator de transformação do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmaniose*

Parasitas do gênero *Leishmania* causam um amplo espectro de doenças conhecidas coletivamente como leishmaniose, que são um grave problema de saúde pública. Estima-se que 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença e, a cada ano, dois milhões de novos casos são registrados em 88 países, sendo que em 65 deles ocorre também a forma visceral (**Figura 1.1**). Na América Latina a doença já foi encontrada em pelo menos 12 países e 90% dos casos ocorrem no Brasil (Chappuis *et al.*, 2007; Who, 2010; Alvar *et al.*, 2012).



Figura 1.1 Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral (Chappuis *et al.*, 2007, *Nature Review Microbiology*, vol 5, 873- 882).

Especificamente em relação à Leishmaniose Visceral (LV), a incidência mundial anual é estimada em 500.000 novos casos e a maioria ocorre em seis países, a saber, Bangladesh, Índia, Nepal, Etiópia, Sudão e Brasil (Chappuis *et al.*, 2007; Who, 2010). No período de 1990 a 2005 a taxa de incidência no Brasil variou de 1 a 3 casos por 100 mil habitantes, com taxa de mortalidade de 7,2% em 2006 (Alvar *et al.*, 2012; Brasil, 2012). Os dados oficiais mais recentes do mostram incidência anual no Brasil de 1,58 em 100.000 habitantes (Brasil, 2012). Em números absolutos, ocorreram em média 788 novos casos por ano nos últimos 22 anos. Em 2012 foram 3.058 novos casos, concentrados nas regiões Nordeste e

Norte (**Tabela 1.1**), mas a doença encontra-se em expansão nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste. Hoje há casos nas 27 unidades da federação, sendo que os estados de Tocantins e Mato Grosso do Sul são os mais afetados, com incidências de 23,77 e 11,86 em 100.000 habitantes, respectivamente (**Figura 1.2 e Tabela 1.1**). Inicialmente, a doença se restringia às áreas rurais e peri-urbanas, mas agora tem exibido um novo padrão com documentação de casos em populações de grandes cidades (Oliveira *et al.*, 2006; Werneck, 2008; Harhay *et al.*, 2011). A expansão para novas áreas é fortemente associada à migração e adaptação do vetor (Harhay *et al.*, 2011); à densidade populacional e à vegetação abundante (Cerbino Neto *et al.*, 2009); às condições como água canalizada e coleta de lixo (Costa *et al.*, 2005) mas, também, tem sido relacionada à desnutrição (Gontijo e Melo, 2004) e co-infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (Reyburn *et al.*, 2000). Nos países endêmicos, a LV continua negligenciada pelo setor privado da economia e tem cabido ao setor público o papel de investir no desenvolvimento de novas drogas e em métodos de diagnóstico mais eficientes (Gontijo e Melo, 2004).

Tabela 1.1 Incidência bruta de Leishmaniose Visceral no Brasil por região e ano.

Região	1990	1995	2000	2005	2012
Região Norte	35	117	366	660	601
Região Nordeste	1650	3519	4029	2011	1460
Região Sudeste	243	171	314	656	597
Região Sul	-	-	-	3	5
Região Centro-Oeste	16	78	149	261	395
Total	1944	3885	4858	3591	3058

Fonte: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)

A infecção visceral é causada por protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* e pelas espécies *Leishmania donovani* (*L. donovani*) no Velho Mundo e *Leishmania infantum* (*L. infantum*) tanto no Novo quanto no Velho Mundos. Clinicamente, a infecção humana é caracterizada por febre intermitente, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenite, pancitopenia e, particularmente, anemia. A LV causada pela *L. infantum* é uma doença essencialmente zoonótica, acometendo principalmente cães, sendo baixa a endemicidade em humanos, enquanto que a *L. donovani* circula, exclusivamente, entre humanos e é responsável por epidemias em larga escala com alta taxa de mortalidade (Banuls *et al.*, 2011).

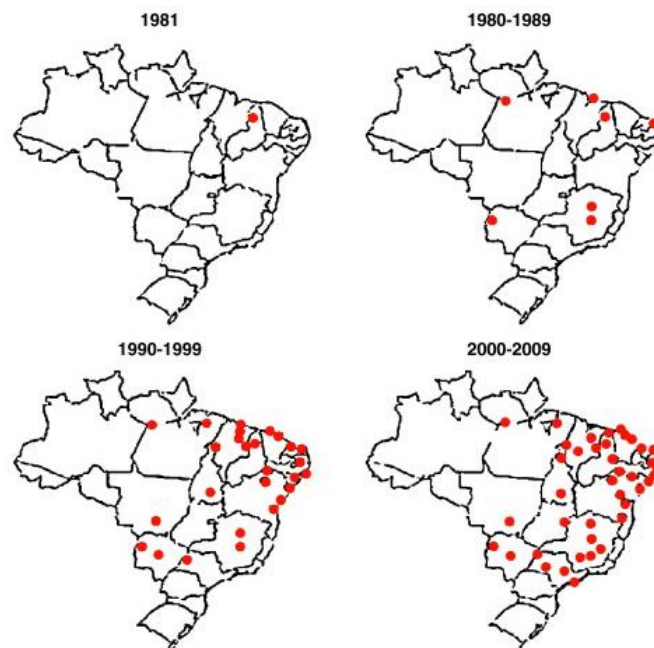


Figura 1.2 Distribuição dos casos de Leishmaniose Visceral Humana no Brasil, 1981-2009 (Harhay *et al.*, 2011. *Trends in Parasitology*, vol 27, no 9, 403-409).

A transmissão natural ocorre pela picada da fêmea de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* no Velho e Novo Mundo, respectivamente. Nas Américas e no Brasil, a principal espécie vetora da *L. infantum* é o *Lutzomyia longipalpis* (Brazil, 2013). Outras espécies como *Lu. evansi* na Colômbia (Travi *et al.*, 1990), *Lu. migonei* em Pernambuco, PE, Brasil (De Carvalho *et al.*, 2010) e *Lu. cruzi* em Mato Grosso do Sul, MS, Brasil (De Pita-Pereira *et al.*, 2008) também já foram apontadas como vetoras na LV. A doença circula entre hospedeiros vertebrados silvestres como as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Lainson e Shaw, 1987) e, no círculo urbano, os cães (*Canis familiaris*) são apontados como os principais reservatórios (Moreno e Alvar, 2002). Já os humanos são considerados hospedeiros acidentais (Desjeux, 2004), mas já foi mostrado seu potencial como fonte de infecção (Costa *et al.*, 2000).

Os parasitos são intracelulares obrigatórios. Uma vez que o hospedeiro vertebrado é infectado, as promastigotas metacíclicas invadem neutrófilos recrutados para o local da picada que são fagocitados pelos macrófagos. O neutrófilos sofrem morte celular por NETose. A NETose é um mecanismo recentemente descrito da morte de neutrófilos que ocorre quando são ativados e promove a liberação das chamadas armadilhas extracelulares dos neutrófilos

(NETs). As NETs são teias compostas por proteínas de cromatina e proteínas granulares que podem matar as bactérias e os fungos (Brinkmann *et al.*, 2004; Brinkmann e Zychlinsky, 2007). O papel das NETs já foi demonstrado em infecções por *Leishmania sp.* (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009). Uma vez no interior dos macrófagos, ocorre a amastigogênese e as amastigotas se multiplicam por divisão simples até o rompimento da membrana celular sendo liberadas e invadindo outras células e se espalhando para os órgãos alvo, majoritariamente linfonodos e baço, pelas vias linfática e sanguínea. Os flebótomos são infectados durante repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, quando ingere as células infectadas. No intestino do vetor, as amastigotas são liberadas se transformam em promastigotas pró-cíclicas que por divisão simples se transformam na forma infectante, as promastigotas metacíclicas. Estas, por sua vez, migram para a probóscide do hospedeiro invertebrado e são regurgitadas durante o repasto sanguíneo, infectando o homem e os animais (**Figura 1.3**).

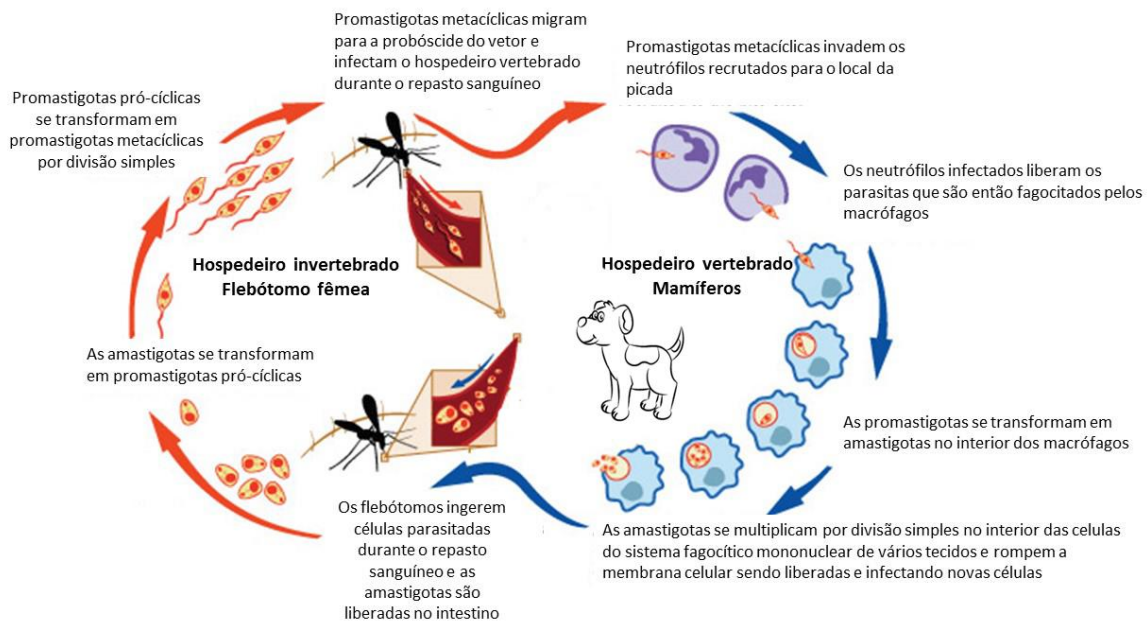


Figura 1.3 Ciclo biológico de parasitos do gênero *Leishmania* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Adaptado de *National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID)*. Disponível em <http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis.aspx>. Acesso em 8 de maio de 2014.

1.2 *Leishmaniose Visceral Canina*

1.2.1 *Epidemiologia*

Os cães têm importante função ecoepidemiológica na manutenção da LVH, pois servem como hospedeiro e reservatório doméstico do parasito (Deane e Deane, 1962; Lainson e Shaw, 1987). A enzootia canina pode preceder a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem (Camargo-Neves *et al.*, 2001). No Brasil são escassos os dados oficiais sobre a prevalência da infecção canina, mas a partir inúmeros relatos em várias partes do país pode-se inferir sua dispersão (**Figura 1.4**). A incidência da doença humana já foi associada à infecção canina (Werneck *et al.*, 2007). Em outro estudo, a variável com maior poder para explicar incidência da LVH foi a soropositividade canina (De Araujo *et al.*, 2013).

No Brasil, a CVL inicialmente era uma doença restrita às áreas rurais, mas a partir da década de 80 começou a se espalhar pelas áreas urbanas (Harhay *et al.*, 2011). Essa urbanização foi resultado de fatores como o desflorestamento em larga escala acompanhado da adaptação do vetor às áreas urbanas (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008) bem como ao intenso êxodo rural ocorrido nas décadas de 60 e 70 (Barreto *et al.*, 2011).

Um estudo realizado em uma área endêmica com 35.293 cães verificou-se que a prevalência da infecção canina foi significativamente maior nas áreas urbanas e em animais com pelo curto. As raças mais afetadas foram Boxer e Cocker Spaniel. Não foi observada prevalência diferencial quanto a idade ou gênero dos animais (França-Silva *et al.*, 2003). Em outro estudo foi apontado que animais com o pelo curto, de raça pura, que ficam no ambiente peri-doméstico com áreas verdes adjacentes têm maior predisposição à infecção (Belo *et al.*, 2013). A predisposição da raça, está relacionada a fatores genéticos do hospedeiro. Em uma coorte em cães de área endêmica de *L. infantum* no Brasil, o genótipo DLA-DRB1 do MHC de classe II foi associado aos níveis de IgG e à presença do parasita. Particularmente, a presença do alelo DLA-DRB1*01502 foi associada ao maior risco de adquirir a infecção em relação aos cães sem o alelo (Quinnell, Kennedy, *et al.*, 2003). Da mesma forma, o polimorfismo do gene Slc11a1 (NRAMP1), envolvido no controle da proliferação intracelular dos parasitos por meio da alteração do microambiente intravacuolar do fagossomo, já foi relacionado ao desenvolvimeno da doença

(Gruenheid *et al.*, 1997; Sanchez-Robert *et al.*, 2008). Outro estudo de caso–controle com 97 cães associou-se a ocorrência de polimorfismo na região promotora aos cães-caso e um haplótipo específico foi associado a doença em cães da raça boxer (Sanchez-Robert *et al.*, 2005). De fato, estudos epidemiológicos já associaram maior prevalência da infecção em cães das raças Boxer, Pastor Alemão, Doberman, Cocker Spaniel e Foxhound (França-Silva *et al.*, 2003; Duprey *et al.*, 2006). Por outro lado, algumas raças podem ser resistentes à infecção e ao desenvolvimento da doença como a Ibizan Hound no Mediterrâneo (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

No cão, a pele representa um reservatório de amastigotas ainda no período pré-patente da infecção (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Manna *et al.*, 2006), denotando seu potencial de transmissibilidade. Embora os cães sintomáticos sejam mais infecciosos para o flebótomo (Quinnell e Courtenay, 2009), os animais assintomáticos também representam uma fonte de infecção (Miro *et al.*, 2008) e mesmo a pele íntegra é capaz de infectar flebótomos (Vexenat *et al.*, 1993). Recentemente, utilizando técnicas moleculares e xenodiagnóstico, Courtenay e colaboradores (Courtenay *et al.*, 2014) mostraram que o número de parasitos na pele e na medula aumenta com a duração e a gravidade da infecção. Os autores associaram a infectividade para os flebótomos ao maior número de parasitos na pele, sendo este o melhor preditor de infecciosidade. Assim, o papel dos animais assintomáticos na epidemiologia da infecção é questionado.

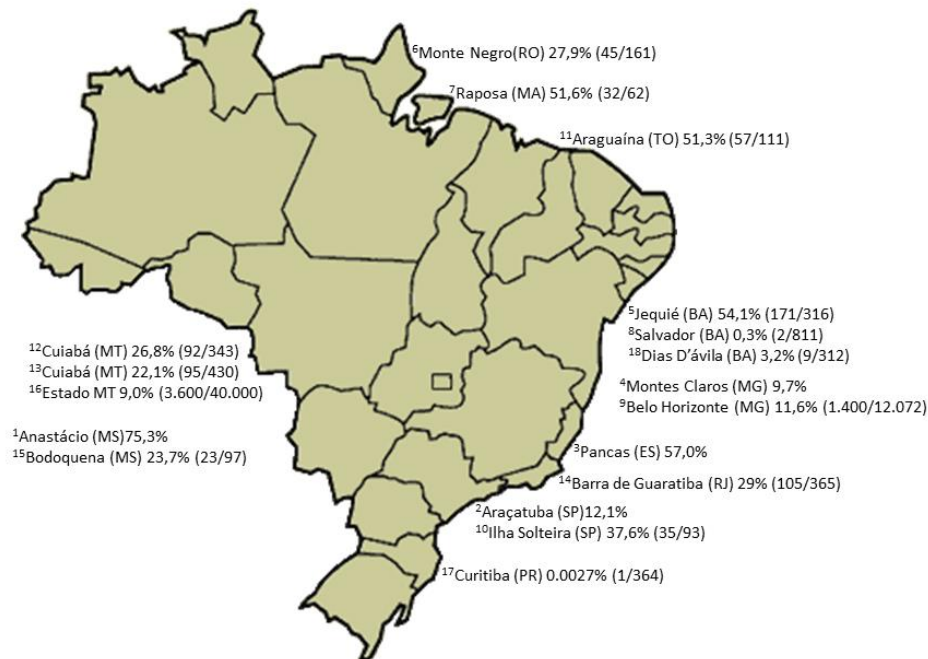


Figura 1.4 Soroprevalência da infecção de cães por *Leishmania infantum* no Brasil. ¹Cortada *et al* (2004); ²Camargo-Neves *et al.* (2001); ³Falqueto *et al.* (2009); ⁴França-Silva *et al.* (2003); ⁵dos-Santos *et al.* (2008); ⁶Aguiar *et al.* (2010); ⁷Abreu-Silva *et al.* (2008), ⁸Barboza *et al.*, 2009; ⁹Saraiva *et al.* (2012), ¹⁰Paulan *et al.*, 2013, ¹¹Morais *et al.*, 2013; ¹²Mestre *et al.*, 2011; ¹³de Almeida *et al.*, 2012; ¹⁴Cabrera *et al.*, 2003; ¹⁵Nunes *et al.*, 2001; ¹⁶Mestre *et al.*, 2007; ¹⁷Frehse *et al.*, 2010); ¹⁸de Oliveira *et al.*, 2010.

1.2.2 Características clínicas

A Leishmaniose Visceral Humana, também conhecida como “kal-azar” no Velho Mundo, é fatal se não for tratada. No homem, o quadro clínico típico inclui hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, episódios irregulares de febre, perda de peso e anemia aplásica (Gupta *et al.*, 2008; De Leonardis *et al.*, 2009). Pode também ocorrer a forma assintomática da infecção (Costa *et al.*, 2000), sendo documentada uma razão de 1 caso de doença para cada 18,5 pessoas infectadas (Badaro *et al.*, 1986).

A doença canina é pleomórfica, com alguns cães apresentando sintomatologia grave, caracterizando a forma sintomática. Na forma oligossintomática os animais apresentam poucos sinais clínicos de doença, ou ainda se mantêm assintomáticos, sem evidências clínicas da infecção (Mancianti e

Meciani, 1988). Foi estimado que 32,4% se mantêm assintomáticos, 35,2% oligossintomáticos e 42,4% sintomáticos (França-Silva *et al.*, 2003).

Na forma sintomática os cães mostram sinais clínicos típicos, como lesões cutâneas, por exemplo, alopecia generalizada ou localizada; descamação; eczema em focinho e orelhas; ulcerações nas orelhas, focinho, cauda e articulações; pelos opacos; perda de peso e de apetite; linfadenopatia localizada ou generalizada; lesões oculares - blefarite, associada à dermatite facial, ceratoconjuntivite bilateral, uveíte e glaucoma (provavelmente em consequência de uveíte severa); epistaxis; anemia; falência renal; diarreia crônica; onicogribose; coriza e edema das patas. Em casos avançados, são relatados: apatia e sonolência intensas; neuralgia; poliartrite; polimiosite; rachaduras no coxim plantar; úlceras interdigitais; lesões ósseas ou periostite proliferativa (**Figura 1.5**) (Baneth e Jaffe, 1999; Galvez *et al.*, 2011). Quanto à sorologia, estes animais apresentam altos títulos de anticorpos para antígenos brutos de *Leishmania* sp. ou antígenos específicos como o rK39. Na forma oligossintomática, os cães exibem sinais clínicos pouco característicos e a sorologia, em geral, resulta em títulos baixos. Por fim, os animais assintomáticos não apresentam sinais clínicos, porém os exames sorológicos e parasitológicos são positivos. Quinnell e colaboradores (Quinnell, Courtenay, Shaw, *et al.*, 2001) ressaltam que para uma avaliação clínica mais apurada deve ser feita uma análise semi-quantitativa com um escore de intensidade de 0 (ausência) a 3 (grave) dos seis sinais típicos da doença canina: alopecia, dermatite, conjuntivite, úlcera de pele, onicogribose e linfadenomegalia (linfonodos poplíteos e pré-escapulares). Os escores devem ser somados obtendo-se uma classificação clínica final. Alguns estudos já demonstraram correlação positiva entre a carga parasitária e as manifestações clínicas, sendo mais evidente nas formas graves de LVC (Francino *et al.*, 2006; Lage *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2009; Manna *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013).



Figura 1.5 Manifestações clínicas comumente encontradas em cães com Leishmaniose Visceral. (A) Dermatite exfoliativa, (B) Úlceras cutâneas, (C) Epistaxe, (D) Caquexia, (E) Lesões cutâneas no focinho e (F) Uveíte. Imagens arquivo pessoal.

1.2.3 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode ser feito, de forma direta ou indireta, por (i) visualização do parasita nos tecidos por microscopia ou por cultivo *in vitro*; (ii) detecção do DNA do parasita nas amostras de tecido; (iii) imunodiagnóstico por meio da detecção de antígenos específicos do parasita nos tecidos ou detecção de anticorpos anti-*Leishmania* ou (iv) pela inoculação dos espécimes clínicos em modelos animais. Testes laboratoriais precisos são cruciais para um correto diagnóstico, pois tanto na doença humana como na canina a apresentação clínica é inespecífica, podendo ainda ocorrer a infecção assintomática. Em humanos a questão se torna ainda mais crítica, pois o diagnóstico precoce é um fator determinante para o início do tratamento que tem consequência direta na letalidade da infecção.

Na realidade da saúde pública o diagnóstico da doença canina somente é realizado quando há confirmação de casos em humanos ou em inquéritos epidemiológicos. Já na prática veterinária, a investigação é feita com base em critérios clínicos e epidemiológicos. Uma variedade de ensaios sorológicos, parasitológicos e moleculares foi desenvolvida para detecção da infecção canina (Maia e Campino, 2008; Miro *et al.*, 2008). No plano ideal, os ensaios devem ser simples, acessíveis e altamente sensíveis (>95%). Também é desejável alta

especificidade, já que existem áreas com sobreposição, tanto de espécies de *Leishmania* como de outros tripanossomatídeos que podem conferir resultados falso positivos para *L. infantum* (Troncarelli *et al.*, 2009; Viol *et al.*, 2012).

1.2.3.1 Diagnóstico Parasitológico

A visualização direta do parasita nos tecidos é considerada o padrão-ouro no diagnóstico de leishmaniose por sua especificidade (Herwaldt, 1999). Os métodos clássicos incluem a visualização da forma amastigota por exame microscópico nos cortes histológicos ou esfregaços de aspirado de linfonodos, medula óssea ou baço; a inoculação em hamsters e a cultura *in vitro* de fragmentos de tecidos para o isolamento da forma promastigota (Grimaldi e Tesh, 1993).

Nos esfregaços de aspirados corados com Giemsa é possível visualizar o citoplasma em azul pálido com um núcleo relativamente grande corado em rosa. Paralelamente ao núcleo visualiza-se o cinetoplasto com coloração violeta profundo (**Figura 1.6**). Embora específico, a sensibilidade do exame microscópico varia, sendo maior para o baço 93-99% (Zijlstra, 1992; Sarker *et al.*, 2004) do que para a medula óssea 53-86 % (Ho *et al.*, 1948) ou para o linfonodo 53-65 % (Siddig *et al.*, 1988; Babiker *et al.*, 2007). Contudo, a aspiração esplênica pode ter complicações hemorrágicas e requer habilidade técnica, bem como infraestrutura para transfusão de sangue e cirurgia (Sundar e Rai, 2002). A precisão da análise microscópica é influenciada pela capacidade técnica e pela qualidade do preparo do material, bem como dos reagentes utilizados. A sensibilidade pode variar de 40% a 95% dependendo do tempo de observação das lâminas (Da Silva *et al.*, 2005).

O cultivo do parasita em meio de cultura a partir de amostras clínicas é indispensável para o isolamento e posterior identificação da espécie. No entanto, nem sempre é possível estabelecer essa rotina devido ao custo, ao tempo e à infraestrutura necessária. O material clínico, seja biópsia ou aspirado, é inoculado em meio de cultura bifásico Novy-McNeil-Nicolle com Schneider suplementado com antibióticos e incubado em estufa de 24°C a 26°C. O isolamento e a visualização das formas promastigotas pode demorar até um mês (Sundar e Rai, 2002). A grande vantagem desta técnica é que após o isolamento e cultivo de uma grande quantidade de promastigotas, pode ser feito o diagnóstico etiológico analisando o padrão de isoenzimas por eletroforese (Kreutzer *et al.*, 1993; Cupolillo *et al.*, 1994).

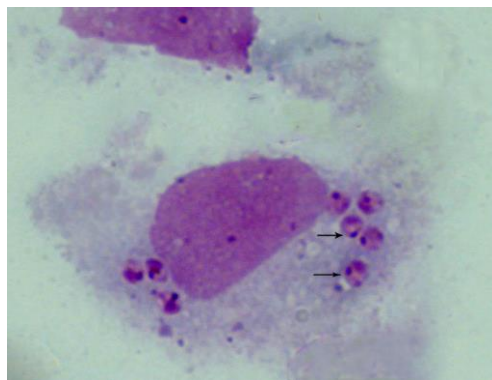


Figura 1.6 Esfregaço de medula óssea de cão com Leishmaniose Visceral. Células do sistema mononuclear fagocitário com amastigotas no citoplasma (seta). Coloração por Giemsa. Microscopia óptica, 100X. Arquivo pessoal.

O diagnóstico molecular da leishmaniose por meio da reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*, PCR) é uma poderosa ferramenta e está largamente difundido. Porém ainda não é uma realidade na saúde pública, permanecendo restrito a hospitais de referência e centros de pesquisa. A técnica é mais sensível do que os métodos tradicionais de diagnóstico direto (Ashford *et al.*, 1995). Além disso, o desenvolvimento de alvos espécie-específicos para *L. infantum* incrementou a especificidade desses métodos para o diagnóstico (Rocha *et al.*, 2010; Odiwuor *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2011) com destacada importância para distinção entre as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum* (Gomes *et al.*, 2007).

Desde o início do uso da PCR para diagnóstico da leishmaniose, diversos alvos foram desenvolvidos, tais como os minicírculos de DNA do cinetoplasto (kDNA) (Smyth *et al.*, 1992; Reale *et al.*, 1999; Ampuero *et al.*, 2009); o RNA ribossomal - rRNA (Guevara *et al.*, 1992); as sequências repetitivas do genoma (Piarroux *et al.*, 1993); a região espaçadora entre os transcritos internos do gene rDNA ou “internal transcribed spacer” - ITS-1-rDNA (Schonian *et al.*, 2003; Nasereddin *et al.*, 2006) e a proteína do “choque térmico” (hsp70, do inglês *heat shock protein*) (Graca *et al.*, 2012).

A PCR direcionada para o kDNA tem sido exaustivamente utilizada, sendo a mais difundida, em especial, pela alta sensibilidade. Entretanto, sua padronização não é trivial estando sujeita a problemas técnicos, inclusive resultados falso-positivos. O kDNA possui cerca de 10.000 cópias de minicírculos de DNA por célula, com tamanhos que variam entre 600 e 800 pb. Cada minicírculo é dividido em uma região conservada de aproximadamente 150pb e uma região variável de 600pb

(Morales *et al.*, 2001). Oligonucleotídeos, desenvolvidos para anelar e amplificar a região conservada, são capazes de identificar o gênero (Degrave *et al.*, 1994), sendo úteis no diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp. Já aqueles direcionados para a região variável do genoma permitem a discriminação entre as espécies (Eresh *et al.*, 1994; Cortes *et al.*, 2004). Tais características tornaram o kDNA um alvo bastante pesquisado e utilizado. Na LVC, a sensibilidade do teste é maior em cães doentes e, além disso, varia durante o curso da infecção, sendo maior (78%-88%) até 135 dias após a infecção e declinando a cerca de 50% após 300 dias (Quinnell, Courtenay, Davidson, *et al.*, 2001). Entre os testes moleculares, a PCR pode detectar a infecção antes da soroconversão, mas é importante acompanhar e monitorar a soroconversão durante o curso da infecção (Coura-Vital *et al.*, 2013). A sensibilidade pode variar também de acordo com o espécime clínico, sendo possível utilizar amostras de sangue (Mohammadiha *et al.*, 2013); aspirado de medula óssea (Cortes *et al.*, 2004); aspirado esplênico e linfonodal (Solca Mda *et al.*, 2012); pele saudável (Manna *et al.*, 2004) e swab conjuntival (Leite *et al.*, 2010; De Almeida Ferreira *et al.*, 2012). O linfonodo e a pele são as melhores opções na rotina veterinária (Manna *et al.*, 2004).

Variações da técnica clássica de PCR, tais como a PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Quaresma *et al.*, 2009), a *nested*-PCR (Carvalho Ferreira *et al.*, 2014) e a LSSP-PCR (*Low-Stringency Single Specific Primer*-PCR) (Alvarenga *et al.*, 2012), podem ser utilizadas para o diagnóstico etiológico, mas não serão discutidas detalhadamente aqui. A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido empregada para determinar a carga parasitária da infecção no hospedeiro vertebrado (Nicolas *et al.*, 2002; Manna *et al.*, 2004; Rolao *et al.*, 2004; Francino *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2009; Menezes-Souza *et al.*, 2011; Michelin *et al.*, 2011; Solca Mda *et al.*, 2012), sendo útil não só para o diagnóstico como também para estudar a dinâmica da infecção.

1.2.3.2 Diagnóstico Sorológico

Os métodos sorológicos tradicionalmente empregados no diagnóstico da infecção canina são o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Brasil, 2006). Alguns estudos estimam que a sensibilidade da RIFI varia de 68% a 100% e que a especificidade varia de 52% a 100%, enquanto que no ELISA são estimadas em 91% a 97% e 83% a 98%,

respectivamente (Scalone *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2007; De Arruda *et al.*, 2013). Em estudo com 234 cães domésticos, a RIFI apresentou sensibilidade (72%) menor que o ELISA (95%), enquanto a especificidade de ambos os ensaios foi baixa (52 e 64%, respectivamente). No diagnóstico da doença canina, a busca pela especificidade é fundamental, pois com a grande proporção de resultados falso-positivos em função da reação cruzada com *Trypanossoma cruzi*, *L. braziliensis* e *Ehrlichia canis* (Alves e Bevilacqua, 2004), não é incomum que animais sejam sacrificados desnecessariamente.

A RIFI foi utilizada por muito tempo como teste confirmatório e o ELISA como teste de triagem. No entanto, com o intuito de melhorar a acurácia do diagnóstico a RIFI paulatinamente vem sendo substituída pelo teste imunocromatográfico com antígenos recombinantes (*Dual Path Platform* - DPP®LVC, Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), que é mais simples, mais rápido e não necessita de técnicos especializados. Em 2011 o Ministério da Saúde determinou que o teste imunocromatográfico deve ser utilizado como teste de triagem e o ELISA como teste confirmatório (Brasil, 2011). O rK39, um dos componentes do DPP®LVC, é uma sequência repetida de 39 aminoácidos da proteína associada a kinesina (*kinesin-related protein*), conservada entre as espécies do complexo *donovani* (Burns, 1993). No diagnóstico da doença humana, o ensaio de ELISA com esta proteína mostra excelente sensibilidade (93–100)% e especificidade (97–98)% (Sundar e Rai, 2002). O desenvolvimento de um teste imunocromatográfico rápido, com base no rK39 (*dipstick test*), possibilitou o diagnóstico em campo também da doença humana nos vários países endêmicos no Velho Mundo (Chappuis, 2005; Chappuis *et al.*, 2006).

Atualmente, a rotina oficial para diagnóstico da infecção canina é feita empregando-se o DPP®LVC como triagem e o ELISA como confirmatório. No entanto, em metanálise recente (Quinnell *et al.*, 2013), concluiu-se que embora o desempenho diagnóstico do teste rápido com rK39 seja aceitável para a confirmação de infecção em casos clínicos suspeitos, sua sensibilidade para detectar cães infectados é baixa para ser utilizado em estudos epidemiológicos de grande escala. Além disso, Grimaldi e colaboradores (Grimaldi *et al.*, 2012) também mostraram que apesar da sensibilidade em cães sintomáticos ser alta (98%), nos cães assintomáticos fica muito aquém do desejado (47%), o que levanta a questão do seu uso na rotina diagnóstica. Novos antígenos recombinantes (rLci1A e rLci2B) foram

utilizados em conjunto com o rK39 aumentando a sensibilidade de 87% para 93,5%, dando perspectivas de melhoria nos resultados do teste rápido (Fraga *et al.*, 2014).

Independentemente dos pontos negativos, na atual realidade brasileira o teste rápido (DPP®LVC) parece ser uma ferramenta indispensável no combate à dispersão da LVC. Ele possibilita o diagnóstico da doença em áreas mais remotas, nas quais a coleta e o envio de amostras para laboratório são praticamente inviáveis, e agiliza o diagnóstico, facilitando a implementação de medidas de controle aonde cães infectados são identificados.

A vacinação em massa da população canina, discutida mais adiante, ainda não é uma realidade. Ainda não é possível diferenciar um cão vacinado de um infectado e este é um grande desafio no campo dos testes sorológicos.

1.2.4 Estratégias de Controle da LV Voltadas para o Cão

As estratégias de controle da leishmaniose variaram pouco ao longo de décadas, mas nos últimos anos houve avanços interessantes no diagnóstico, tratamento precoce da LVH e prevenção. São exemplos disso, o desenvolvimento de um teste imunocromatográfico rápido para o diagnóstico da LV; o licenciamento do primeiro medicamento oral (miltefosina) para tratamento da LVH; o advento de coleiras impregnadas com deltametrina que reduzem o risco de infecção em cães e consequentemente protegendo humanos (Gavvani *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2003), além da perspectiva de uso das duas vacinas anti-*Leishmania* disponíveis para cães.

No Brasil, as atuais estratégias de controle da LV se baseiam na detecção e no tratamento precoce dos casos humanos ativos, na redução da população de flebotomíneos vetores, na eliminação dos reservatórios domésticos e nas atividades de educação em saúde (Brasil, 2006). São necessárias medidas mais eficazes de controle, pois apenas a eliminação do reservatório vertebrado e o uso de inseticidas são insuficientes para um efetivo controle da doença (Saraiva *et al.*, 2012).

1.2.4.1 Controle dos Reservatórios

Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos da leishmaniose zoonótica por serem altamente suscetíveis à infecção, por albergarem

o parasita na pele e, principalmente, pelo convívio próximo ao homem (Dantas-Torres e Brandao-Filho, 2006). A infecção canina geralmente precede o aparecimento de casos humanos (Camargo-Neves *et al.*, 2001) sendo, ainda, mais prevalente que a infecção humana. Nas áreas endêmicas, a maioria dos cães já foi exposta ao parasita, é sororeagente mas não apresenta sinais clínicos, atuando porém como reservatórios e podendo infectar os flebotomíneos (Berrahal *et al.*, 1996; Moreno e Alvar, 2002). É estimado que a prevalência de cães assintomáticos sorogregentes seja de 67% (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Apesar das evidências de estudos experimentais mostrarem diminuição da incidência da LV em cães e crianças após triagem sorológica e eutanásia de cães soropositivos (Ashford *et al.*, 1998; Palatnik-De-Sousa, 2001), a eficiência, a aceitação e a ética de tal estratégia de controle são cada vez mais discutidas e contestadas (Courtenay *et al.*, 2002; Reithinger e Davies, 2002; Costa, 2011). Ainda em 1997, estudos realizados por Dietze (Dietze *et al.*, 1997) demonstraram que a eliminação dos cães soropositivos reduziu apenas temporariamente a força de transmissão entre os cães, sendo por isto considerada, já naquela época, medida insuficiente para o controle da LVC. Mais recentemente, em um estudo ao longo de 5 anos, a eliminação de mais de 80% dos cães soropositivos não reduziu a ocorrência da doença humana no distrito de Venda Nova em Belo Horizonte (Saraiva *et al.*, 2012).

1.2.4.2 Tratamento

O tratamento de cães infectados é largamente praticado na Europa com base nos antimoniais pentavalentes, incluindo o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio (Frezard *et al.*, 2009). No Brasil, o tratamento de cães com drogas de uso humano é legalmente proibido (Brasil, 2008). Apesar disso alguns protocolos já foram propostos (Ribeiro *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2012), mas não serão discutidos detalhadamente aqui. No Velho Mundo o tratamento dos cães é permitido. (Noli e Auxilia, 2005) revisaram os resultados de 47 ensaios clínicos com cães que deram embasamento para a recomendação do uso de antimoniato de meglumina (100 mg kg⁻¹/dia durante pelo menos 3-4 semanas) em conjunto com o alopurinol, a fim de se obter uma boa eficácia clínica e reduzir a taxa de recidiva. A avaliação dos artigos também forneceu evidências para recomendar o uso de pentamidina (4 mg kg⁻¹/duas vezes por semana) e aminosidina (5 mg kg⁻¹/duas vezes ao dia por 3-4 semanas). Entretanto, segundo (Baneth e

Shaw, 2002) que nenhum dos tratamentos é capaz de eliminar completamente os parasitas do organismo, e em animais mais imuno suscetíveis, mesmo que seja alcançada recuperação clínica temporária, a recidiva é esperada em semanas ou mesmo anos após o tratamento. Assim, os animais devem ser monitorados por meses e até anos antes de serem considerados permanentemente curados.

O tratamento tem a vantagem de diminuir a carga parasitária reduzindo a transmissão para os flebótomos (Miro *et al.*, 2011). (Otranto e Dantas-Torres, 2013) sugeriram um fluxograma com base no monitoramento clínico e sorológico e nos testes parasitológicos (**Figura 1.7**) para o manejo da doença canina.

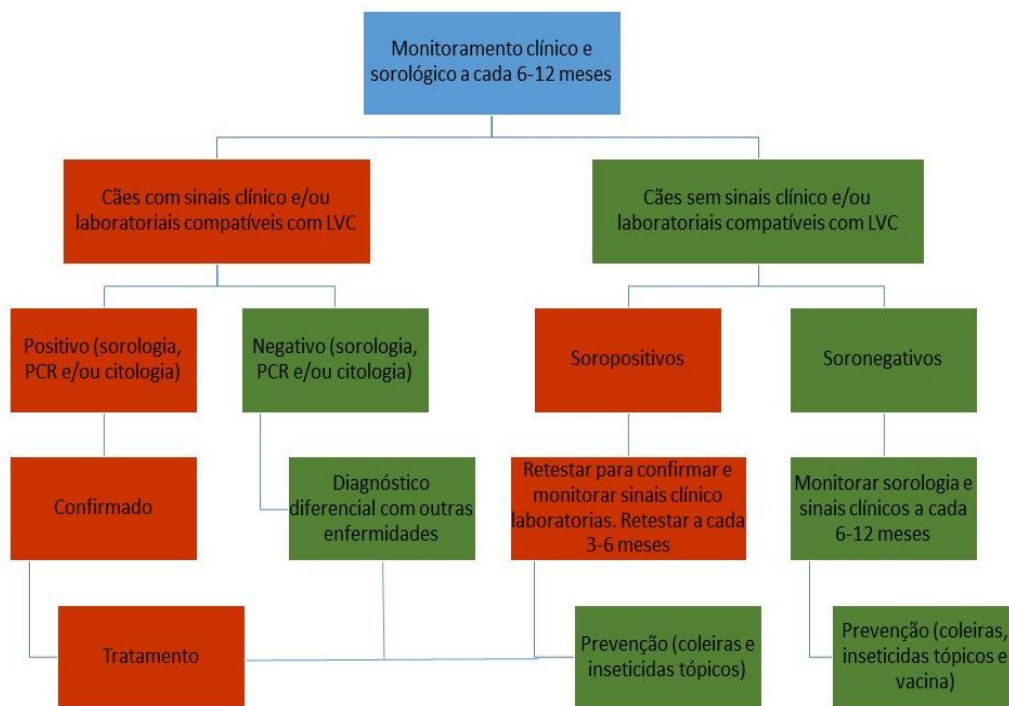


Figura 1.7 Manejo sugerido para o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (Adaptado de Otranto e Dantas-Torres, 2013. *Trends in Parasitology*, Vol. 29, No. 7).

A recidiva da doença canina ocorre com frequência (Miro *et al.*, 2008) fazendo com que haja necessidade de administração contínua dos medicamentos. As autoridades de Saúde Pública temem que o uso prolongado e generalizado de medicamentos para LVC possa selecionar cepas resistentes aos compostos antimoniais (Who, 2010), por isso a proibição no Brasil. A resistência aos antimoniais já foi documentada em várias regiões do Velho Mundo (Lira *et al.*, 1999; Hadighi *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2006). No Novo Mundo, há descrições de resistência da *L. infantum* em crianças (Velez *et al.*, 2009) e em adultos (Faraut-Gambarelli *et al.*, 1997) e já é uma preocupação crescente em na co-infecção HIV-LV (Peters *et al.*, 1990). A miltefosina é largamente usada na Europa para o tratamento de cães e há o risco iminente de que cepas resistentes apareçam no Novo Mundo, onde a droga é utilizada para tratamento humano em países como: Colômbia, Guatemala, Argentina, Venezuela, Paraguai, Equador e Honduras (Dujardin *et al.*, 2008). A resistência à anfotericina B ainda não foi documentada em pacientes imunocompetentes (Sereno *et al.*, 2000; Lachaud *et al.*, 2009), embora haja evidências clínicas em pacientes imunocomprometidos (Di Giorgio *et al.*, 1999). Na sua formulação lipossomal (AmBisome, Gilead Sciences, Inc.) é a melhor droga leishmanicida existente, mas o seu custo proibitivo limita o uso em regiões endêmicas (Laguna *et al.*, 2003; Sundar e Rai, 2005). No Brasil as drogas disponibilizadas pelo SUS para o tratamento da LVH são os antimoniais pentavalentes e anfotericina B e a permissão para o tratamento canino ainda é remota.

1.2.4.3 Vacinação

A vacinação de cães parece ser a melhor estratégia para o controle da doença canina. A primeira vacina desenvolvida para LVC é uma vacina de segunda geração, composta por glicoproteínas ligantes de fucose-manose (FML) purificadas a partir de promastigotas de *L. donovani*, utilizando a saponina como adjuvante. O antígeno, inicialmente isolado por Palatnik e colaboradores em 1989 (Palatnik *et al.*, 1989), se mostrou capaz de inibir a fagocitose de promastigotas por macrófagos peritoneais. Os estudos com cães mostram o perfil da resposta protetora e a segurança da vacina. Nesses estudos foi demonstrado que o antígeno tem a capacidade de induzir alterações fenotípicas precoces, tanto em neutrófilos como

em monócitos, de promover resposta seletiva, principalmente associada à ativação de células T CD8+, além de promover um padrão de resposta pró-inflamatória seletiva, caracterizada pela síntese de IFN γ e óxido nítrico (Araujo *et al.*, 2011).

A vacina confere resposta humoral tanto para o antígeno total como para o antígeno FML, porém com algumas diferenças entre os animais vacinados. O valor de absorvância IgG1/IgG2 no ELISA para antígeno total entre os vacinados foi 0,068 e para o FML foi 0,889, o que demonstra algum potencial para diferenciar os animais vacinados. Adicionalmente, os eventos adversos foram transientes e desapareceram antes da aplicação da dose consecutiva (Parra *et al.*, 2007). Nos estudos clínicos de fase III (Borja-Cabrera *et al.*, 2002) mostraram soropositividade e reação intradérmica em 100% dos animais dois meses após a vacinação e se mantendo ao longo de 3,5 anos. Foi mostrado que apenas um animal do grupo vacinado desenvolveu a doença fatal, o que corresponde a 95% de proteção com uma eficácia vacinal de 80%. No estudo conduzido por Da Silva (Da Silva *et al.*, 2000), que também comprova forte resposta humoral e celular de longa duração, apenas 8% dos animais vacinados mostraram sinais clínicos moderados enquanto que 33% do grupo controle desenvolveram a doença plena. A vacinação foi eficiente para promover negatividade nos exames parasitológicos de pele e sangue e ausência de sinais clínicos em 83% dos animais (De Amorim *et al.*, 2010). Interessante observar que o xenodiagnóstico também foi negativo, o que corrobora os resultados de Nogueira e colaboradores (Nogueira *et al.*, 2005), que sugeriram a capacidade de bloqueio de transmissão da vacina. O Ministério da Saúde ainda não reconhece esses resultados como discutido mais adiante. Mais importante do que o seu mecanismo de ação, em duas regiões endêmicas promoveu a redução de casos humanos ao longo de dois anos (Palatnik-De-Sousa *et al.*, 2009). Além disso, em testes de campo foi capaz de reduzir a incidência da infecção canina e a porcentagem de animais sobreviventes após dois anos foi significativamente maior (99% vs 61%) (Borja-Cabrera *et al.*, 2008), suportando o uso da vacina em regiões endêmicas.

Esta vacina baseada no antígeno FML é agora comercializada pela multinacional Fort Dodge Saúde Animal (EUA) com o nome comercial Leishmune®. Recentemente, em outubro de 2011 e após 22 anos da descrição do antígeno, a vacina FML recebeu o registro definitivo pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). No entanto, restam algumas questões para que a vacina seja recomendada como medida de controle da LVH. De acordo com o Ministério da

Saúde, ainda é necessário definir (i) a suscetibilidade à infecção nos cães vacinados; a capacidade do cão vacinado infectar o vetor *Lutzomya longipalpis*; (iii) o efeito da vacina sobre a capacidade de cães previamente infectados permanecerem como reservatórios e, ainda, (iv) comparar o perfil sorológico de cães naturalmente infectados com o perfil de cães vacinados. Nessa discussão, ganha importância a determinação de um biomarcador para infecção ou vacinação. Ainda não há distinção entre os níveis de IgG total ou de suas subclasses, IgG1 e IgG2, entre os cães vacinados com a vacina FML e os naturalmente infectados (Marcondes *et al.*, 2011). A soroconversão ocorre a partir de 21 dias após a vacinação e se mantém por seis meses. Desta forma, os órgãos de controle ainda recomendam que cães com sorologia positiva, mesmo que tenham sido vacinados, sejam eutanasiados.

A busca por marcadores de infecção e/ou resposta vacinal e o desenvolvimento de testes de diagnóstico com antígenos, capazes de distinguir a infecção da vacinação, são desejáveis do ponto de vista do controle da doença com a vacina e ainda representam uma lacuna a ser preenchida. Alguns avanços como o uso da citometria de fluxo com marcação específica para IgG de *L. infantum* têm sido desenvolvidos, com o intuito de discriminar a sororeatividade da infecção da sororeatividade da imunização (De Andrade *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2009). Entretanto, ainda não é possível atender à demanda da realidade do Sistema de Vigilância à doença.

A aplicabilidade do antígeno FML no diagnóstico também foi testada (Borja-Cabrera *et al.*, 2002). Do ponto de vista prático de controle da doença o uso desse antígeno em testes de diagnóstico pode ser um passo para a distinção, porém, embora já tenha sido descrito há algum tempo, seu uso ainda não é realidade no Sistema de Vigilância. Outro ponto que impacta a adoção desta vacina nos programas de controle da doença é o valor da imunização, em torno de R\$ 240,00 por animal, o que praticamente inviabiliza seu uso na Saúde Pública.

Uma segunda vacina disponível no mercado é a Leish-Tec®, classificada como vacina recombinante e produzida pelo Laboratório Hertape Calier Saúde Animal S.A., após acordo de transferência de tecnologia em 2003 com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). É composta por 0,10 mg da proteína recombinante A2, produzida a partir de plasmídeo inserido em *Escherichia coli*, e 0,50mg do adjuvante Saponina. A proteína A2 é exclusivamente expressa em amastigotas e é essencial para a sobrevivência da amastigota de *L. donovani* no

interior da célula hospedeira, tendo sido identificada como um fator de virulência desta forma do parasita (Zhang *et al.*, 1996; Zhang e Matlashewski, 1997). Seu potencial imunogênico foi demonstrado em camundongos que apresentaram proteção significativa no desafio com *L. donovani* (Ghosh *et al.*, 2001).

No Brasil, os estudos sobre as propriedades desse antígeno foram realizados na UFMG e, inicialmente, foram caracterizadas as propriedades imunogênicas da proteína recombinante A2. Os estudos de fase I mostraram que a imunização de camundongos BALB/c com a proteína A2 protege contra a infecção por *L. amazonensis* (Coelho *et al.*, 2003) e contra *L. infantum* (Zanin *et al.*, 2007). Para os estudos de fase II, o mesmo grupo testou esquema vacinal em cães Beagle, posteriormente desafiados com elevada carga parasitária (5×10^7 promastigotas *L. chagasi* / i.v.) (Fernandes *et al.*, 2008). Os animais vacinados apresentaram altos níveis de anticorpos anti-A2, especificamente IgG total e IgG2, altos níveis de IFN γ e baixos níveis de IL-10, antes e após o desafio. Um dado importante deste estudo é que os animais vacinados se mantiveram negativos nos exames sorológicos convencionais (usados oficialmente para o diagnóstico da doença canina), o que sugere seu grande potencial para aplicação a campo. Entretanto, talvez sejam necessários estudos com mais animais, já que este foi feito com vinte e um cães de uma mesma raça, além de estudos conduzidos por grupos de pesquisa diferentes, o que também não ocorreu com o antígeno FML. Atualmente o grupo detentor da patente da vacina está realizando os testes de fase III, cujos resultados serão fundamentais para a obtenção do seu registro definitivo e comprovação da redução da infecção na população. O potencial imunogênico da vacina baseada no antígeno A2 é incontestável, entretanto, como muitas vacinas, não confere imunidade estéril e previne apenas a doença. Em se tratando de *Leishmania*, um parasita que também se alberga na pele, a capacidade de bloqueio da transmissão deve ser avaliada com cuidado.

Alternativamente algumas vacinas podem ser utilizadas como auxiliar ao tratamento da LVC. Embora o Ministério da Saúde proíba o tratamento com drogas de uso humano, com base em uma possível seleção de resistência, o tratamento dos cães com alopurinol e imunomoduladores é uma realidade na clínica veterinária. Nesse contexto, as vacinas ganham um potencial imunoterapêutico quando associadas às drogas, sendo capazes de debelar não apenas os sintomas mas também a infecção latente, curando completamente os animais (Santos *et al.*, 2007). O potencial imunoterapêutico da vacina humana Leish-111f associada ao

Glucantime foi testada em cães doentes e se mostrou eficaz em cães com a doença moderada, porém ineficaz em cães com a doença grave (Trigo *et al.*, 2010).

Vale citar que há uma vacina de primeira geração, baseada no antígeno total de *Leishmania* associada ao adjuvante BCG, denominada Leishvaccine[®], que está disponível na Europa. Desencadeia alterações iniciais em neutrófilos e eosinófilos e tardia em monócitos, promove alterações fenotípicas em linfócitos T CD4+ e CD8+ e em linfócitos B, com um perfil misto de secreção de citocinas IFN γ /IL-4 em adição a altos níveis de IgG1 (Araujo *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2011).

Diante da grande discussão na sociedade, a comunidade científica tem o compromisso social de propor alternativas eticamente aceitáveis para bloquear o papel dos cães no ciclo de transmissão da leishmaniose. Com a liberação do registro definitivo, parece que o controle da doença canina por meio da vacinação está próximo, o que indica também uma boa perspectiva para o desenvolvimento de uma vacina humana.

1.3 Imunopatogênese na Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

O conhecimento prévio dos mecanismos imunopatogênicos associados a infecção por *L. infantum* é necessário para o desenvolvimento de vacinas e outras estratégias de controle da LVC.

A apresentação clínica da LV parece ser consequência da interação entre o parasita e a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro (Chamizo *et al.*, 2005). Assim, o resultado da infecção dependeria da habilidade do parasita de evadir as defesas não específicas do hospedeiro, de ser reconhecido e fagocitado e de sobreviver dentro do fagolisossomo dos macrófagos (Grimaldi e Tesh, 1993). Durante a interação parasita-hospedeiro, vias de sinalização complexas são acionadas pelo reconhecimento de moléculas-chave do parasita (Olivier *et al.*, 2005). Diferenças nos fatores de virulência entre as espécies são responsáveis pelas diferentes formas clínicas observadas nas leishmanioses (Mcmahon-Pratt e Alexander, 2004).

A imunidade protetora na leishmaniose é mediada pela resposta imune celular, enquanto a doença ativa é associada a uma forte resposta humoral com ausência de resposta celular (Mcmahon-Pratt e Alexander, 2004). O controle da infecção é complexo e o parasita é capaz de evadir respostas pró-oxidativas e

outros mecanismos efetores dos macrófagos impedindo a ativação de uma resposta imune eficaz (Gantt *et al.*, 2001; Olivier *et al.*, 2005).

Assim, as células T e as citocinas por elas produzidas exercem papel central na resposta imune (Pinelli *et al.*, 1999). Macrófagos parasitados, linfócitos, células dendríticas e células *natural killers* produzem citocinas que estão envolvidas com ambas as respostas inata e adaptativa ao parasita (Sacks e Sher, 2002). Células T CD4+ e CD8+ são importantes para a conter a doença visceral e estão envolvidas com a produção de IL-2, IFN γ e IL-12 (Goto e Prianti, 2009). Em contrapartida, ocorre proliferação intensa de linfócitos B e a produção de anticorpos é abundante, porém deletéria e não protetora (Almeida *et al.*, 2005a).

Na LVC a imunidade mediada por célula é capaz de controlar a infecção, e se correlaciona com a ausência de sintomatologia (Pinelli *et al.*, 1994; Solano-Gallego *et al.*, 2000; Santos-Gomes *et al.*, 2002), enquanto a falta desta resposta tem sido associada à presença de resposta humoral exacerbada permitindo a progressão da doença (Reis, Martins-Filho, *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010) (**Figura 1.8**). Ilustrativamente, o teste cutâneo positivo (reação de hipersensibilidade tardia) para *Leishmania* spp em cães é um bom indicador de resistência à infecção (Dos-Santos *et al.*, 2008; Falqueto *et al.*, 2009), podendo ser usado como fator prognóstico.

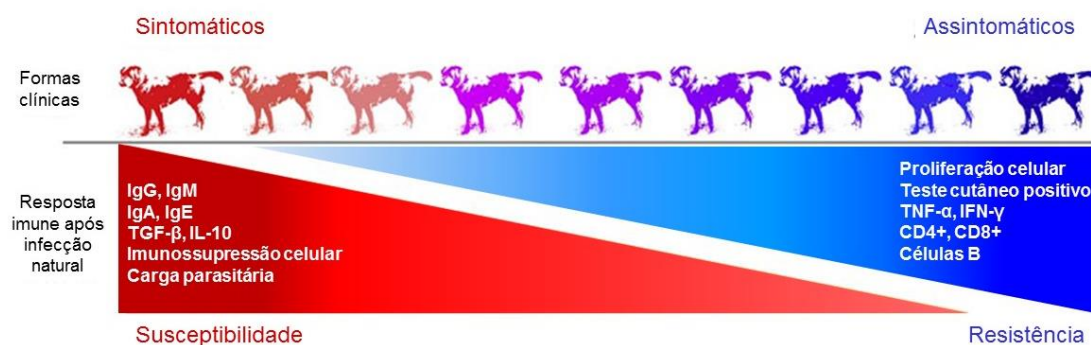


Figura 1.8 Mecanismos e marcadores de resistência e susceptibilidade na Leishmaniose Visceral Canina. (Adaptado de Reis *et al.*, 2010. *Trends in Parasitology*, Vol. 26, No. 7).

O padrão de resposta imunológica é bem estudado em murinos e em humanos, cujo paradigma Th1/Th2 está estabelecido. No modelo murino de leishmaniose, as células Th1 secretam IL-2, IFN γ e TNF α e estão associadas à resistência e ao controle da infecção, enquanto as células Th2 secretam IL-4, IL-10, IL-18 e são responsáveis pela susceptibilidade e progressão da doença (Reiner e Locksley, 1995; Boceta *et al.*, 2000; Gumy *et al.*, 2004). Na LVH, a resposta imune

Th2 é representada pela baixa síntese de IFN γ e pelo aumento dos níveis de IL-4. Além disso, a IL-10 tem sido indicada como uma das principais citocinas supressoras da resposta imune protetora, tanto em modelos murinos e como na LVH (Bacellar *et al.*, 2000; Ansari *et al.*, 2011).

Os mecanismos de resposta imune celular na infecção natural da leishmaniose canina são diferentes daqueles encontrados nos modelos aonde o paradigma clássico de resposta Th1/Th2 é associado à resistência ou à suscetibilidade (Panaro *et al.*, 2009). Apesar de não seguir o paradigma clássico, alguns estudos associam a infecção assintomática em cães com a ativação de células Th1 que produzem o IFN γ , IL-2 e TNF α (Pinelli *et al.*, 1994; Santos-Gomes *et al.*, 2002). Da mesma forma, o perfil de citocinas em cultura de células sanguíneas periféricas mononucleares (PBMC) de cães assintomáticos infectados experimentalmente com *L. infantum*, mostra resposta predominantemente Th1, mediada pela expressão de IL-2, IFN γ e IL-18, mas ausência de expressão de IL-4 (Chamizo *et al.*, 2005). Nessa via, os parasitos são mortos pelos macrófagos ativados por linfócitos produtores de IFN γ através de um mecanismo dependente de óxido nítrico (Vouldoukis *et al.*, 1996). No entanto há evidências de que o IFN γ aumenta nos estágios iniciais da infecção, mas não é suficiente para prevenir a doença (Travi *et al.*, 2009) e que os níveis aumentam como consequência da infecção, independente da sintomatologia clínica (Quinnell, Courtenay, Shaw, *et al.*, 2001).

Tanto os cães assintomáticos como os sintomáticos são capazes de produzir citocinas pertencentes a perfis Th1 e Th2, e estes perfis podem coexistir na LVC (Correa *et al.*, 2007). Assim, os estudos sobre a expressão de citocinas na LVC tem mostrado resultados conflitantes que podem estar relacionados à compartimentalização da resposta nos diferentes tecidos avaliados. Alves e colaboradores (Alves *et al.*, 2009) demonstraram a expressão gênica de IFN γ e TNF α em cães assintomáticos e IL-10 e TGF β em cães sintomáticos. A associação da carga parasitária com a evolução clínica da LVC e com a expressão gênica e síntese de determinadas citocinas, como IFN γ , IL-2, IL-6, IL-10 e IL-12 já foi demonstrada (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Barbieri, 2006; De Lima *et al.*, 2007; Lage *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2008). Outro estudo mostrou que o aumento de expressão gênica de IL-4 em células mononucleares do sangue periférico após seis meses de infecção foi quantitativamente semelhante em ambos os cães assintomáticos e sintomáticos (Manna *et al.*, 2006). Em cães sintomáticos infectados

por *L. infantum*, não foi identificada correlação entre o nível de TNF α no soro e a doença ativa (De Lima *et al.*, 2007).

Diferente das leishmanioses humana e murina, na LVC não há altos níveis de IL-10 nos tecidos e a expressão de IL-4 na medula óssea de cães infectados naturalmente, especialmente naqueles mais gravemente afetados, sugere uma associação entre a IL-4 e a doença (Quinnell, Courtenay, Shaw, *et al.*, 2001).

Por fim, não há dados conclusivos sobre os mecanismos imunológicos responsáveis pela resistência ou progressão da LVC e a detecção da síntese de citocinas e sua associação com a infecção por *L. infantum* ainda é controversa. Em revisão recente (Maia e Campino, 2012) foi apontado que o papel das subpopulações Th1 e Th2 nos diferentes tecidos é crucial para compreender o mecanismo imune induzido pela infecção. De fato, a resposta imune ao parasita não é idêntica em todo sistema hospedeiro, mas sim órgão-específica (Reis *et al.*, 2009). O fígado é o local de resolução da infecção aguda, apresenta dano mínimo ao tecido e resistência a reinfeção, ao passo que o baço torna-se um local de persistência do parasita como bem evidenciado em modelo murino de infecção (Stanley e Engwerda, 2007).

O baço está entre um dos principais órgãos afetados na LVC e é responsável, em grande parte, pela resposta imune à infecção, porém o conhecimento dos mecanismos imunopatológicos envolvidos é limitado, sendo a maioria dos estudos focados no modelo murino de infecção experimental. É um importante órgão linfóide secundário de grande volume com função primordial de responder aos patógenos sistêmicos (Mebius e Kraal, 2005). O tecido linfóide é altamente organizado e a desorganização da arquitetura esplênica em cães com LV tem sido associada à progressão da doença e à redução da expressão de diversas quimiocinas e seus receptores (Santana *et al.*, 2008). Os níveis de mRNA de uma grande variedade de citocinas (IFN γ , TNF α , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-18, TGF β), fatores de transcrição (Tbet e GATA3), e quimiocinas (IP-10, RANTES, MIP-1 α , MCP-1) foram avaliados no baço de cães infectados natural e experimentalmente (Correa *et al.*, 2007; Lage *et al.*, 2007; Strauss-Ayali *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013). Foi sugerido que durante a infecção por *L. infantum*, ocorre uma resposta mista Th1/Th2 no baço de cães oligossintomáticos e sintomáticos, insuficiente para controlar o parasita localmente. Os autores mostraram que a alta expressão de IFN γ no baço não eliminou os parasitos completamente, pois uma nova carga de parasitos,

proveniente de outros locais, onde o IFN γ não está elevado, é constantemente liberada no baço (Strauss-Ayali *et al.*, 2007).

Um dos órgãos mais relevantes envolvidos na interface parasita-hospedeiro durante a infecção por *L. infantum* é o compartimento hepático. Poucos estudos quantificaram a produção de citocinas e quimiocinas no fígado de cães infectados. Os níveis de mRNA de *ccl1*, *ccl17*, *ccl26*, *ccr3*, *ccr4*, *ccr5*, *ccr6* e *ccr8* foram maiores em cães assintomáticos (Nascimento *et al.*, 2013) assim como a síntese de IFN γ , IL-10 e TGF β 1 (Correa *et al.*, 2007). Por outro lado, parece que a infecção por si só provoca aumento na síntese de IL-4 e IL-10 no fígado, independente da sintomatologia com aumento de TNF α nos cães sintomáticos, o que não foi observada no baço. Além disso, a carga parasitária do fígado é menor do que no baço (Michelin *et al.*, 2011). Particularmente no fígado, a presença de granulomas em diferentes graus de amadurecimento em cães infectados é uma reação deste órgão para tentar controlar a proliferação de parasitas (Giunchetti *et al.*, 2008) e no modelo murino, o TNF α está envolvido na formação dos granulomas hepáticos (Stanley e Engwerda, 2007). A presença de granulomas também é observada na LVH (Geramizadeh *et al.*, 2011) e na LVC.

1.4 Diversidade Genética do Parasita

As manifestações clínicas dependem de parâmetros multifatoriais, como a resposta imune do hospedeiro, o *background* genético do parasita e, possivelmente, de fatores relacionados ao vetor. A natureza do agente patogênico, as espécies, mas também em particular as variações infraespecíficas, podem ser um fator. O genoma da *Leishmania* é relativamente pequeno, com aproximadamente 50.000 kb e é diplóide na maioria dos *loci* (Grimaldi e Tesh, 1993). As várias espécies contêm de 25 a 30 cromossomos e a análise do cariótipo mostra que o genoma é rico em polimorfismos e tem alto grau de plasticidade (Pagès *et al.*, 1989; Bastien *et al.*, 1990). Embora diversos estudos demonstrem a presença de vários zimodemas de *L. infantum* associados à LVC e LVH nas regiões do Velho Mundo (Gramiccia e Gradoni, 2005), a análise de cepas isoladas em diversas regiões das Américas indica uma homogeneidade na população de *L. infantum* circulante, com a infecção associada sempre ao mesmo zimodema (IOC/Z 1=MON1). Apesar da *L. infantum* ser a única espécie causadora da LV no Brasil, diferenças genéticas

intraespecíficas, polimorfismos, presença de pseudogenes e a expressão de genes de virulência e de resposta oxidativa podem contribuir para diferenças na patologia da doença e, por conseguinte, na evolução clínica (Mccall *et al.*, 2013). De fato, alguns trabalhos em modelos experimentais demonstram claramente diferenças importantes na virulência de clones de *L. infantum* (Garin *et al.*, 2001; Mendez *et al.*, 2001) e entre isolados de parasitos pertencentes ao mesmo zimodema (Baptista-Fernandes *et al.*, 2007) e isto provavelmente se deve a interações entre o parasita e seus hospedeiros, reservatórios naturais e principalmente os vetores.

Os estudos de epidemiologia molecular tem se concentrado no desenvolvimento e avaliação de marcadores úteis na diferenciação dos parasitos e, eventualmente, na investigação do polimorfismo genético de populações naturais do parasita, visando correlacionar os diferentes grupos genéticos com características clínicas e/ou epidemiológicas da doença (Schriefer *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2005; Rotureau *et al.*, 2006). Várias abordagens já foram tentadas com o objetivo de tipificar os diferentes genótipos como o uso de “restriction fragment polymorphisms” (RFLPs) (Tojal Da Silva *et al.*, 2006) e de sequenciamento de espaçadores transcritos internos (“internal transcribed spacers”) (Cupolillo *et al.*, 2003). No entanto, com a análise de microsatélites é possível identificar diferentes genótipos dentro do mesmo zimodema (Ochsenreither e Katrin, 2006; Oddone *et al.*, 2009).

Os microsatélites representam uma classe de marcadores genéticos que permitem a genotipagem analisando múltiplos *loci* (“multilocus genotyping”, MLMT). São repetições curtas de 2 a 6 nucleotídeos organizados em “tandem” no genoma. Estas sequências são abundantes, ubíquas, hipervariáveis e co-dominantes, o que faz com que estes marcadores sejam bastante informativos em estudos genéticos, filogenéticos e populacionais (Bulle *et al.*, 2002) tendo sido aplicado em diversas espécies (Ajzenberg *et al.*, 2010; Bruce *et al.*, 2011; Conrad *et al.*, 2011). Devido à sua elevada taxa de mutação, podem ser utilizados em conjunto como marcadores espécie-específicos (Montoya *et al.*, 2007). O genoma de *Leishmania* é relativamente rico em microsatélites (Rossi *et al.*, 1994) o que favorece o uso deste marcador. Conjuntos de marcadores de microsatélites, desenvolvidos para o complexo *L. donovani* (Jamjoom *et al.*, 2004; Kuhls *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2007; Kuhls *et al.*, 2008) bem como para outras espécies de *Leishmania* (*Leishmania*) (Al-Jawabreh *et al.*, 2008) e *Leishmania* (*Viannia*) (Oddone *et al.*, 2009; Rougeron *et al.*, 2009), são altamente sensíveis para avaliar a variação genética em nível intra-zimodemas (Russell *et al.*, 1999). Especificamente em relação à *L.*

infantum já foram propostos painéis de marcadores para sua identificação (Ochsenreither e Katrin, 2006; Reale *et al.*, 2010).

De fato, a análise multilocus dos microsátélites parece ser uma ferramenta útil na avaliação da estrutura populacional do gênero *Leishmania*, elucidando aspectos epidemiológicos. Estudos baseados em microssatélites com cepas de *L. infantum* do Novo Mundo indicaram a existência de duas populações principais; uma população com cepas do zimodema MON-1 provenientes do Paraguai, Brasil, Colômbia e Honduras, e outra população com cepas do zimodema não-MON-1 provenientes da Venezuela, Panamá, Costa Rica e Honduras (Kuhls *et al.*, 2011). A análise conjunta de cepas no Novo e Velho Mundo revelou que as cepas do Novo Mundo se assemelham àquelas provenientes de Portugal e Espanha, mostrando a origem dessas cepas MON-1 do Novo Mundo (Leblois *et al.*, 2011). Recentemente foi mostrado que em diferentes regiões endêmicas brasileiras há três populações genéticas circulantes tanto em humanos como em cães (Ferreira *et al.*, 2012). A população 1 está largamente distribuída e presente na maioria das regiões endêmicas, a população 2 com boa distribuição mas predominante no estado do Mato Grosso, e a população 3, a menos dispersa, sendo observada essencialmente no Mato Grosso do Sul. Esses achados (Ferreira *et al.*, 2012) puderam correlacionar a dispersão das cepas com a interferência humana e inferir sobre a possível associação da população 3 com a participação do vetor *Lu. cruzi* no ciclo de transmissão. Adicionalmente, a análise de 53 isolados provenientes de cinco estados brasileiros com um conjunto de sete marcadores revelou 18 genótipos sem detectar, no entanto, correlação com a origem geográfica ou com a estrutura populacional estimada (Segatto *et al.*, 2012). A totalidade desses estudos foi feita com cepas isoladas de amostras humanas ou caninas.

O isolamento *in vitro* do parasita é um gargalo, uma vez que apenas em uma baixa porcentagem das amostras clínicas é bem sucedido. Além disso, o microambiente *in vitro* é uma variável a ser considerada. Assim, a genotipagem diretamente da amostra clínica sem a necessidade de cultivo do parasita abre grande perspectiva neste campo (Bulle *et al.*, 2002; Ochsenreither e Katrin, 2006; Kuhls *et al.*, 2007). As análises de 17 marcadores de microsátélites em amostras clínicas de cães em São Paulo deram suporte a hipótese de que a LVC tenha sido introduzida pela região Noroeste do estado através do tráfego de pessoas e animais provenientes do Mato Grosso do Sul. Já na região Sudeste de SP, é encontrada uma outra população do parasita provavelmente proveniente de outras regiões do

país ou de outros países (Motoie *et al.*, 2013). No entanto, o papel dessas cepas na infecção canina ainda não foi elucidado.

O conhecimento sobre a resposta imunológica de cães naturalmente infectados com diferentes cepas de *L. infantum* pode contribuir para o prognóstico da doença, evitando assim a retirada desnecessária de cães sorologicamente positivos, ou mesmo, para o direcionamento de medidas de controle profiláticas.

Esse conjunto de dados nos levaram a pensar na hipótese de que diferentes populações de *L. infantum* têm relação com a resposta imune e com a apresentação clínica de cães com LV.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Estudar a correlação entre a expressão clínica, a carga parasitária, a resposta imunológica do hospedeiro e a diversidade genética dos parasitos em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e avaliar o padrão de infecção dos parasitas geneticamente.

2.2 *Objetivos Específicos*

- a. Classificar clinicamente os animais provenientes de área endêmica de Leishmaniose Visceral utilizando dois métodos de avaliação, qualitativo e semi-quantitativo;
- b. Realizar exames parasitológicos, sorológicos e moleculares para confirmação da infecção e da etiologia da doença e avaliar a concordância entre os testes;
- c. Determinar a carga parasitária no fígado e baço por qPCR em animais provenientes de áreas endêmicas e correlacionar com a apresentação clínica;
- d. Avaliar a resposta imune humoral nos cães infectados por *L. infantum* correlacionando-a com a apresentação clínica e com a carga parasitária;
- e. Descrever as alterações histopatológicas induzidas pela infecção no fígado e baço;
- f. Descrever os níveis de expressão gênica de citocinas no fígado e baço em animais provenientes de áreas endêmicas de LV;
- g. Caracterizar as populações e genótipos de *L. infantum* diretamente do tecido do cão infectado bem como dos isolados por análise do polimorfismo de microssatélites;
- h. Avaliar o padrão de infecção dos parasitas geneticamente distintos em linhagem macrófagos caninos (DH82).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Desenho do Estudo*

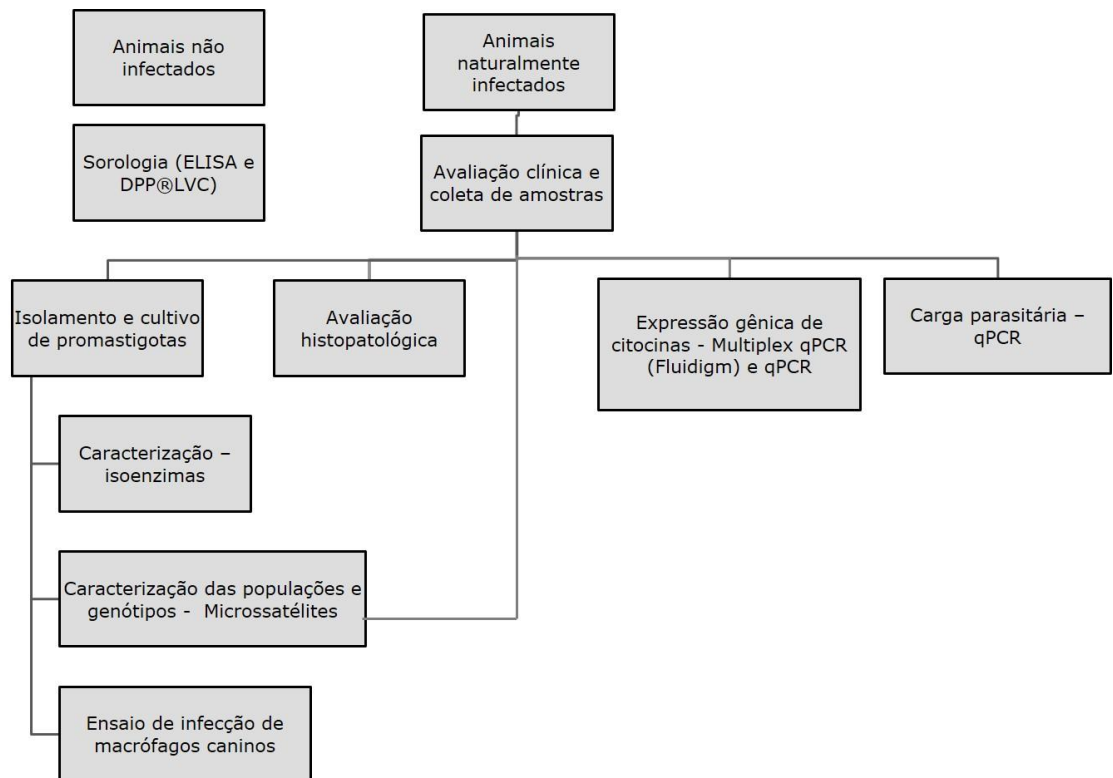


Figura 3.1 Desenho experimental do estudo

3.2 *Animais e Avaliação Clínica*

Foi realizada uma amostragem de conveniência, em que 92 cães sem raça definida com títulos de anticorpos IgG anti-*Leishmania* maior do que 1:40 na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foram incluídos no estudo. Os animais infectados foram destinados à eutanásia após consentimento por escrito do proprietário durante o processo periódico que ocorre em função dos serviços de vigilância epidemiológica da LV. A eutanásia foi realizada nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) de quatro municípios endêmicos (Rondonópolis, Barra do Garças, Várzea Grande e Cuiabá), em Mato Grosso, Brasil. A Comissão de Ética para o Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ) declarou a

não necessidade de aprovação para o uso de amostras coletadas de animais submetidos à eutanásia (**ANEXO I**). O critério de inclusão foi a sorologia positiva para infecção por leishmania. As amostras de sangue foram coletadas antes do procedimento de eutanásia e as amostras de tecido foram coletadas após a confirmação da morte do animal, durante a necrópsia. Todas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro/RJ) para as análises que seguiram. A infecção foi confirmada em todos os cães RIFI-positivos por dois testes sorológicos adicionais: o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste rápido *Dual Path Platform* (DPP®CVL, BioManguinhos, FIOCRUZ) e/ou pela detecção de parasitos através da cultura e/ou PCR convencional (mkDNA). A etiologia da infecção foi confirmada por eletroforese de enzimas multilocus (MLEE) em todas as cepas isoladas pelo Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (TRNTL/IOC) e as cepas estão depositadas com acesso aberto na Coleção de Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC, <http://clioc.fiocruz.br>). Para análise da resposta humoral amostras de soro de 15 cães não infectados de área não-endêmica (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Patologia Clínica do Instituto Jorge Vaitsman de Medicina Veterinária (RJ) foram incluídas como grupo controle.

Imediatamente antes da eutanásia foi realizada avaliação clínica por dois médicos veterinários de acordo com uma escala semi-quantitativa adaptada de Quinnell e colaboradores (Quinnell, Courtenay, Shaw, *et al.*, 2001) e os dados anotados em uma ficha de registro. Assim, seis sinais comuns da LVC (dermatite, onicogribose, conjuntivite, emagrecimento, alopecia e linfadenopatia) foram avaliados de acordo com a intensidade de 0 (ausente) a 3 (intenso) e a soma dos valores foi utilizada para atingir o escore clínico final, onde 0-2 foi considerada baixo, 3-6 médio e 7-18 elevado. Uma segunda abordagem foi realizada para classificar os mesmos animais de acordo com metodologia qualitativa em que foram considerados assintomáticos aqueles que não apresentavam nenhum sinal clínico e os demais foram considerados sintomáticos.

3.3 Coleta e Armazenamento de Amostras

Amostras de sangue foram coletadas da veia cefálica, o soro foi separado por centrifugação e armazenado a -20 °C. As amostras de soro dos cães controle foram coletadas na rotina da clínica veterinária do Instituto Jorge Vaitsman. Para a coleta dos tecidos, os cães foram anestesiados com injeção intravenosa de 1,0 ml / kg de tiopental 1,0% (Thiopentax ®, Cristália). Uma vez observada a ausência de reflexo corneal e interdigital, induzidos por anestesia profunda, foram administrados 10,0 ml de Cloreto de Potássio 19,1% (Isofarma) por via intravenosa. Imediatamente após a eutanásia, fragmentos de baço e fígado foram coletados e armazenadas em solução tampão (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris HCl) para extração de DNA e em solução RNAlater® (Ambion, Applied Biosystems, Life Technologies Corporation) para extração de RNA, ambos transportados a 4 °C e estocados a -70 °C. Um terceiro fragmento de cada tecido foi fixado em solução formalina tamponada 10% para histologia. Para o isolamento do parasita, foram realizados dois aspirados com agulha de cada órgão, a saber medula óssea, fígado e baço e os aspirados foram semeados em tubo cônico estéril contendo meio bifásico NNN - Schneider *Drosophila* (Sigma-Aldrich, USA). Em um animais foi coletada amostra do fluido ascítico e semeado no meio bifásico.

3.4 Sorologia

A RIFI foi executada pelo Laboratório Central (LACEN/MS) localizado em Cuiabá (MT) como teste de triagem dos animais.

A soropositividade foi confirmada no local de coleta das amostras pelo teste imunocromatográfico DPP®CVL (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Este teste imunocromatográfico é um dispositivo pronto para uso que consiste em um cassete plástico contendo duas tiras de nitrocelulose conectadas por um dispositivo em forma de “T” que permite a chegada independente da amostra teste e do reagente de detecção dos anticorpos. O teste pode ser realizado com 5 µL de sangue fresco, soro ou plasma. No local de coleta das amostras o teste foi realizado com sangue e no laboratório foi repetido co soro. Duas gotas do tampão fornecido pelo fabricante foram adicionadas após a adição da amostra, assim, a amostra diluída migra em direção à segunda tira de nitrocelulose que contém os antígenos para detecção dos anticorpos. Em seguida

foram adicionados quatro gotas do tampão em outro ponto do dispositivo (indicado pelo fabricante). A adição deste tampão permite que as partículas coloidais secas migrem para a área do teste. As partículas reagem com o complexo antígeno-anticorpo formado gerando uma reação colorimétrica que permite a visualização de uma banda nos testes positivos (**Figura 3.2A**). Na ausência de anticorpos específicos, não é observada a formação da banda teste (**Figura 3.2B**). Como as partículas continuam migrando, uma segunda banda similar deve ser vista na área de controle do dispositivo, servindo como uma validação do teste. Caso essa segunda banda (controle) não seja observada o teste deve ser descartado (**Figura 3.2C**). No local de coleta das a leitura foi visual, realizada cinco minutos após a adição do tampão. Posteriormente, no Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (FIOCRUZ/RJ), a fim de quantificar os valores de reflectância, os ensaios do DPP®CVL foram repetidos com o soro dos animais. A leitura foi realizada no equipamento Leitor de Testes Rápidos (M-Bio Engenharia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná).

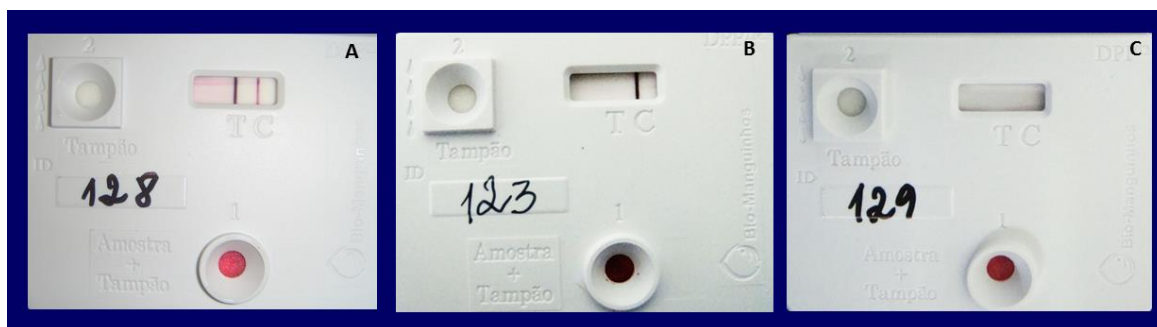


Figura 3.2 Teste imunocromatográfico rápido DPP®CVL (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) utilizado para triagem sorológica da Leishmaniose Visceral Canina. (A) Teste positivo apresentando coloração nas bandas T e C; (B) Teste negativo apresentando coloração apenas na banda C e (C) Teste inválido não apresentando coloração na banda T. Banda teste T e controle C.

No Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (FIOCRUZ/RJ), foi realizado o ELISA com o *kit* EIE - Leishmaniose Visceral Canina® (BioManguinhos, FIOCRUZ), com pequenas adaptações, para a detecção das imunoglobulinas IgG e IgM. Resumidamente, placas de 96 poços pré-sensibilizadas (EIE-LVC®) com antígeno solúvel de *Leishmania* foram incubadas com soros diluídos (1:10) à temperatura ambiente durante 2 horas. A seguir foram realizadas três lavagens com solução tampão para lavagem (tween20 0,1% diluído em PBS 1X) para remover anticorpos não ligados. As placas foram então incubadas à temperatura ambiente, protegidas da luz, durante 1 hora com 100 µL/poço de IgG (1:3000, Bethyl Laboratories) ou IgM (1:1000, Bethyl Laboratories) diluídos em tampão (PBS 1X, BSA 0,1% e tween20

0,05%). Após esse período foram realizados seis ciclos de lavagem e 15 minutos de incubação com PBS 1X. Os complexos imunológicos foram revelados pela adição de 100 µl de substrato de peróxido estabilizado e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina hidrogênio (TMB Substrato azul-cromogenio®, Dako) durante 15 minutos. A reação foi terminada com a adição de 50 µl de H₂SO₄ 2M. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em leitor de absorvância (Spectra Max 190, Molecular Devices) com pico de 450 nm. O limite inferior de positividade (corte) foi determinado usando o valor da média mais 3 desvios-padrão dos soros controle. Amostras com valores de DO iguais ou maiores do que o valor de corte foram considerados positivos e valores de DO abaixo do valor de corte considerados negativos.

3.5 Diagnóstico Molecular (PCR e PCR-RFLP)

O DNA total foi extraído a partir de 28 a 33 mg de tecido utilizando-se o *kit* de extração Wizard® *Genomic DNA Purification System* (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA total foi dissolvido em 100 µl de tampão tris-EDTA (TE). Iniciadores direcionados para a amplificação de um fragmento de 120 pb do minicírculo do cinetoplasto (mkDNA) e para a amplificação de um fragmento de 1.400 pb da região altamente conservada de proteínas do choque térmico de 70 kDa (hsp70), foram utilizados para o diagnóstico molecular (**Tabela 3.1**). A reação de amplificação do mkDNA foi realizada em volume final de 25,0 µl contendo *beads* (Ready-to-go PCR beads, GE Life Sciences, Uppsala, Sweden), 0,5 pmol de cada iniciador e 2,0 µl de DNA total (50 ng a 4000ng). A reação de amplificação do hsp70 foi realizada em volume final de 25,0 µl contendo tampão de reação 1X, 2,5 mM de dNTP, 25,0 µM de MgCl₂, 20 pmol de cada iniciador e 2 unidades de Taq polimerase (GoTaq® DNA Polymerase; Promega, Madison, WI, USA). O ciclo térmico para PCR-mkDNA foi de 95 °C / 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C / 40 s, 60 °C / 30 s e 72 °C / 10 s e para PCR-hsp70 94 °C / 5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C / 30 s, 63 °C / 1 min e 72 °C / 10 s. Ambos com extensão final de 72 °C / 10 min. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% (Acilamida, Sigma / bis-acrilamida, Sigma / Base Tris, BioRad / Ácido bórico, Sigma / EDTA, Sigma), corado com brometo de etídio (HS041, Molecular Biology Grade, USA). Os produtos da PCR-hsp70 foram, em seguida, digeridos com as enzimas de restrição HaeIII e os fragmentos analisados por electroforese em gel de poliacrilamida 4% corado pela

prata (DNA Silver Staining, GE Healthcare), conforme descrito previamente (Da Silva *et al.*, 2010).

3.6 Determinação da Carga Parasitária por qPCR

Iniciadores direcionados para a amplificação da subunidade 18S do RNA ribossomal de *Leishmania* sp. (ssrRNA) e o gene constitutivo de cão hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT) foram utilizados para determinar a carga parasitária e para normalizar o número de células na amostra, respectivamente (**Tabela 3.1**). Curvas padrão com diluição seriada do DNA de promastigotas de *Leishmania* e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de cão foram construídas. As contagens de PBMC de cães não infectados e das promastigotas de *L. infantum* IOC/L3033 (MCAN/BR/2007/CG-1) foram determinadas utilizando-se um contador de células (Coulter Z1™®, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). O DNA total foi extraído a partir de $1,0 \times 10^6$ células PBMC e de $1,0 \times 10^7$ promastigotas. As curvas foram preparadas usando diluições seriadas de 10 vezes do DNA total purificado a partir de $1,0 \times 10^{-2}$ a $1,0 \times 10^7$.

O DNA total purificado (100 ng) foi adicionado a um volume final de 20,0 µL contendo 10,0 µL Power SYBR Green Master Mix 1X (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.), 300 nM de cada iniciador para HPRT ou 500 nM para ssrRNA e água livre de nucleases. As reações foram realizadas no equipamento StepOne® (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.) com temperatura de ativação de 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos a 95 °C / 15 s, 60 °C / 1 min e 68 °C / 30 s. Uma curva de dissociação (95 °C / 15 s, 60 °C / 1 min e 95 °C / 15 s) foi realizada para avaliação de amplificação inespecífica. Todas as reações foram feitas em duplicata para cada alvo e ambos os alvos foram executados em poços diferentes (monoplex) na mesma placa para a mesma amostra.

Tabela 3.1 Genes alvos e desenho dos iniciadores para DNA.

Gene alvo	Número de acesso ou Referência		Sequência (5'- 3')	Tamanho (pb)
HPRT	NW_003726126.1	S	AAAACAATGCAGACTTTGCT	58
		AS	CCTTGACCATCTTTGGATTA	
ssrRNA	Prina et al. (2007)	S	TACTGGGGCGTCAGAG	153
		AS	GGGTGTCATCGTTTGC	
kDNA	Volpini et al (2004)	S	GGGGAGCGTGGGTCTGCGAA	152
		AS	GGCCCACTATATTACACCAACCCC	
hsp70	Da Graça et al. (2011)	S	GGACGAGATCGAGCGCATGGT	234
		AS	TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG	

S, senso; AS, anti-senso, pb, pares de bases.

3.7 Análise Histopatológica

Os fragmentos de tecido foram fixados em formalina tamponada 10%, embebidos em parafina, cortados com espessura de 5µm e montados em Lâminas de vidro. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e examinados por microscopia (Nikon Eclipse E400 Tokyo, Japan).

As alterações histológicas do tecido esplênico, as populações celulares na polpa vermelha e a carga parasitária foram analisadas como descrito (Santana *et al.*, 2008). Os parâmetros analisados incluíram periesplenite (ausência, baixa, média ou alta), presença de granulomas e grau de organização da polpa branca (1- bem organizada: com a bainha de linfócitos periarteriolar distinta, centro germinativo e zona marginal; 2- levemente desorganizada: com alterações hiperplásicas e hipoplásicas levando à indefinição das regiões da polpa branca; 3 - moderadamente desorganizada: polpa branca ainda evidente, mas as regiões pouco individualizadas ou indistinguíveis e 4- extensivamente desorganizada: estrutura folicular indistinguível). A frequência de linfoblastos, macrófagos, neutrófilos e plasmócitos na polpa vermelha foi classificada como baixa, média ou alta. A quantidade de amastigotas foi estimada pela contagem de 40 a 100 campos (aumento de 1000X) por corte igualmente distribuídos entre o compartimento subcapsular e a polpa vermelha. Os resultados foram expressos como a razão entre campos com amastigotas/total de campos avaliados.

No tecido hepático, o grau de degeneração e o infiltrado inflamatório no espaço porta e no parênquima foram avaliados em uma escala semi-quantitativa atribuindo as condições: ausente, 1+, 2+, 3+ e 4+. A avaliação dos granulomas considerou a presença ou ausência e o número de granulomas por campo foi

estimado semi-quantitativamente: ausente, 1, 2, 3, 4. A presença ou ausência de amastigotas por campo, foi realizada pela observação de 20 campos (aumento de 1000X) por corte. Os resultados foram expressos como a razão entre campos com amastigotas/total de campos avaliados.

3.8 Extração do RNA e Quantificação da Expressão Gênica de Citocinas por qRT-PCR

O RNA total foi extraído dos tecidos, pelo método Trizol® (Invitrogen, Grand Island, NY) e tratado com DNA-free DNase® (Ambion, Grand Island, NY), de acordo com protocolo dos fabricantes. A integridade do RNA foi acessada em gel desnaturante de agarose a 1,2% com formamida, corado com SYBR Nucleic Acid Gel Stain® (Molecular Probes, Invitrogen Corp). O RNA foi quantificado pelo espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA). A transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1,0 µg de RNA, utilizando o sistema ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) com iniciadores oligo (d)T conforme protocolo do fabricante e incluindo a etapa de inibição de ribonucleases (Recombinant RNasin®, Promega). As reações de transcrição foram feitas em duplicata com volume final de 20 µL e ao final, o cDNA foi diluído (1:4) com a adição de 80 µL de água livre de nucleases. Como controle de contaminação de DNA genômico, uma reação sem a enzima transcriptase reversa (no-RT) foi realizada para cada amostra para os genes constitutivos.

As reações de qPCR foram realizadas utilizando o sistema de detecção Power Sybr Green Master MIX® (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc) no equipamento Step One (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc). Foram preparadas reações com volume final de 20 µL contendo 300 nM de iniciadores, 10 µL de SYBR 1X e 4µL de cDNA. O ciclo térmico consistiu em uma etapa de ativação a 95 °C / 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C / 10 s e anelamento/extensão a 58 °C / 1 min. Uma curva de dissociação (95 °C / 15 s, 60 °C / 1 min e 95 °C / 15 s) foi realizada para avaliação de amplificação inespecífica. A quantificação relativa dos genes alvo foi normalizada em relação à expressão dos genes constitutivos, HPRT e proteína ribossomal 32 (RP32) (**Tabela 3.2**). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Tabela 3.2 Genes alvos e desenho dos iniciadores para cDNA. S, senso; AS, anti-senso, pb, pares de bases.

Gene alvo	Número de acesso		Sequência (5'- 3')	Tamanho (pb)
IL-10	NM_001003077.1	S	GAGAGAAGCTCAAGACCCTCAG	118
		AS	TGGAGCTTACTAAATGCGCTCT	
TNF α	NM_001003244.4	S	CAAATGGCCTCCAATAATCA	100
		AS	TCGGGGTTTGTACAACAT	
IL-6	NM_001003301.1	S	TCCAGAACAATATGAGGGTGA	100
		AS	TCCTGATTCTTTACCTTGCTCTT	
TGF β	NM_0010033309.1	S	CTGGAGTCGTGAGGCAGTG	96
		AS	GCAGTGTGTTATCTTTGCTGTCA	
IFN γ	NM_001003174.1	S	CCAGATCATTCAAAGGAGCA	116
		AS	CGTTCACAGGAATTTGAATCAG	
IL-12p40	NM_001003292.1	S	TGGAGGTCAGCTGGGAATAC	120
		AS	CCACGCAGAGTATATCTTTCTTT	
IL-27	XM_844736.2	S	CTGAGAAGATGCACCTGTGG	145
		AS	CCTTTCCTCTCCTCATGCTG	
GADPH	XM_003434387.2	S	CCAGGTGGTCTCCTGTGACT	103
		AS	CCAGGAAATGAGCTTGACAAA	
RP32	NM_001252169.1	S	ATGCCCAACATTGGTTATGG	181
		AS	CTCTTCCACGATGGCTTTG	
HPRT	NM_001003357.1	S	CCAGTCAACAGGGGACATAAA	128
		AS	TGACCAAGGAAAGCAAAGTC	

3.9 Ensaio Multiplex de Quantificação da Expressão Gênica de Citocinas

A fim de testar diferentes genes, foi utilizado um “chip” de 96x96 Fluidigm® (BioMark™ HD System, San Francisco, CA, USA) que permite testar em uma única reação 96 genes em 96 amostras. O cDNA (equivalente a 100ng de RNA) de cada amostra foi pré-amplificado com uma mistura dos iniciadores dos genes alvo (**ANEXO II**) em um termociclador convencional. Cada reação foi realizada com mistura de pré-amplificação TaqMan® (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA), 200 nM de cada iniciador e 1,25 μ l do cDNA de cada amostra totalizando volume final de de 5 μ l. O ciclo térmico da pré-amplificação consistiu em 95 °C / 10 min seguido de 15 ciclos de 95 °C / 15 s e 59 °C / 4 min. O cDNA pré-amplificado foi diluído a 1:5 em TE, aplicado no *chip* e colocado no equipamento Fluidigm IFC Controller HX. Paralelamente foi preparada uma mistura de Taqman Gene Expression Master mix Evagreen I (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) com os iniciadores separadamente. Em seguida os iniciadores misturados ao mix

foram amplicados no *chip*. A reação de amplificação foi realizada no sistema de microfluídica BioMark.

3.10 Microssatélites

A análise de polimorfismo de *L. infantum* foi realizada em um total de 92 DNA provenientes de amostras clínicas e 55 de cepas isoladas. Foram adicionadas às análises 173 cepas de *L. infantum* isoladas de diferentes hospedeiros analisadas anteriormente por nosso grupo (Ferreira *et al.*, 2012). As promastigotas isoladas das amostras dos cães foram cultivadas a 25°C em meio Schneider-*Drosophila*, suplementado com 10% de SFB e 1,8% de penicilina, estreptomicina e anfotericina (Sigma-Aldrich). Na fase *log* de crescimento os parasitos foram colhidos, lavados duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (pH 7,2) a 4000 rpm / 10 min / 5 °C. A massa de parasitos foi utilizada para extração de DNA utilizando-se o *kit* de extração Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega). A cepa de referência de *L. infantum* IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75) foi utilizada como controle positivo nos ensaios.

Para a amplificação das regiões de microssatélites foram utilizados iniciadores conjugados com fluoróforos 6FAM ou HEX (**Tabela 3.3**). As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25,0 µl contendo tampão de reação 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTP, 2 unidades de Taq polimerase (GoTaq®, DNA Polymerase; Promega) e 100 ng de DNA. O ciclo térmico foi realizado no equipamento Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA/US) e consistiu em uma etapa inicial de desnaturação de 95 °C / 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C / 30 s, TA / 30 s e 72 °C / 1 min com extensão final de 72 °C / 10 min. O produto de PCR (1,0 µL) foi misturado a formamida (Hi-Di™ Formamide, Life Technologies) e ao marcador de peso molecular (GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard, Life Technologies) e foi separado por eletroforese capilar no equipamento ABI3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na Plataforma de Análise do Instituto Oswaldo Cruz (Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA - PDTIS / FIOCRUZ RPT01A). Os picos foram analisados no programa Peak Scanner™ Software v1.0 (disponível em <http://www.appliedbiosystems.com>). Os resultados foram padronizados baseados na cepa de referência IOC/L0579.

Tabela 3.3 Informação descritiva dos 14 marcadores de microssatélites utilizados. TA, temperatura de anelamento; pb, pares de bases

Marcador	Senso (5'-3')	Anti-senso (5'-3')	TA	Repetição	pb
Li22-35 (E)	CTTGATGTTTCGGGTTAGCAAGT	ATGCACACCAAAAATCATGTG	52	CA	92/100
Li23-41 (F)	GATCGGAGGTGACAGCGT	CCTTTAACTGCCAGTGCG	52	GT	77/87
Li41-56 (B)	TTGCTTCATGATAACAACCTTG	CCTGTTGGTGTGAGTTCGTG	50	CA	90/92
Li45-24 (G)	GCGCCTACAGGCATAAAGGA	CTGGCGCATCAACGGTGT	54	CA	81/107
Li46-67 (C)	TCTTCTTTTCGTTAGCTGAGTGC	CTGTATCACCCATGAGGGGC	50	CA	80/82
Li71-5/2 (Q)	GCACGGTCGGCATTGTA	GATAAACGAGATGGCCGC	56	CA	110/110
Li71-7 (R)	GCTGCAGCAGATGAGAAGG	GTGAGAAGGCAGGGATTCAA	50	CA	92/102
Li71-33 (P)	CTCCTTTCACACCGCCTCT	GAGAGAAGACGAGCCGAAGT	50	TG	103/107
Lm2TG (L)	AAAAAGCGAGGAATGAAAGAA	TCCCTCCCCTCTACAACCTT	53	TG	138/152
Lm4TA (M)	TTTGCCACACACATACACTTAG	GTAGACGACATCGCGAGCAC	54	TA	77/83
TubCA (T)	GGCGTGTTGCTAAACTGAT	GCCTGCGCACACAGAGAC	58	CA	80/82
CS20 (S)	CGTTGGCTGTTGATTGTGTA	GCGTGGCAATCTCCTCATT	56	TG	83/83
LIST7031(K)	GCGGGAGTCGTCTCTCTGTT	AACGTGCAGTACGCAAGGAC	58	CA	111/111
LIST7039(I)	CACTCTTTCGCTCTTTGCTG	TGGCTCCACAATATCGACAA	58	CA	205/211

3.11 Ensaio de Infecção de Macrófagos

As cepas selecionadas foram armazenadas pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). Para realização dos experimentos as cepas foram descongeladas e mantidas em meio bifásico NNN-Schneider. Para expansão, as culturas foram iniciadas com 10^5 células/ml em frascos de cultura celular (25cm^2) contendo 5 ml de meio de cultura Schneider *Drosophila* (Sigma-Aldrich) com 20% de SFB e 2% de urina humana. As culturas foram analisadas diariamente pela retirada de uma alíquota e contagem em câmara de Neubauer.

A linhagem celular DH82 (ATCC[®] CRL-10389TM), de macrófagos isolados a partir de histiocitose maligna canina, foi gentilmente cedida pela Dra. Lucia Pinto-da-Silva e foi cultivada e expandida no Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose. Os macrófagos foram mantidos em meio de cultura DMEM (Culttilab[®]) suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico (Penicilina Estreptomicina, Sigma).

Placas de 24 poços contendo lâminulas redondas de vidro foram utilizadas para o experimento de infecção. Os poços foram semeados com $1,0 \times 10^5$ células e a placa foi incubada a 37°C , 5% CO_2 por 24 h. Para a infecção, a suspensão de parasitos foi centrifugada (4000 rpm / 4°C / 10 minutos) e lavada com PBS 1X estéril e ressuspendida em 1 ml de meio de cultura DMEM sem SFB. Após a lavagem dos poços com PBS, as células foram infectadas com 10^6 parasitos por poço (proporção de 10:1). Após incubação na estufa (37°C / 5%) por 2 a 3 horas o sobrenadante foi lavado até que não houvesse mais parasitos livres em suspensão. Por fim as células foram incubadas em estufa com meio DMEM 10% SFB por até 72 horas. As lâminulas foram coradas pelo método panótico (Panótico Rápido, Laborclin, Brasil).

O estudo cinético da interação do parasita com a célula hospedeira foi realizado pela contagem do número de parasitos por célula. Foram contadas 100 células em 4 campos por lâmina, totalizando a avaliação de 400 células randomicamente nos tempos 24, 48 e 72 horas após a infecção.

3.12 Análise Estatística

As comparações entre dois grupos nos ensaios de resposta imune humoral, carga parasitária e histopatologia foram realizadas através de comparação das medianas pelo teste Mann-Whitney ao nível de significância de 95%. Quando foram considerados três grupos, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste de Tukey. As tabelas descritivas do ANOVA estão mostradas no **ANEXO IV**. Para as análises de correlação usou-se o teste de correlação de Pearson. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Para as análises de concordância entre os testes sorológicos e moleculares utilizados, o índice Kappa foi calculado de acordo com o método de (Landis e Koch, 1977) no endereço eletrônico <http://www.lee.dante.br/com>.

Para a separação dos grupos em função da carga parasitária um limite de detecção foi estabelecido para cada gene alvo de acordo com o *background* dos ciclos iniciais (6 a 15) em todas as reações válidas. Os valores médios do ciclo de corte (*cycle threshold*, Ct) foram determinados por duplicatas técnicas. Os valores de Ct foram plotados em função das diluições (\log_{10}) e as curvas padrão para cada alvo determinadas por regressão linear, com os coeficientes de determinação (R²) usados como controle de qualidade. Em seguida, as curvas padrão do gene *ssrRNA* foram utilizadas para estimar o número total de parasitos na amostra e o gene *HPRT* usado para normalização do número de células caninas. Assim, foi possível obter o número de parasitos por $1,0 \times 10^6$ células. A eficiência de amplificação de cada alvo foi determinada de acordo com a equação: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. O processamento e a apresentação dos dados foram realizados utilizando rotinas escritas na linguagem R, para o pacote estatístico R versão 2.9.22 (Team, 2009).

Nos ensaios de expressão gênica por qPCR a eficiência de cada reação de amplificação foi calculada como a razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo anterior. Assim, a eficiência estimada de cada gene foi obtida pela média das eficiências calculadas para cada reação de amplificação de cada gene. Os genes empregados na normalização entre as diferentes amostras amplificadas foram selecionados pelo método *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002). Para a comparação das médias dos valores de expressão normalizados foi utilizado o teste *one-way* ANOVA não paramétrico via

permutação irrestrita ($n = 1000$), seguido da comparação de médias par-a-par por teste t não paramétrico via permutação ($n = 1000$) com correção de Bonferoni (Basso *et al.*, 2009). Os dados são apresentados pela média \pm erro padrão da média. Dois níveis de significância menor ou igual a 0,01, a 0,05 e a 0,1 foram considerados "altamente significativo", "importante" e "sugestivo", respectivamente. As relações entre os perfis de genes diferencialmente expressos e amostras foi investigada por análise Bayesiana (Savage *et al.*, 2010) e representado por *heatmaps* 2D e dendogramas.

O programa STRUCTURE v. 2.3.4 foi utilizado para agrupar os indivíduos em populações com uma abordagem baseada em modelo (*model based*). A proporção atribuída de cada indivíduo pertencente a cada população (coeficiente de adesão Q) foi estimada pela estatística Bayesiana e simulações de cadeias Markov e Monte Carlo com um período de 100.000 iterações (*burn-in*) seguido de uma corrida com 1.000.000 (*running*). Para cada valor de K (1 a 15), foram realizadas 10 iterações, cujos resultados foram utilizados para estimar o valor de delta K no programa Structure Harvester v. 0.6.1 (disponível em <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/> acessado em julho 2014). O programa CLUMPP v. 1.1.2 foi utilizado para minimizar a variação de Q entre diferentes réplicas de um determinado K e os resultados foram visualizados em planilha Excel (Microsoft), onde os gráficos de barra foram gerados.

O programa Genetic Data Analysis (Rittig e Bogdan) foi utilizado para o cálculo da heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) bem como do coeficiente de endocruzamento (F_s) (Xu *et al.*, 2002).

O programa Microsatellite Analyzer (MSA) (Dieringer e Schlotterer, 2003) foi utilizado para estimar os valores do índice de diferenciação genética (F_{ST}) e os respectivos valores de p.

A árvore de *Neighbor Joining* foi construída utilizando o programa POPULATIONS 1.2.32 (<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations>) e visualizado no programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2011). A rede filogenética foi construída no SplitsTree 4.12.3 (Huson e Bryant, 2006) a partir da matriz de distância Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967; !!! INVALID CITATION !!!).

Para a confecção dos mapas com o apontamento do local de coleta das amostras, foi utilizado o programa TerraView 3.5.0. Os gráficos de setores foram feitos em Excel e adicionados ao mapa.

4. RESULTADOS

4.1 Grupos do Estudo

Foram coletadas amostras de baço, fígado e soro de 92 cães. Os animais foram avaliados quanto a presença de seis sinais clínicos típicos da LV. De acordo com a metodologia adaptada de Quinnell (Quinnell, Courtenay, Shaw, *et al.*, 2001), 34 apresentaram escore clínico de 0 a 2 (escore clínico baixo); 30 o escore foi de 3 a 6 (escore clínico médio) e 28 animais com escore de 7 a 18 (escore clínico alto). Paralelamente, classificamos os mesmos animais em dois grupos clínicos. Assim, 22 animais que não apresentaram nenhum sinal clínico foram classificados como assintomáticos enquanto 70 que apresentaram um ou mais sinais característicos da LVC foram classificados como sintomáticos (**Tabela 4.1**). Os animais controle foram utilizados apenas para a sorologia. Os dados brutos com a descrição dos animais e dos resultados está no **ANEXO III**.

Tabela 4.1 Descrição dos grupos experimentais

Classificação	Grupos	Critério	n
I Semiquantitativa	escore clínico baixo	pontuação 0-2	34
	escore clínico médio	pontuação 3-6	30
	escore clínico alto	pontuação 7-18	28
	*controle	não infectado	15
	Total		107
II Qualitativa	Assintomático	sem sinais	22
	Sintomático	1 ou mais sinais	70
	*controle	não infectado	15
	Total		107

*utilizados apenas na sorologia

O sinal clínico mais comum observado foi a dermatite (47/92, 51%) seguido de onicogrifose (45/92, 49%). Vinte e dois animais (24%) não apresentavam nenhum sinal clínico (**Figura 4.1**). Foram observadas alterações cutâneas acompanhadas de outros sinais clínicos.

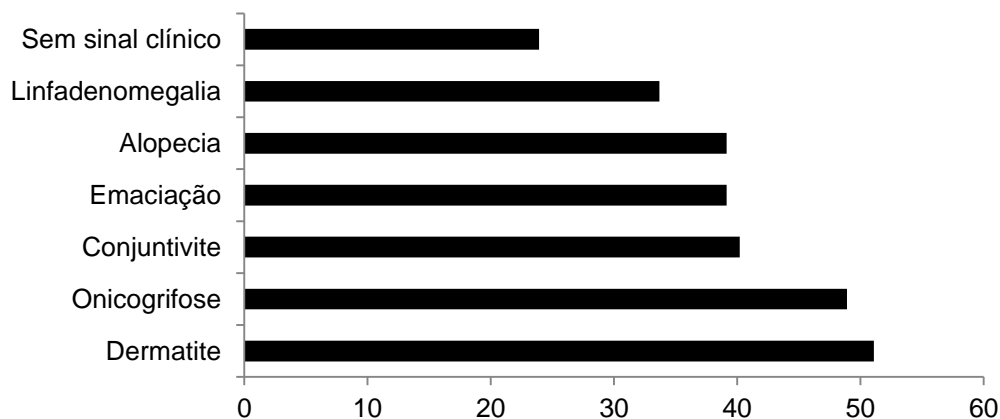


Figura 4.1 Porcentagem de animais apresentando os seis sinais clínicos mais comumente observados na Leishmaniose Visceral Canina.

4.2 Confirmação Diagnóstica

Os animais foram provenientes de quatro municípios localizados no estado do Mato Grosso e foram submetidos à eutanásia por apresentarem sorologia positiva para infecção por *L. infantum*. O grupo de estudo foi inicialmente diagnosticado com base nos ensaios de rotina do Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso (Lacen/MT): ELISA seguido da confirmação por RIFI (Brasil, 2006). Todos os animais incluídos no estudo foram doados com consentimento por escrito de seus proprietários e encaminhados à eutanásia, como recomendado pelo Ministério da Saúde. A RIFI com resultado maior ou igual a 1:40 foi utilizada como ponto de corte, razão pela qual foram realizados testes complementares, em nosso laboratório, como critério de inclusão no estudo.

O isolamento de parasitos foi feito em 40,2% (37/92) dos cães. Foi observada uma tendência à maior positividade na cultura de amostras dos animais com maior escore clínico (**Tabela 4.2**). O isolamento a partir das amostras de baço (22,8%, 21/92) e medula óssea (23,9%, 22/92) foi mais eficiente do que a partir de amostras de fígado (11,9%, 11/92) (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.2 Positividade da cultura a partir de diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Os animais foram classificados pelo escore clínico (Quinnell, Courtenay, Shaw, *et al.*, 2001) ou como assintomáticos e sintomáticos.

Escore Clínico	Cultura baço % (P/T)	Cultura medula % (P/T)	Cultura fígado % (P/T)
0 – 2	14,7 (5/34)*	11,8 (4/34)	2,9 (1/34)
3 – 6	20,0 (6/30)*	40,0 (12/30)	16,7 (5/30)
7 – 18	35,7 (10/28)*	21,4 (6/28)	17,9 (5/28)
Total	22,8 (21/92)	23,9 (22/92)	11,9 (11/92)
Assintomático	9,1 (2/22)	13,7 (3/22)	4,5 (1/22)
Sintomático	27,1 (19/70)	27,1 (19/70)	14,2 (10/70)
Total	22,8 (21/92)	23,9 (22/92)	11,9 (11/92)

Cultura de promastigotas a partir de amostras clínicas de baço, fígado e/ou medula óssea; P - número de animais positivos; T - número de animais no grupo; *p = 0,05, teste Qui-quadrado para tendência.

Nas diferentes amostras clínicas dos cães selecionados com evidência clínica, epidemiológica e laboratorial compatível com LV, a espécie responsável foi confirmada como *L. (L.) infantum* por eletroforese de isoenzimas (MLEE) no Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania* do IOC (**Figura 4.2**) de acordo com metodologia proposta (Cupolillo *et al.*, 1994).

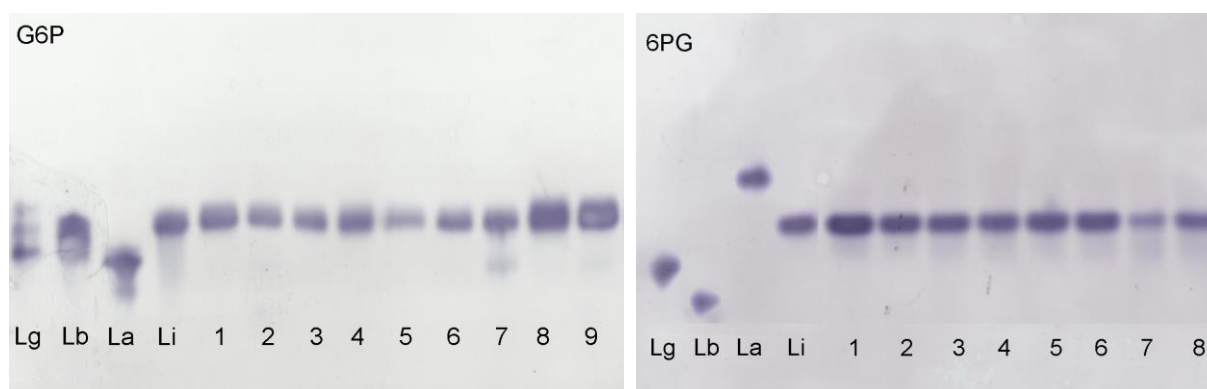


Figura 4.2 Caracterização isoenzimática de cepas de *Leishmania* isoladas dos cães incluídos neste estudo. Os testes seguiram metodologia proposta por (Cupolillo *et al.*, 1994) para identificação de *L. infantum*, utilizando as enzimas G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase, E.C.1.1.1.43) e 6PGDH (6-phosphogluco-dehydrogenase, E.C. 1.1.1.43). Lg, cepa de referência de *Leishmania (Viannia) guyanensis* - IOC/L0565 (MHOM/BR/1975/M4147); Lb, cepa de referência de *Leishmania (Viannia) braziliensis* - IOC/L0566 (MHOM/BR/1975/M2903); La, cepa de referência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* -IOC/L0575 (IFLA/BR/1967/PH8); Li, cepa de referência de *Leishmania (Leishmania) infantum* - IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75). Identificação de cepas isoladas de (1, 2 e 3) medula óssea, (4, 5 e 6) baço e (7,8 e 9) fígado de cães soropositivos.

Quanto ao diagnóstico molecular a partir do tecido dos animais, a PCR direcionada para o alvo kDNA mostrou-se altamente sensível, com positividade maior que 90% em todos os grupos clínicos (**Tabela 4.3**). Nos ensaios direcionados para a proteína do choque térmico (hsp70), 17 animais tiveram resultados negativos, desses, nove apresentaram escore clínico baixo, quatro apresentaram escore clínico

médio e quatro, escore alto. Apenas um animal foi negativo para kDNA nos três tecidos.

No caso do diagnóstico através do alvo hsp70, também é possível identificar a espécie em todos os tipos de amostras coletadas, a saber: fígado, baço, pele e medula óssea. Além disso, foi possível a identificação tanto em animais sintomáticos como nos assintomáticos (**Figura 4.3**).

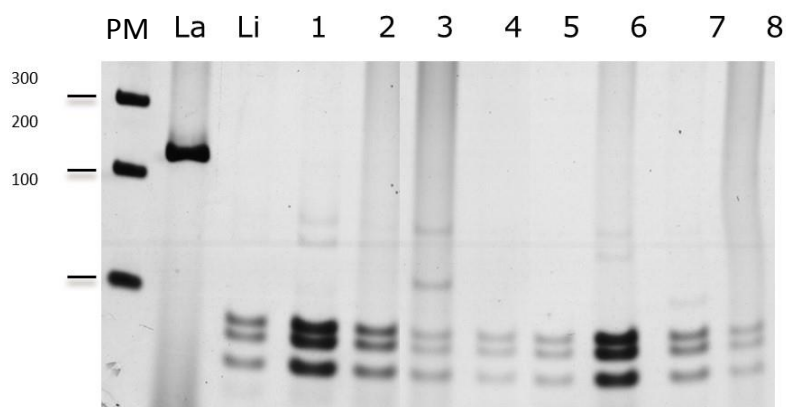


Figura 4.3 PCR-RFLP de *hsp70C* (234pb) para as cepas de referência de *Leishmania* e amostras clínicas de cães com LV após a digestão com Hae III. PM - marcador de peso molecular (pares de base); La, cepa de referência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* -IOC/L0575 (IFLA/BR/1967/PH8); Li, cepa de referência de *Leishmania (Leishmania) infantum* - IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75); 1-2, amostras de baço de cães sintomáticos; 3-4, amostras de baço de cães assintomáticos; 5-6, amostras de fígado de cães sintomáticos; 7-8 amostras de fígado de cães assintomáticos. Gel de poliacrilamida 4% corado pela Prata.

Os resultados da sorologia demonstram positividade maior do que 70% nos grupos clínicos com mais sinais. Interessantemente, a sorologia avaliada pelo DPP®LVC mostra um perfil crescente de positividade de acordo com o aumento do escore clínico. O mesmo padrão foi observado quando os animais foram classificados em apenas dois grupos clínicos (**Tabela 4.3**). Dois animais (104 e 112) foram excluídos das análises de sorologia, devido a perda da amostra. No entanto foram mantidos nas outras análises, pois apresentavam resultado positivo na PCR para kDNA e hsp70 e de um deles foi realizado o isolamento do parasita a partir da amostra de baço e de fígado. Cinco animais apresentaram leitura indeterminada no ELISA para IgM. Foram incluídos no estudo todos os animais com pelo menos um teste parasitológico (cultura ou PCR) positivo.

Tabela 4.3 Positividade das amostras de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* nos diferentes métodos de diagnóstico.

Grupos	RIFI \geq 1:40 %(P/T)	DPP®LVC %(P/T)	ELISA %(P/T)	Cultura %(P/T)	kDNA %(P/T)	hsp70 %(P/T)	ssrRNA %(P/T)
0 - 2	100,0 (34/34)	52,9*** (18/34)	66,7 [§] (22/33)	20,6 ^{§§} (7/34)	100,0 (34/34)	73,5 (25/34)	100,0 (33/33)
3 - 6	100,0 (30/30)	80,0*** (24/30)	70,0 [§] (21/30)	43,3 ^{§§} (13/30)	96,7 (29/30)	86,7 (26/30)	100,0 (29/29)
7 - 18	100,0 (28/28)	92,8*** (26/28)	95,6 [§] (25/27)	60,7 ^{§§} (17/28)	100,0 (28/28)	85,7 (24/28)	100,0 (26/26)
total	100,0 (92/92)	73,9 (68/92)	75,5 (68/90)	40,2 (37/92)	98,9 (91/92)	82,4 (75/92)	100,0 (88/88)
Assintomático	100,0 (22/22)	50,0** (11/22)	61,9 (13/21)	18,2* (4/22)	100,0 (22/22)	72,7 (16/22)	100,0 (22/22)
Sintomático	100,0 (70/70)	81,4** (57/70)	79,7 (55/69)	47,1* (33/70)	98,6 (69/70)	84,3 (59/70)	100,0 (66/66)
Total	100,0 (92/92)	73,9 (68/92)	75,5 (68/90)	40,2 (37/92)	98,9 (91/92)	82,4 (75/92)	100,0 (88/88)

RIFI - ensaio realizado pelo Laboratório Central (MT), Ministério da Saúde; ***p = 0,001; ^{§§}p = 0,005; [§]p = 0,04; **p = 0,005; *p = 0,03

No diagnóstico molecular com hsp70 a melhor concordância foi em relação ao teste DPP®LVC (**Tabela 4.4**). Em relação aos grupos clínicos, foi observada concordância razoável (kappa = 0,366) entre os alvos hsp70 e kDNA nos animais com escore clínico mediano e fraco (kappa = 0,144) quando classificados com sintomáticos. A concordância tanto entre o hsp70 e os testes sorológicos, ELISA e DPP®LVC, foi muito baixa (kappa <0,3) para todos os grupos clínicos avaliados. A melhor concordância foi observada entre os dois testes sorológicos, onde foi observada concordância moderada (kappa ~0,6) nos animais com mais sinais clínicos em ambas as classificações (**Tabela 4.5**).

Tabela 4.4 Concordância entre o diagnóstico molecular por hsp70 e o diagnóstico por kDNA e pelos testes sorológicos DPP®LVC e ELISA para IgG total.

		hsp70				Quesito da concordância peo Kappa	
		P	N	Total	Kappa	valor P	
kDNA	P	75	16	91	0,092	<0,035	Fraco
	N	0	1	1			
	Total	75	17	92			
DPP®LVC	P	68	0	68	0,378	<0,001	Razoável
	N	17	7	24			
	Total	85	7	92			
ELISA	P	55	13	68	-0,06	Não aplicável	Desconsiderada
	N	19	3	22			
	Total	74	16	90			

P – positivo; N – negativo

Tabela 4.5 Concordância nos diferentes métodos de diagnóstico usados para detecção da infecção canina por *L. infantum*. Os animais foram classificados pelo escore clínico (Quinnell, Courtenay, Shaw, *et al.*, 2001) ou como assintomáticos e sintomáticos.

Grupos	Concordância %(C/T)			
	kDNA x hsp70	hsp70 X ELISA	hsp70 X DPP®LVC	DPP®LVC x ELISA
0 - 2	73,5 (25/34)	45,5 (15/33) ^c	50,0 (17/34) ^h	69,7 (23/33) ⁿ
3 - 6	90,0 (27/30) ^a	70,0 (21/30) ^d	80,0 (24/30) ⁱ	83,3 (25/30) ^o
7 -18	85,7 (24/28)	81,4 (22/27) ^e	85,7 (24/28) ^j	92,6 (25/27) ^p
Total	82,6 (76/92)	64,4 (58/90)	70,6 (65/92)	81,1 (73/90)
Assintomático	72,7 (16/22)	42,8 (9/21) ^f	40,9 (9/22) ^l	61,9 (13/21) ^q
Sintomático	85,7 (60/70) ^b	71,0 (49/69) ^g	80,0 (56/70) ^m	86,9 (60/69) ^r
Total	82,6 (76/92)	64,4 (58/90)	70,6 (65/92)	81,1 (73/90)

C – número de resultados concordantes; T – número de animais no grupo
Índice Kappa: ^a0.366; ^b0,144; ^c0.286; ^d0.151; ^e0.098; ^f0.273; ^g0.003; ^h0.028; ⁱ0.286; ^j0.263; ^l0.182; ^m0.297; ⁿ0.375; ^o0.561; ^p0.46; ^q0.229; ^r0.586

4.3 Resposta Imune Humoral (IgG e IgM) em Cães Naturalmente Infectados com *L. infantum*

A análise da sorologia por ELISA permitiu observar que há altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, com uma diferença significativa nos títulos de IgG total e IgM entre os grupos clínicos e o grupo controle independente do método de classificação clínica ($p < 0,01$), mostrando forte resposta humoral, característica da infecção com leishmanias viscerotrópicas (**Figuras 4.4A, 4.4B, 4.4D e 4.4E**). Além disso, é possível observar diferença nos títulos de IgG total entre os grupos de menor (0-2) e maior (7-18) escore clínico ($p < 0,05$) (**Figura 4.4A**). Diferentemente, na avaliação com dois grupos clínicos isso não fica evidente (**Figura 4.4 D**). As análises com o teste rápido DPP®LVC mostram o mesmo padrão do ELISA na avaliação com três grupos clínicos (**Figura 4.4 C**), porém evidencia diferença na comparação entre dois grupos clínicos ($p < 0,05$) (**Figura 4.4 F**).

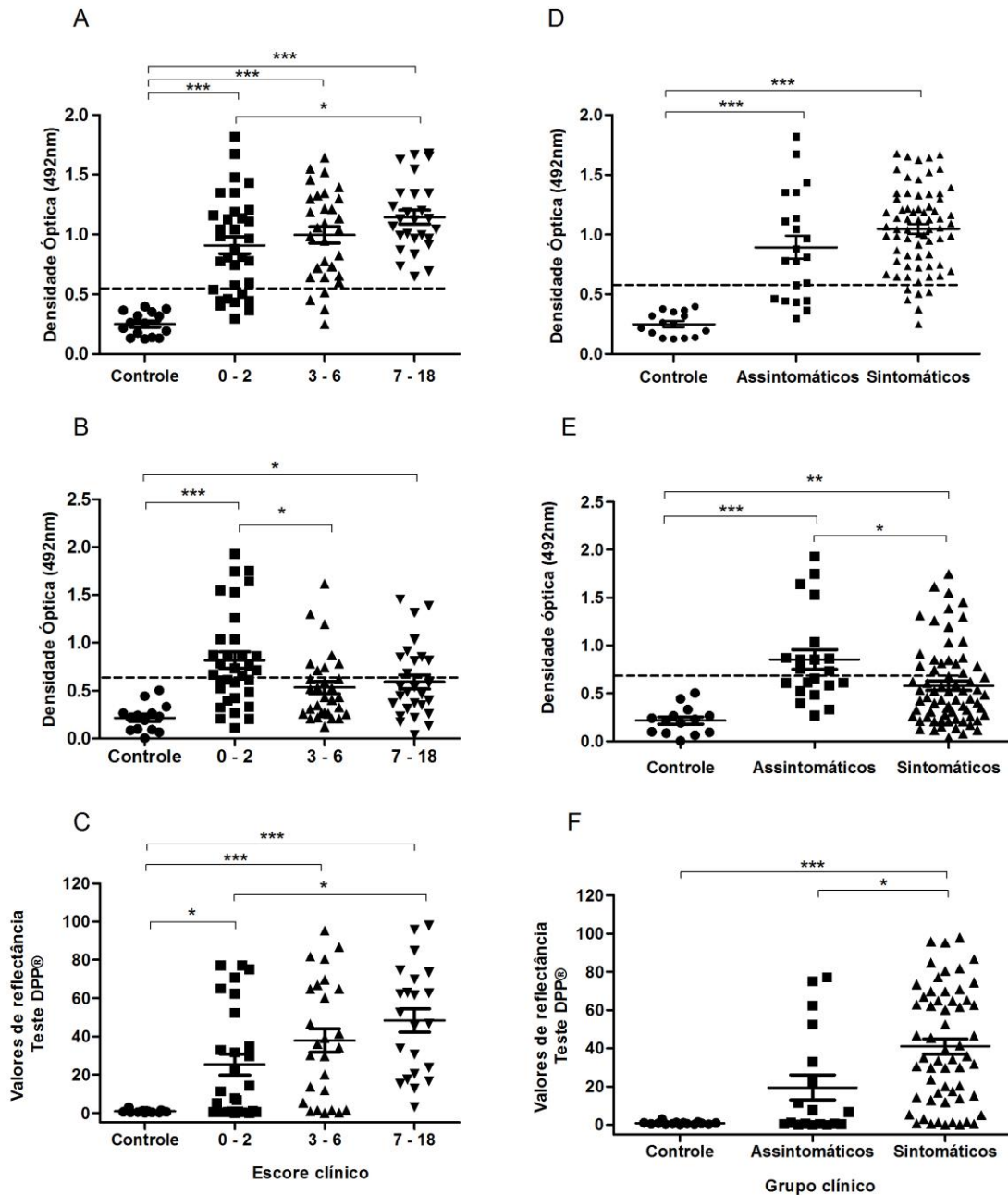


Figura 4.4 Resposta humoral específica em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e não infectados de área não endêmica (controle). Títulos de IgG total (A e D) e de IgM (B e E) foram determinados por ELISA. Os títulos de IgG também foram detectados pelo teste rápido DPP®LVC (C e F). Os animais foram separados de acordo com o escore clínico em (A), (B) e (C) como 0-2 (n=33), 3-6 (n=30) e 7-18 (n=27); ou de acordo com a classificação clínica em (D), (E) e (F) como assintomáticos (n=21) ou sintomáticos (n=69). O soro de cães de área não endêmica foi utilizado como grupo controle (n=15). Ensaios realizados em duplicata para cada amostra. ELISA realizado com antígeno bruto da cepa de *L. infantum* IOC/L3128 (MCAN/BR/2009/BOB-FÍGADO). Barras indicam média \pm erro padrão. Resultados significativos (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. ANOVA com pós teste de Tukey.

4.4 Padronização dos Ensaios de Quantificação Parasitária por qPCR

A fim de quantificar a carga parasitária por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foram utilizados genes direcionados para amplificação da subunidade 18S do rRNA de *Leishmania* sp. (ssrRNA) e um direcionado para amplificação do gene constitutivo de cão hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT). Os ensaios foram padronizados e as curvas padrão para a quantificação foram definidas com coeficientes de variação (R²) de 0,966 e 0,943, respectivamente (**Figura 4.5**). A curva padrão para o gene HPRT compreendeu seis pontos de diluição seriada e para o gene ssrRNA oito pontos (**Figuras 4.5 e 4.6A e B**). As temperaturas da curva de dissociação foram 74,0°C e 79,0°C para os genes HPRT e ssrRNA, respectivamente (**Figura 4.6C**). Das amostras coletadas foi possível quantificar a carga parasitária de 88 amostras de baço e 70 amostras de fígado.

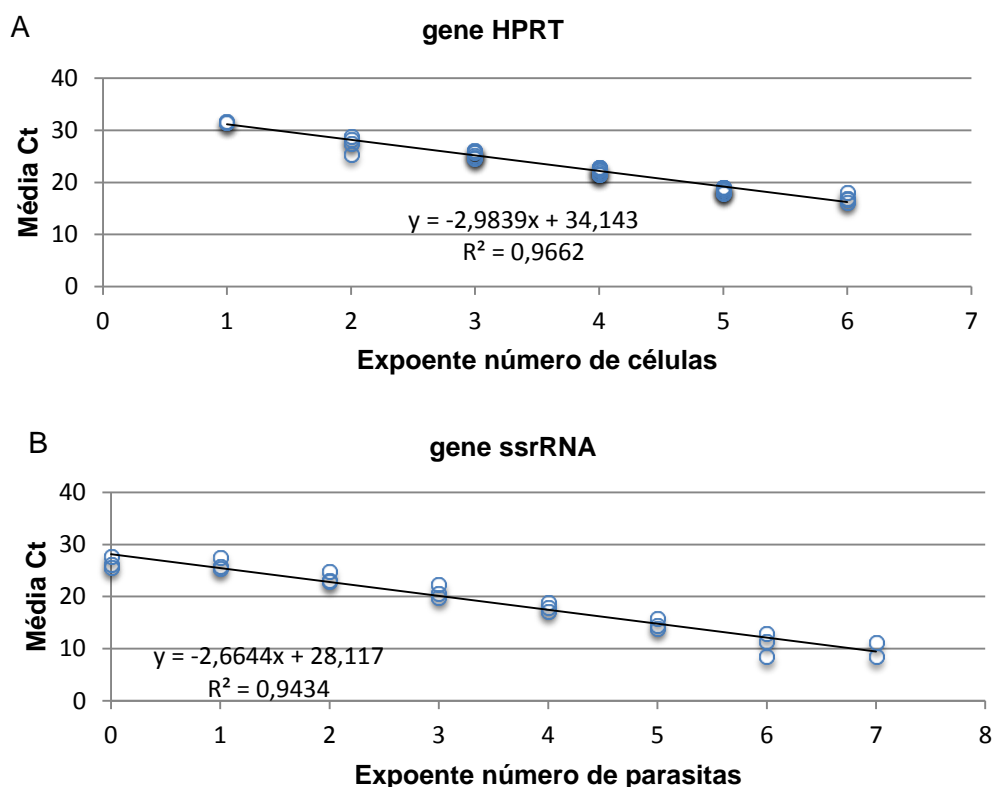


Figura 4.5 Curvas padrão utilizadas como referência para a quantificação parasitária em amostras de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. (A) Curva construída com diluição seriada de DNA de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de cão para o gene HPRT. (B) Curva construída com diluição seriada de DNA de *L. infantum* para o gene ssrRNA de *Leishmania* sp. Ct (*cycle threshold*): número de ciclos de PCR em que é detectada a máxima fluorescência.

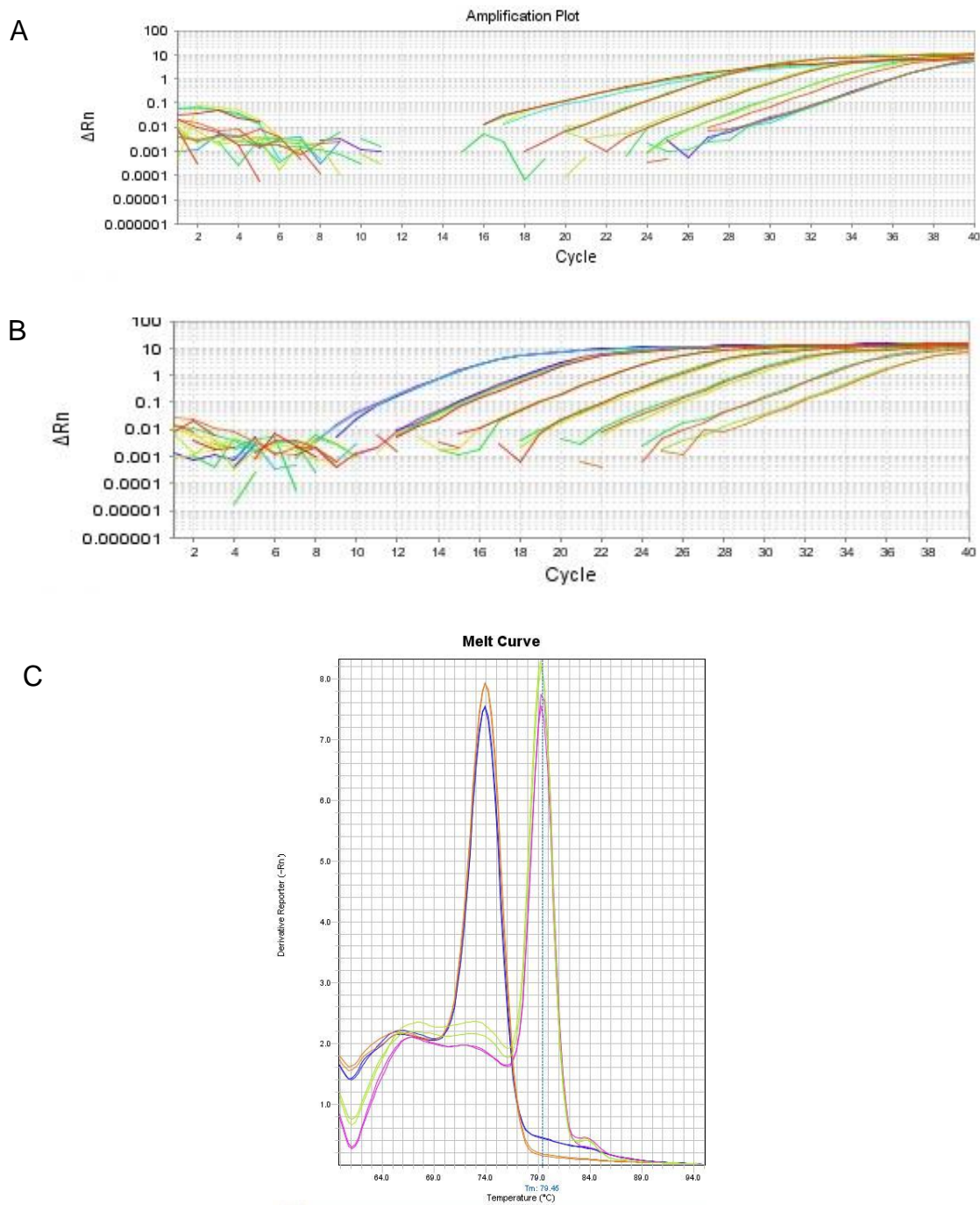


Figura 4.6 Curvas padrão no ensaio de PCR em tempo real. (A) Gráfico de amplificação de 5 diluições seriadas do DNA de células caninas para o gene HPRT; (B) Gráfico de amplificação de 7 diluições seriadas do DNA de promastigotas de *L. infantum* para o gene *ssrRNA*; (C) Picos da curva de dissociação para o amplicon de HPRT (74,0°C) e para o amplicon de *ssrRNA* (79,0°C).

4.5 Carga Parasitária no Baço e Fígado de Cães Naturalmente Infectados com *Leishmania infantum*

A carga parasitária no baço foi maior do que no fígado (Figura 4.7). O agrupamento dos animais de acordo com a avaliação clínica mostra que essa diferença se deve principalmente aos animais sintomáticos (Figura 4.8). Assim, tanto animais com escore clínico mais baixo (Figura 4.8A, $p < 0,05$) quanto os animais sem sinais (Figura 4.8B, $p < 0,01$) apresentaram menor carga parasitária no baço. No fígado não observamos alterações quanto à classificação clínica (Figuras 4.8 C e D). Foi observada fraca correlação positiva entre os dois tecidos ($r^2 = 0,2174$) independente da classificação clínica.

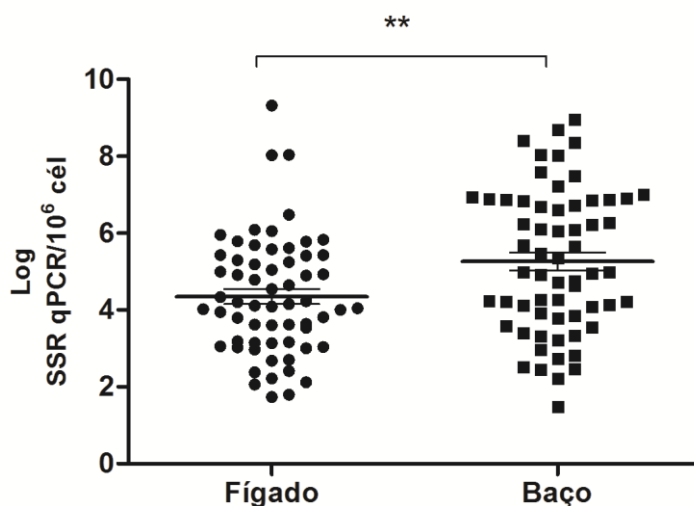


Figura 4.7 Carga molecular parasitária no fígado e baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. PCR em tempo real para o gene *ssrRNA* de *Leishmania* sp. Concentração inicial de DNA normalizada pelo gene constitutivo *HPRT*. As barras indicam média \pm erro padrão. (**) $p < 0,01$, teste Mann Whitney.

Considerando-se que os sinais clínicos podem ser resultado de fatores incontroláveis, como co-infecções, estado nutricional e outros distúrbios, os animais foram divididos de acordo com a carga parasitária. Assim, dois grupos foram encontrados para cada tecido analisado. Grupo com baixa (baixaB, n = 46) e grupo com alta (altaB, n = 42) carga parasitária no baço variando de $6,3 \times 10^0$ a $5,42 \times 10^5$ e $1,14 \times 10^6$ a $8,92 \times 10^8$, respectivamente. No fígado, o grupo com baixa carga parasitária (baixaF, n = 31) variou entre $1,82 \times 10^1$ e $4,30 \times 10^3$ e o grupo com alta (altaF, n = 39) variou de $6,23 \times 10^3$ a $2,11 \times 10^9$ (**Tabela 4.6**). Esse agrupamento foi corroborado pela avaliação por microscopia da presença de amastigotas nos tecidos, como será mostrado mais adiante.

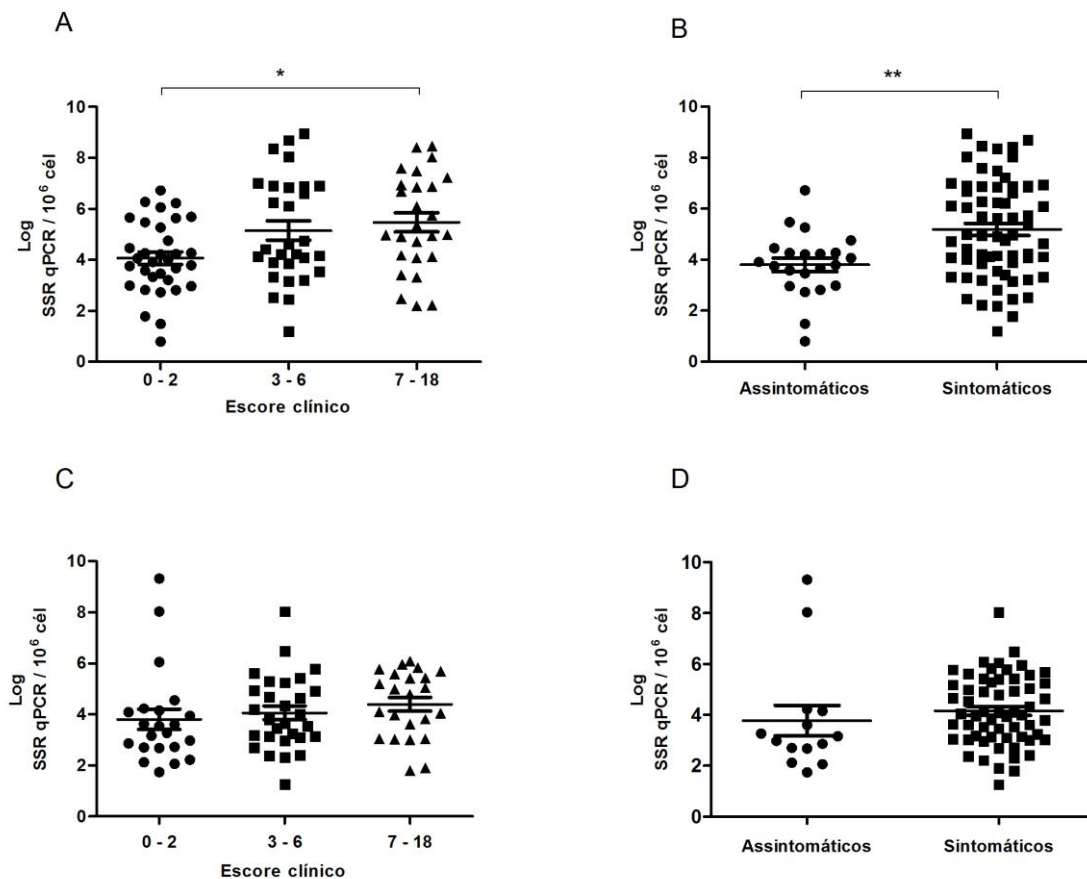


Figura 4.8 Carga parasitária molecular no fígado e baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* de acordo com a classificação clínica. Carga molecular parasitária no baço (A e B). Carga parasitária molecular no fígado (C e D). PCR em tempo real para o gene *ssrRNA* de *Leishmania* sp. Concentração inicial de DNA normalizada pelo gene constitutivo *HPRT*. As barras indicam a média \pm erro padrão. (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$. ANOVA com pós teste de Tukey para três grupos clínicos. Teste Mann Whitney para dois grupos clínicos.

Tabela 4.6 Grupos de estudo de acordo com a carga parasitária molecular no baço e fígado

Grupo de carga molecular parasitária/tecido (n)	Número de parasitos / $1,0 \times 10^6$ células		
	Min	Max	Média
Baixa/baço (61)	$6,3 \times 10^0$	$5,42 \times 10^5$	$5,76 \times 10^4$
Alta/baço (27)	$1,14 \times 10^6$	$8,92 \times 10^8$	$9,46 \times 10^7$
Baixa/fígado (31)	$1,82 \times 10^1$	$4,30 \times 10^3$	$1,22 \times 10^3$
Alta/fígado (39)	$6,23 \times 10^3$	$2,11 \times 10^9$	$5,87 \times 10^7$

n – número de animais; Min – valor mínimo; Max – valor máximo

No que diz respeito à carga parasitária molecular pareada, ou seja, a carga no baço e fígado do mesmo animal, pode-se inferir que a diferença entre os tecidos está nos animais com maior sintomatologia (**Figura 4.9**).

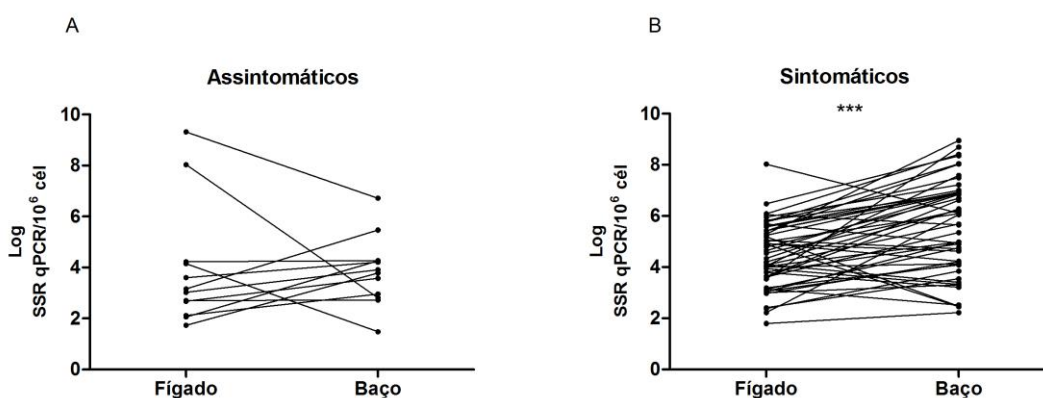


Figura 4.9 Carga molecular parasitária pareada nos tecidos de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Carga parasitária pareada entre animais classificados como assintomáticos (A) ou sintomáticos (B). (***) $p < 0,001$, teste t pareado.

4.6 Correlação entre a Carga Parasitária e a Resposta Imune Humoral

Os títulos médios de anticorpos IgG anti-*Leishmania* no grupo baixaB (OD de $0,966 \pm 0,403$ SD) e no grupo altaB (OD $1,121 \pm 0,257$ DP) foram semelhantes (**Figura 4.11A**), bem como os títulos de IgM OD $0,630 \pm 0,407$ e $0,713 \pm 0,507$, para baixaB e altaB, respectivamente (**Figura 4.11B**). No entanto, houve diferença nos valores obtidos pelo teste rápido DPP®LVC entre grupos altaB e baixaB ($p < 0,0001$), com diferença mais marcante em relação ao grupo controle para os animais do grupo altaB (**Figura 4.11C**). A razão entre os valores de reflectância da banda teste e da banda controle obtidos na leitura do DPP®LVC é

maior nos animais com maior carga molecular parasitária esplênica (**Figura 4.12A**) e tem correlação direta com a carga (**Figura 4.12B**).

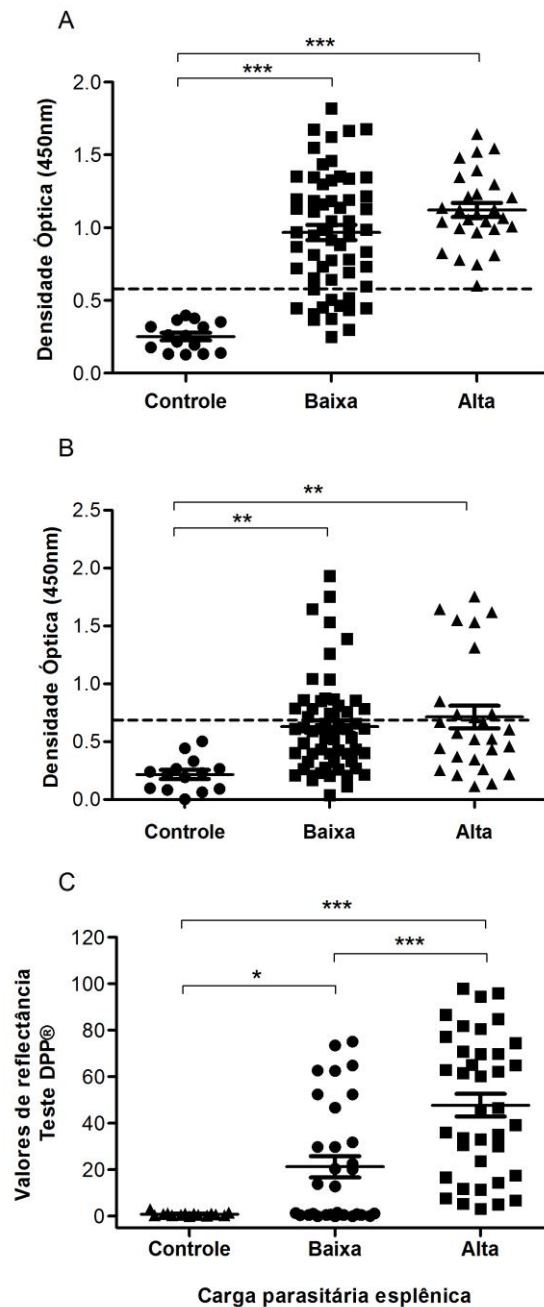


Figura 4.10 Resposta humoral específica em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* com alta e baixa carga molecular parasitária no baço. Títulos de IgG total (A) e de IgM total (B) e valores de reflectância no teste DPP®LVC (C) em animais com baixa (n = 60) ou alta (n = 27) carga molecular parasitária no baço. O soro de cães de área não endêmica foi utilizado como grupo controle (n=15). ELISA realizado em duplicata para cada amostra com antígeno bruto da cepa de *L. infantum* IOC/L3128 (MCAN/BR/2009/BOB-FÍGADO). Valores de reflectância foram determinadas pelo teste DPP®LVC. As barras horizontais indicam os valores médios. A linha pontilhada indica o cut-off, 0,549 para IgG e IgM para 0,645. (***) p <0,0001; (**) p <0,001, ANOVA com pós teste de Tukey.

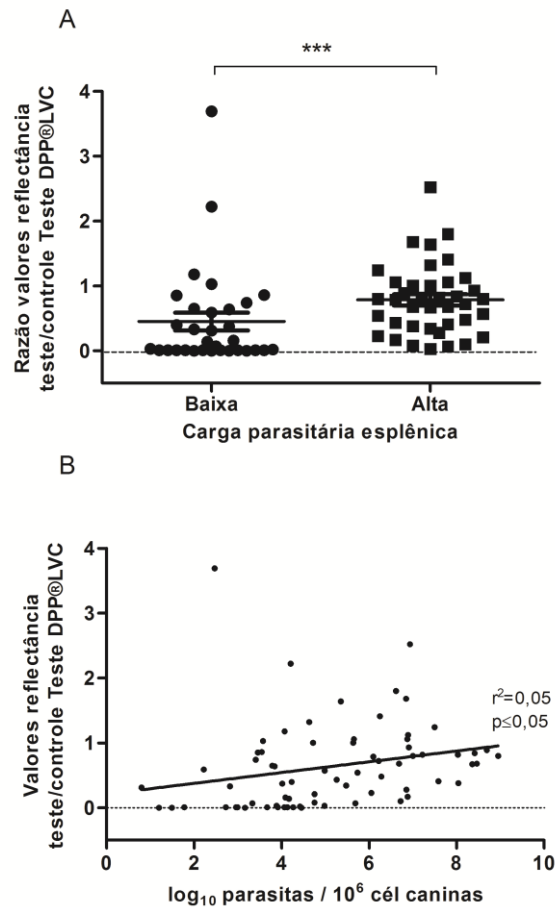


Figura 4.11 Resposta humoral pelo teste DPP@LVC de acordo com a carga molecular parasitária esplênica. Títulos de IgG foram detectados em 92 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* pelo teste rápido DPP@LVC. Carga parasitária determinada por qPCR em 88 cães. (A) Animais separados em grupos com baixa e alta carga parasitária esplênica. As barras sólidas indicam os valores medianos de reflectância. (B) Correlação entre os valores de reflectância e a carga parasitária. (***) valor $p < 0,001$, Mann-Whitney U test. $p < 0,05$ indica correlação significativa, teste de correlação de Pearson.

4.7 Aspectos Histopatológicos de Cães Naturalmente Infectados

A organização do tecido esplênico foi acessada e o papel potencial do parasita neste contexto analisada em 59 animais infectados. No geral, uma intensa inflamação (periesplenite), presença de granulomas em diferentes estágios de maturação, linfoblastos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos foram observados (Tabela 4.7 e Figura 4.13).

O rompimento da arquitetura esplênica foi caracterizado pela organização da polpa branca, em que 22 dos 59 apresentaram polpa branca bem organizada, sendo 17 (28,8%) cães com baixa carga molecular parasitária e apenas 5 (8,5%) com alta ($p < 0,01$).

Por outro lado, 37 dos 59 apresentaram polpa branca com moderada a extensa desorganização, sendo 16 (27,1%) e 21 (35,6%) animais de baixa e alta carga parasitária molecular, respectivamente ($p = 0,015$; odds ratio = 4,463, teste exato de Fisher). Consideravelmente, a observação direta do número de amastigotas no compartimento subcapsular e na polpa vermelha corroborou a carga parasitária obtida por qPCR (**Tabela 4.7**).

Tabela 4.7 Histopatologia esplênica em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* com baixa (n=33) e alta (n=26) carga parasitária.

Parâmetros		Carga Parasitária Molecular no Baço		Valor P
		Baixa % (n/t)	Alta % (n/t)	
Campos positivos	subcapsular*	57,6 (19/33)	92,3 (24/26)	0,032
	polpa vermelha*	63,6 (21/33)	92,3 (24/26)	0,0032
Polpa branca	organizada*	51,5 (17/33)	19,2 (5/26)	0,01
	desorganizada*	48,5 (16/33)	80,7 (21/26)	
Periesplenite	ausência - baixo	75,0 (24/32)	62,2 (18/26)	0,769
	médio - alto	25,0 (8/32)	30,8 (8/26)	
Granuloma	ausência	78,8 (26/33)	61,5 (16/26)	0,162
	presença	21,2 (7/33)	38,5 (10/26)	
Linfoblastos	ausência - baixo	30,3 (10/33)	15,4 (4/26)	0,227
	médio - alto	69,7 (23/33)	84,6 (22/26)	
Plasmócitos	ausência - baixo	39,4 (13/33)	19,2 (5/26)	0,154
	médio - alto	60,6 (20/33)	80,8 (21/26)	
Neutrófilos	ausência - baixo	60,6 (20/33)	53,8 (14 /26)	0,791
	médio - alto	39,4 (13/33)	46,2 (12 /26)	
Macrófagos	ausência - baixo	36,4 (12/33)	61,5 (16/26)	0,069
	médio - alto	63,6 (21/33)	38,5 (10/26)	

(*) p valor estatisticamente significativo. Teste exato de Fisher. n – número de animais com a condição; t – número total de animais do grupo

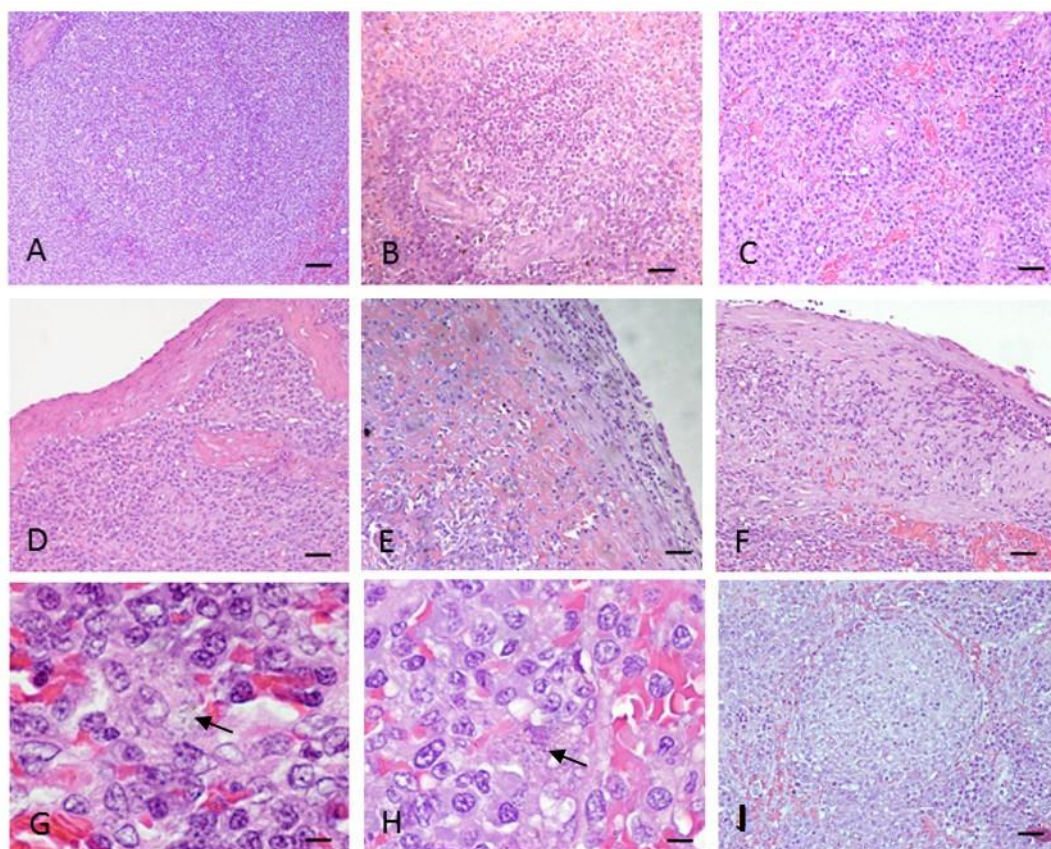
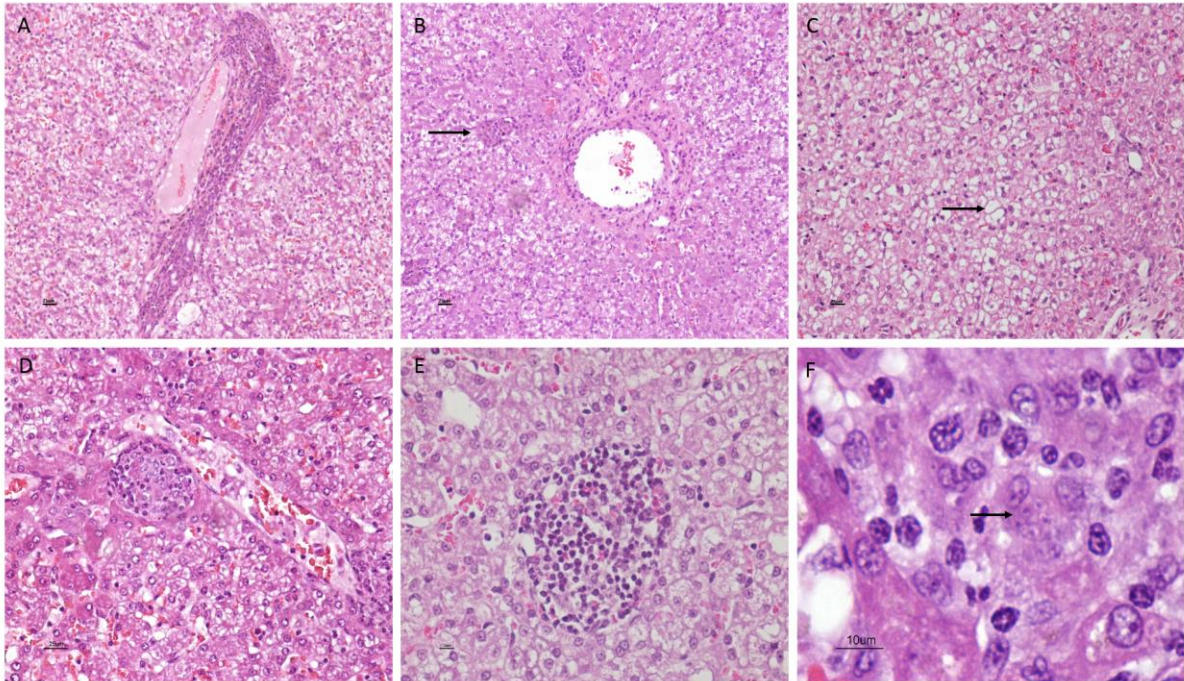


Figura 4.12 Achados histopatológicos no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. (A) Polpa branca organizada com folículo bem formado; (B) Polpa branca moderadamente desorganizada, caracterizada pela polpa branca ainda evidente, mas com regiões fracamente individualizadas ou indistintas; (C) Polpa branca desorganizada, sem distinção dos compartimentos; (D, E e F) periesplenite evidenciada pela presença intenso infiltrado inflamatório na região sub-capsular; (G, H) Amastigotas intracelulares (setas); (I) Granuloma. HE, Barra de escala de 10 μ m. Aumento 200X (A – F e I) e 1000X (G e H).

O tecido hepático foi avaliado em 66 animais. Os achados histopatológicos revelaram presença intensa de infiltrado inflamatório no espaço porta e difundido no parênquima em animais com mais parasitos, assim como a presença de granulomas e degeneração dos hepatócitos (**Figura 4.14**). Assim como mostrado no tecido esplênico, a observação direta do número de amastigotas no compartimento hepático corroborou a carga parasitária obtida por qPCR no mesmo tecido (**Figura 4.15A**). A ocorrência do granuloma e do infiltrado está mais intensa nos animais com maior carga parasitária, a degeneração tende a ser relacionada à quantidade de parasitos (**Figura 4.15B-E**).



4.13 Achados histopatológicos no fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Infiltrado inflamatório difuso no parênquima hepático (A); (B) Infiltrado inflamatório ao redor da veia centro lobular com presença de granuloma (seta); (C) Degeneração dos hepatócitos (seta); (E e F) Granuloma bem formado; (F) Amastigotas intracelulares (seta). HE, Barra de escala de 25 μm (A–D); 10 μm (E e F). Aumento 200X (A – D), 400X (E) e 1000X (F).

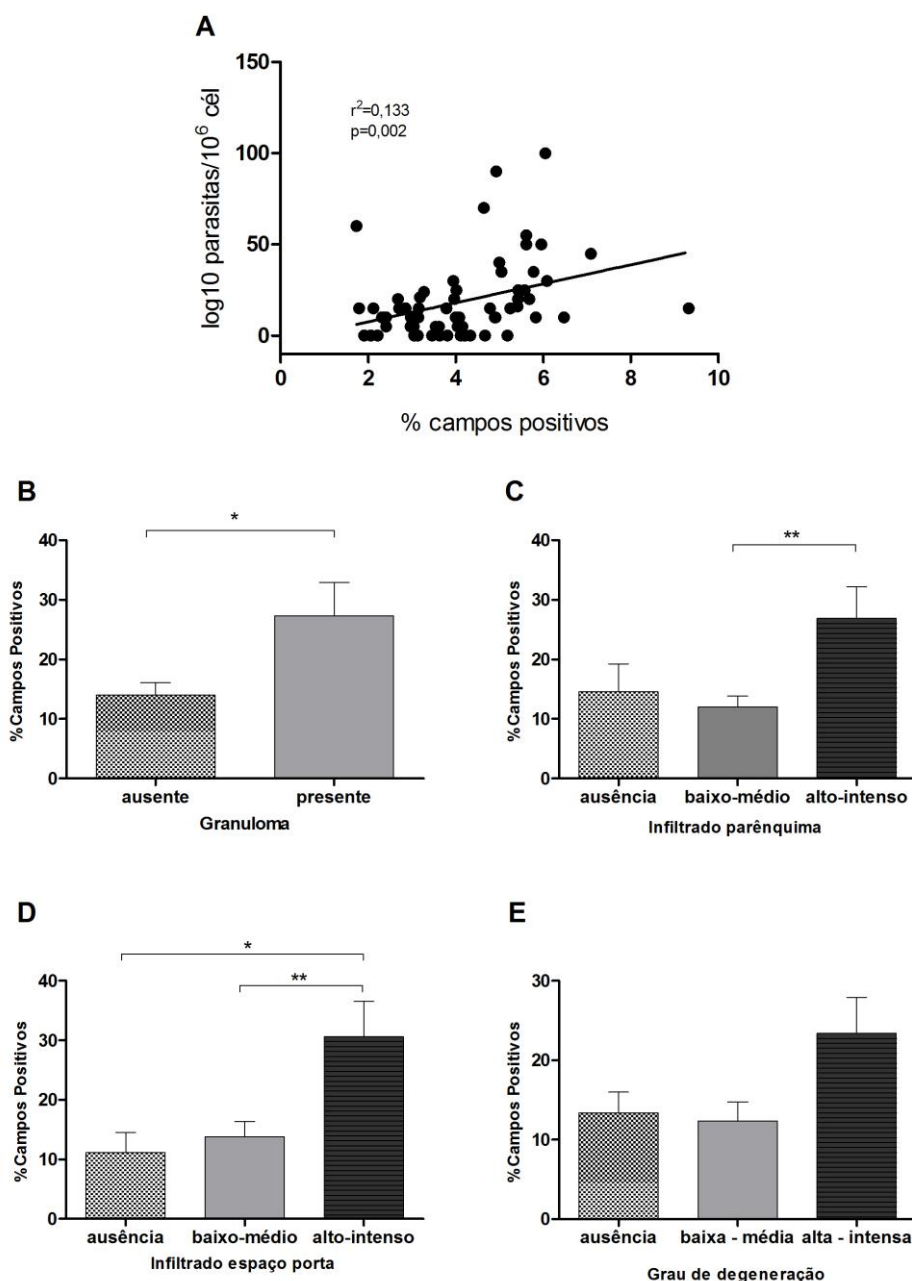


Figura 4.14 Carga parasitária hepática e achados histopatológicos no fígado de animais naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. (A) Correlação entre a quantificação realizada por PCR em tempo real e a contagem de amastigotas no tecido hepático. Porcentagem de campos positivos em função da presença de granulomas (B); do infiltrado inflamatório no espaço porta (C) e no parênquima (D) e do grau de degeneração hepática (E). As barras indicam média \pm erro padrão. Em (A) $p < 0,05$ indica correlação significativa, teste de correlação de Pearson. Em B, C e D (***) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$. ANOVA com pós teste de Tukey.

4.8 Correlação entre a Carga Parasitária e a Resposta Imune Celular

Foi observada uma grande variabilidade na expressão de citocinas entre os grupos clínicos. O padrão de alta e baixa expressão de IFN γ , IL-10, IL-12, IL-27, IL-

6, TGF β e TNF não foi uniforme entre os grupos clínicos, desta forma não foi possível correlacionar a expressão de nenhuma dessas moléculas à evolução clínica (**Figura 4.16**).

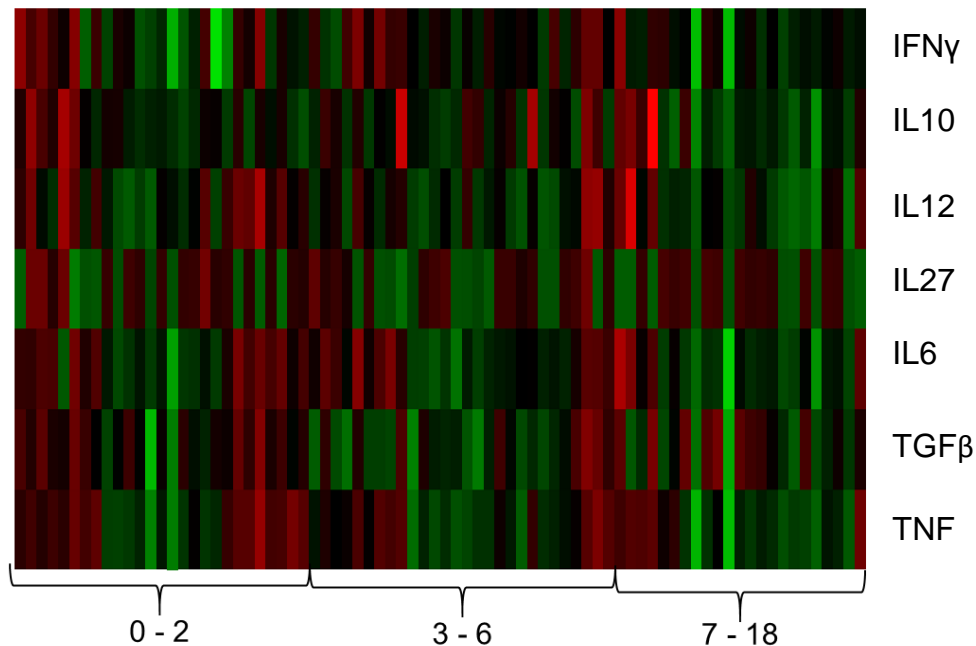


Figura 4.15 Mapa de intensidade de expressão gênica de citocinas nos animais com baixo (0-2), médio (3-6) ou alto (7-18) escore clínico. Expressão gênica determinada por PCR em tempo real com valores normalizados para os genes constitutivos HPRT e RP32. Vermelho – alta expressão; verde – baixa expressão.

A análise individual entre a expressão gênica de citocinas e a carga molecular parasitária revelou fraca correlação negativa para ambas as citocinas pró-inflamatórias: IFN γ ($r = 0,080$, $p = 0,014$), IL-12 ($r = 0,111$, $p = 0,003$), IL-6 ($r = 0,089$, $p = 0,009$) e TNF ($r = 0,231$, $p < 0,001$); e anti-inflamatórias: IL-10 ($r = 0,099$, $p = 0,006$), TGF β ($r = 0,028$, $p = 0,145$) (**Figura 4.17**). Uma vez que o principal interesse é determinar o papel do parasita na resposta à infecção, a expressão das citocinas foi analisada pela ótica da carga parasitária molecular, que consideramos ser uma análise mais consistente como já apresentado. Assim, no baço, foi observada menor expressão de alguns transcritos nos cães com maior carga parasitária molecular (**Figura 4.18**). Os valores relativos de expressão desses transcritos para os grupos com baixa e alta carga parasitária molecular foram, respectivamente: IL-12 ($0,169 \pm 0,224$ e $0,067 \pm 0,048$, $p = 0,007$), IFN γ ($0,330 \pm 0,165$ e $0,257 \pm 0,113$, $p = 0,059$), TNF ($0,239 \pm 0,145$ e $0,105 \pm 0,048$, $p = 0,00$), IL-6 ($0,262 \pm 0,193$ e $0,136 \pm 0,096$, $p = 0,00$) e IL-10 ($0,480 \pm 0,198$ e $0,372 \pm 0,081$, $p = 0,003$). Não houve diferenças significativas na expressão gênica de IL-27 ($0,009 \pm 0,033$ e $0,013 \pm 0,047$, $p = 0,358$) e TGF β ($0,348 \pm 0,154$ e $0,293 \pm 0,140$, $p = 0,149$).

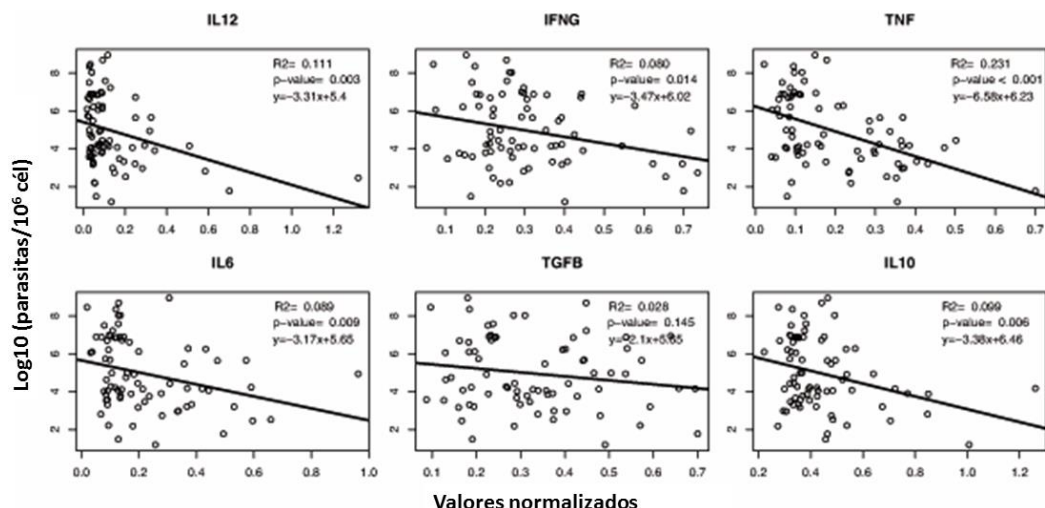


Figura 4.16 Correlação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras/anti-inflamatórias com a carga parasitária esplênica. Análises *ex-vivo* dos níveis de mRNA no baço de cães infectados com *Leishmania infantum* detectado por qPCR para o gene *ssrRNA* de *Leishmania* sp. Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e RP32. Para os valores de carga parasitária, o gene HPRT para DNA canino foi utilizado para normalizar as concentrações iniciais de DNA em cada amostra. $p < 0,05$ indica correlação significativa, teste de correlação de Pearson.

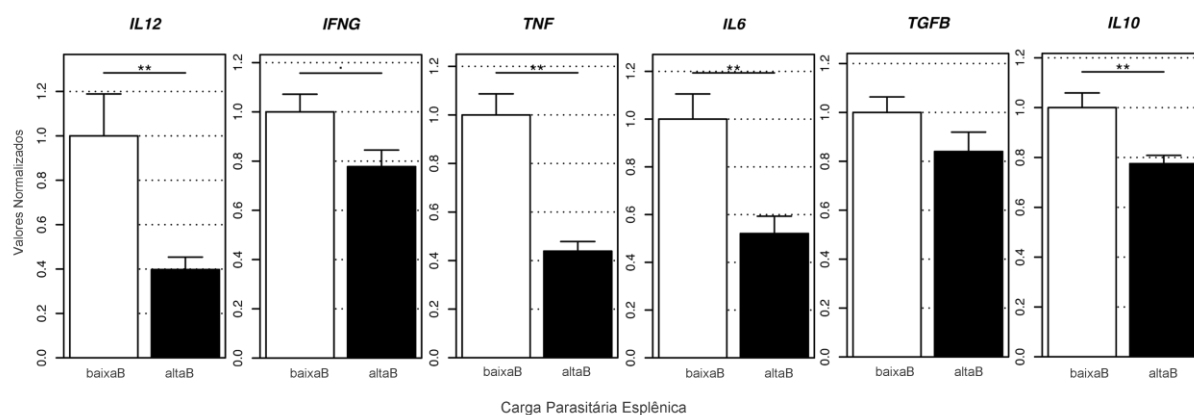


Figura 4.17 Expressão gênica de citocinas no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA baço de cães classificados de acordo com a carga parasitária esplênica em baixa ou alta. Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e RP32. Para os valores de carga de parasita, o gene HPRT para DNA canino foi utilizado para normalizar as concentrações iniciais de DNA em cada amostra. (·) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, teste-T não paramétrico com 1,000 permutações.

4.9 Resposta Imune Hepática

Inicialmente a análise de expressão gênica nas amostras de fígado foi realizada por qPCR. Nesta análise, foram avaliados os genes IFN γ , IL-10, IL-6, IL-12, TGF β e TNF e não foi observada diferença entre os grupos com diferente carga

parasitária molecular. Houve fraca correlação positiva entre a carga e à expressão da IL-6 no fígado (**Figura 4.19**). Posteriormente, utilizou-se a técnica de PCR multiplex em tempo real (multiplex qPCR) através do sistema Biomark de microfluídica (Fluidigm®). Utilizando esse sistema, foi possível analisar simultaneamente 86 genes alvo e seis genes constitutivos nas 90 amostras, totalizando 8.280 reações em algumas horas. Além da vantagem do tempo, pode-se utilizar uma quantidade menor de amostra e de reagentes, em comparação à qPCR. A análise multiplex dos genes revelou maior expressão de CCL2 ($p = 0,008$), CXCL8 ($p = 0,046$) e MAP4K4 ($p = 0,039$) em animais com maior carga parasitária molecular no fígado (**Figuras 4.19 e 4.20**). Nos demais genes analisados (**ANEXO II**) não foi observada diferença quanto ao agrupamento por carga molecular parasitária.

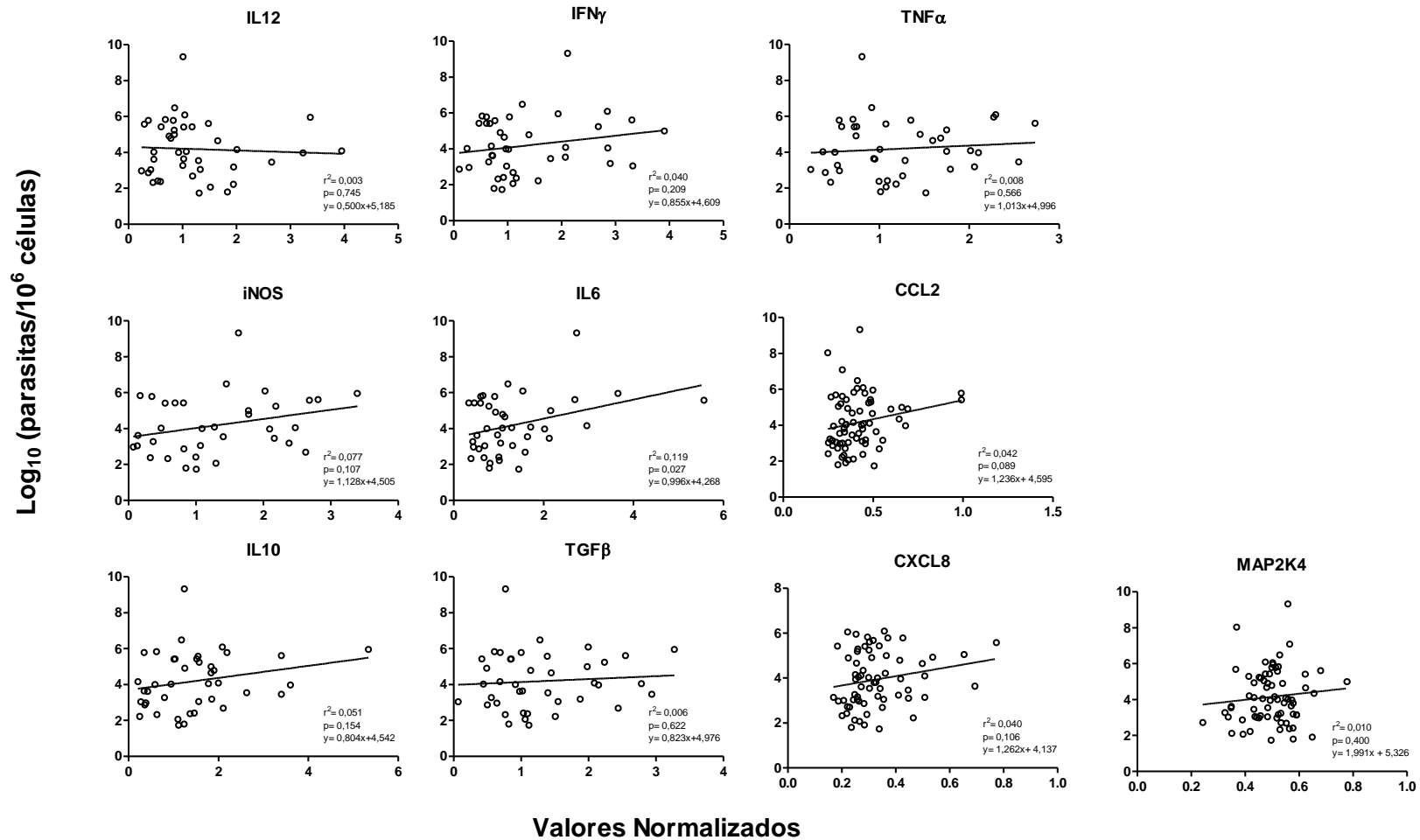


Figura 4.18 Correlação entre a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras/anti-inflamatórias e a carga parasitária molecular no fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e RP32. Para os valores de carga parasitária, o gene HPRT para DNA canino foi utilizado para normalizar as concentrações iniciais de DNA. $p < 0,05$ indica correlação significativa, teste de correlação de Pearson.

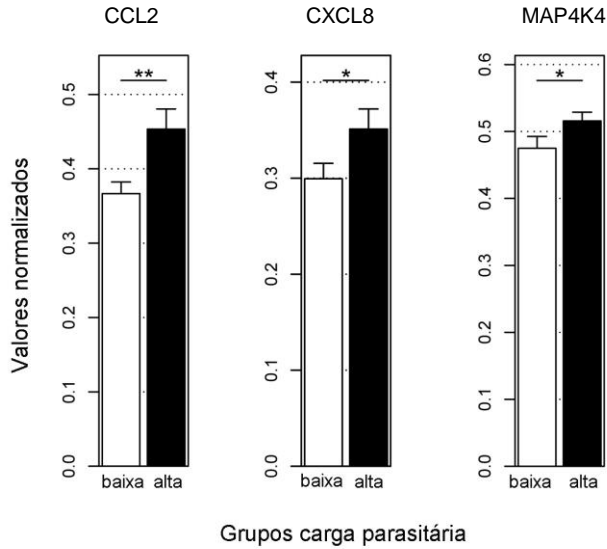


Figura 4.19 Análise *ex-vivo* por qPCR multiplex dos níveis de mRNA no fígado de cães infectados com *Leishmania infantum*. Os cães foram classificados de acordo com a carga parasitária hepática como baixa ou alta. Os valores de expressão de mRNA de citocinas estão normalizados em relação à expressão dos genes HPRT e RP32. Para os valores de carga de parasita, o gene HPRT para DNA canino foi utilizado para normalizar as concentrações iniciais de DNA em cada amostra. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ teste-T não paramétrico com 1,000 permutações.

A expressão gênica de citocinas no baço foi menor do que no fígado. Esse padrão se manteve, independente da carga parasitária molecular ser maior ou menor no fígado (**Figura 4.21**). A organização da polpa branca do baço não dependeu da carga parasitária molecular pareada. No entanto, quando a carga foi maior no fígado, houve maior número de granulomas hepáticos (**Tabela 4.8**).

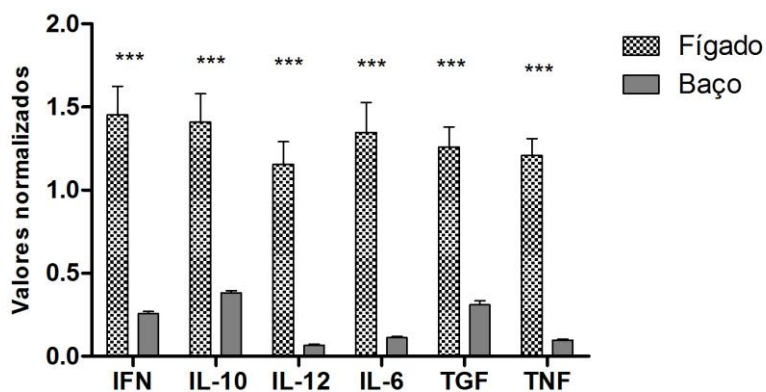


Figura 4.20 Expressão de citocinas no fígado e baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e RP32. (***) $p < 0,001$, teste t pareado.

Tabela 4.8 Achados histopatológicos no baço e fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* e sua relação com a carga molecular parasitária tissular. Os animais foram divididos quanto a relação entre a carga parasitária do baço/fígado do mesmo animal estava maior no fígado (Fígado > Baço) ou menor no fígado (Fígado < Baço).

Parâmetros	Carga Molecular Parasitária Pareada			
	Fígado > Baço	Fígado < Baço	Valor P	
	n	n		
Polpa branca esplênica	organizada	2/9	14/40	0,698
	desorganizada	7/9	26/40	
Granuloma hepáticos**	ausente	2/12	33/49	0,002
	presente	10/12	16/49	

**Valor P estatisticamente significativo, teste exato de Fisher.

4.10 Caracterização das Populações e Genótipos de *L. infantum* através da Análise do Polimorfismo de Microssatélites

A partir do painel de 14 marcadores de microssatélites foi possível determinar a estrutura genética e a diversidade em 31 amostras de tecidos de cães infectados e em seis cepas isoladas de alguns desses cães. Foram incluídas amostras com no máximo três dados perdidos (*missing data*). Além disso, foi considerado nesse estudo o resultado da análise dos mesmos marcadores em 173 cepas de *L. infantum* de outros estados brasileiros e do Paraguai (Ferreira *et al.*, 2012), para possibilitar a identificação da(s) população(ões) representada(s) pelas amostras do presente estudo.

4.10.1 Análise da Diversidade Alélica dos Marcadores de Microssatélites

Nesta análise foram selecionadas 51 amostras provenientes apenas do Mato Grosso. Dentre elas foram incluídas as 37 tipadas neste estudo somadas a 14 selecionadas das 173 analisadas anteriormente (Ferreira *et al.*, 2012). Foram escolhidas 14, por serem provenientes do Mato Grosso.

Foram observados nove marcadores monomórficos (T, B, C, F, Q, R, S, K, I) e cinco polimórficos (L, M, E, G, P). Apesar do alto número de marcadores monomórficos, o número de alelos variou de um a seis. Os marcadores L e M foram os mais polimórficos, com 6 e 3 alelos, respectivamente. Os marcadores E, G e P

apresentaram apenas 2 alelos. Foi observada alta predominância de um determinado alelo para todos os marcadores polimórficos (**Figura 4.22**).

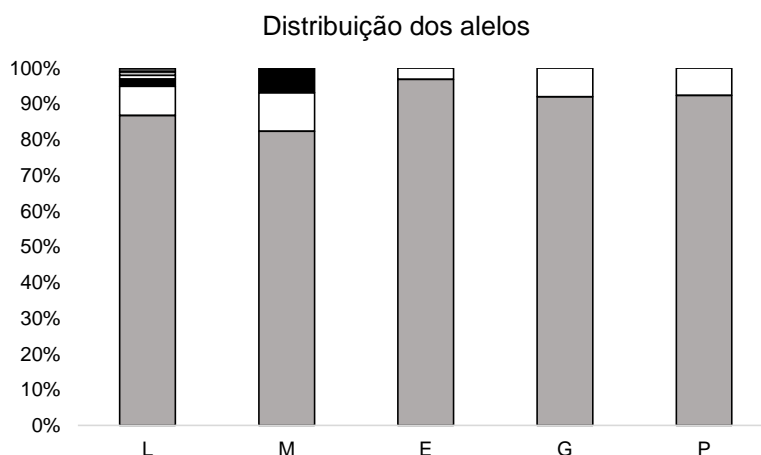


Figura 4.21 Distribuição de alelos nos marcadores de microssatélites em tecidos e cepas de cães infectados com *Leishmania infantum*. L – Lm2TG; M – Lm4TA; E – Li22-35; G – Li45-24; P – Li71-33.

4.10.2 Heterozigosidade

Nas análises de heterozigosidade, foram selecionadas as mesmas 51 amostras citadas acima. Em todos os *loci* polimórficos, a heterozigosidade observada (H_o) foi menor do que a esperada (H_e) (**Tabela 4.9**) indicando um déficit de heterozigotos na amostragem.

Tabela 4.9 Heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) em tecidos e cepas de cães infectados com *Leishmania infantum* nos marcadores de microssatélites. L – Lm2TG; M – Lm4TA; E – Li22-35; G – Li45-24; P – Li71-33.

Locus	H_e	H_o
L	0,243	0,184
M	0,308	0,235
E	0,061	0,021
G	0,149	0,000
P	0,142	0,065
Global	0,181	0,101

Em cinco marcadores (L, M, E, P e I) foram identificadas amostras com dois picos sugestivos de infecção mista ou da presença de heterozigotos (**Figura 4.23**). A partir daqui, estas amostras serão chamadas de picos duplos. No total, oito cepas e

dez amostras de tecido apresentaram picos duplos em um ou mais marcadores. Especificamente, desses 18 DNAs, 11 apresentaram apenas um marcador com pico duplo, quatro apresentaram dois marcadores com picos duplos e três amostras apresentaram três marcadores com esta característica. Considerando os DNAs pareados (amostra de tecido e sua respectiva cepa), foram observados quatro pares discrepantes (**Tabela 4.10**).

Tabela 4.10 Amostras pareadas que mostraram perfis distintos na análise de microsatélites.

Amostra	Marcador	
	Alelo 1	Alelo 2
	L	
cão 257 (tecido baço)	142	142
cão 257 (cepa isolada da medula óssea - IOC/L3219)	142	146
	E	
cão 244 (tecido baço)	97	97
cão 244 (cepa isolada da ascite - IOC/L3207)	97	99
	P	
cão 244 (tecido baço)	106	108
cão 244 (cepa isolada da ascite - IOC/L3207)	108	108
	M	
cão 244 (tecido baço)	76	80
cão 244 (cepa isolada da medula óssea - IOC/L3212)	76	80
cão 244 (cepa isolada do baço - IOC/L3213)	80	80

IOC/L - código da cepa depositada na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz

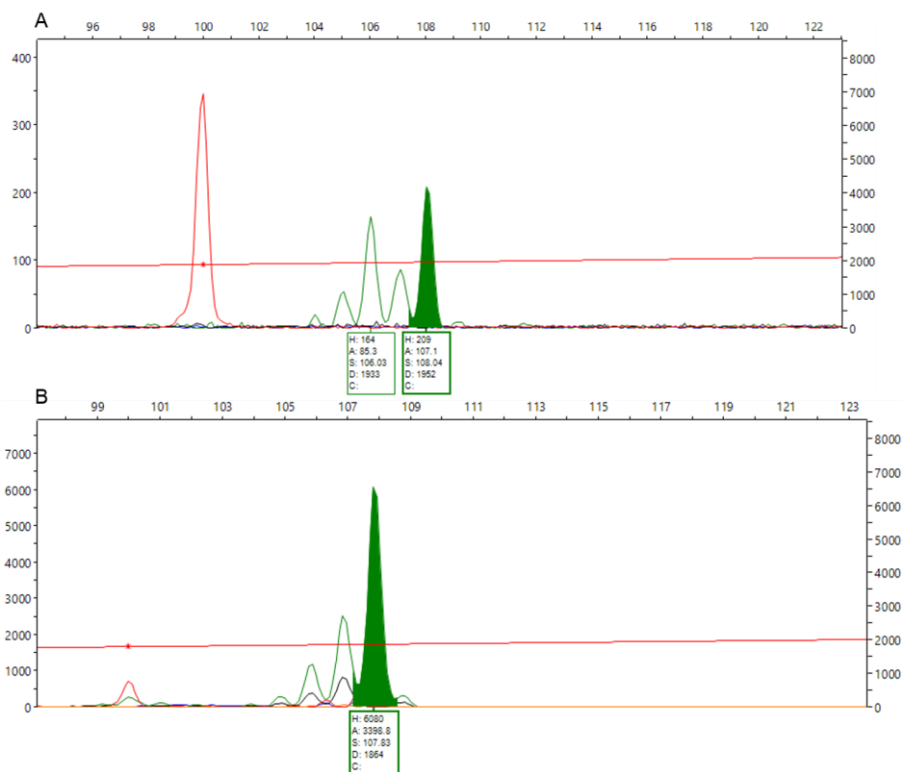


Figura 4.22 Padrão dos picos de marcadores de microssatélites nas amostras de tecido de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. (A) Picos duplos, sugestivos de infecção mista ou presença de heterozigoto; (B) Pico único característico de amostras homozigotas. Imagens obtidas no programa PeakScanner®. Marcador Li71-33 (P).

4.10.3 Grupos de Genótipos

Na análise dos genótipos foram consideradas as 51 amostras, como anteriormente. De acordo com as análises, foram identificados 23 genótipos (G) (**Tabela 4.11**) sendo 18 genótipos únicos. As amostras que apresentaram as genotipagem idênticas foram agrupadas no mesmo tipo, assim, foram denominados como “tipo” os genótipos que são compartilhados por mais de uma amostra.

Na cidade de Cuiabá foi observada a ocorrência de 13 genótipos únicos, e três compartilhados. Em Rondonópolis, ocorreram três únicos e dois compartilhados, sendo um deles (tipo 5) exclusivo desta região. E no município de Barra do Garças, um genótipo único e um genótipo compartilhado (tipo 19) exclusivo desta região (**Figura 4.24**).

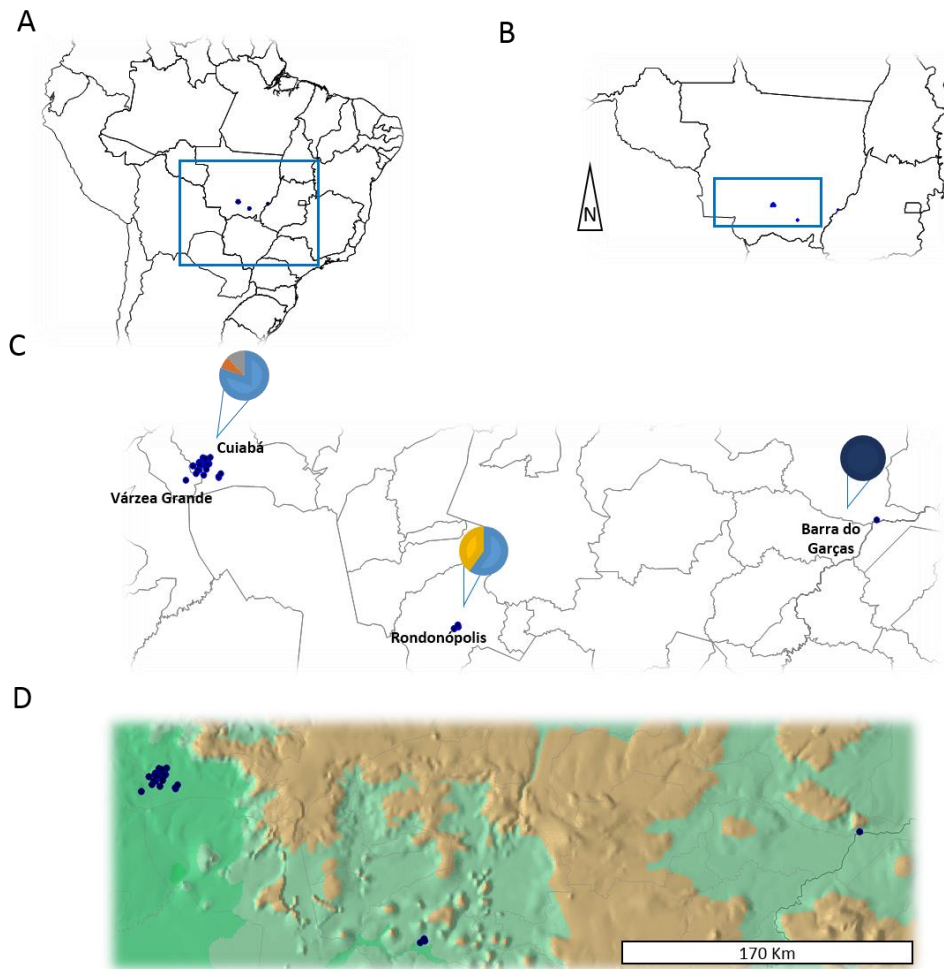


Figura 4.23 Distribuição geográfica dos genótipos de *L. infantum*. (A) Mapa do Brasil e (B) mapa do Mato Grosso com indicação do local de coleta das amostras. (C) Mapa dos municípios de coleta das amostras. Os gráficos em pizza indicam os genótipos compartilhados encontrados na região e os pontos azuis indicam os genótipos únicos. (D) Mapa em relevo da região mostrada em C, com indicação de distância em Km.

4.10.4 Análise das Populações Genéticas definidas pelos Marcadores de Microsatélites

Nesta análise foram incluídas 210 amostras, 37 analisadas neste estudo somadas às 173 analisadas anteriormente por nosso grupo (Ferreira *et al.*, 2012) que indicou a presença de pelo menos três populações de *L. infantum* circulando no Brasil.

O número de grupos foi determinado a partir da análise hierárquica, que consistiu na busca do valor de K no qual os valores de Q se mostraram mais uniformemente distribuídos. Assim, pela análise hierárquica, entre os valores de K

de 2 a 15, foi definido o valor 3 como o que ocorreu o melhor pareamento das amostras, portanto foi considerada a ocorrência de 3 populações (**Figura 4.25**).

A maioria amostras de tecido analisadas foram agrupadas na mesma população (POP 2), não havendo influência do agrupamento nas características fenotípicas do cão analisadas, como sintomatologia e carga parasitária. Apenas um cão foi agrupado na POP 3.

Considerando-se o pareamento de amostras do mesmo animal, apenas uma amostra mostrou discrepância no agrupamento sendo classificadas em populações distintas. A amostra de baço do animal 256 com sintomatologia evidente da doença foi agrupada na POP 2 e sua cepa pareada isolada do baço (IOCL3217) se apresentou 66,5% na POP 3 e 32,3% na POP 1.

Na POP 2 foram identificados 21 genótipos, sendo 16 únicos, para as amostras de tecido e as cepas pareadas isoladas dos mesmos cães. Na POP 1 e na POP 3 foi identificado apenas um genótipo único em cada população, genótipos 8 e 20, respectivamente. Na POP 2 existem 5 tipos: o tipo 1 engloba 23 amostras, o tipo 2 engloba 2 amostras, os tipos 3 e 4 englobam 3 amostras cada um e o tipo 5 que engloba 2 amostras (**Tabela 4.11**).

Na rede filogenética (**Figura 4.26**) podem ser observados os genótipos únicos encontrados em cada população bem como os tipos agrupando mais de uma amostra. De forma geral foi observado que a maioria das amostras da POP 1 foram agrupadas, bem como as das populações 2 e 3. Entretanto não observamos significado estatístico no agrupamento (baixo valor de *bootstrap*).

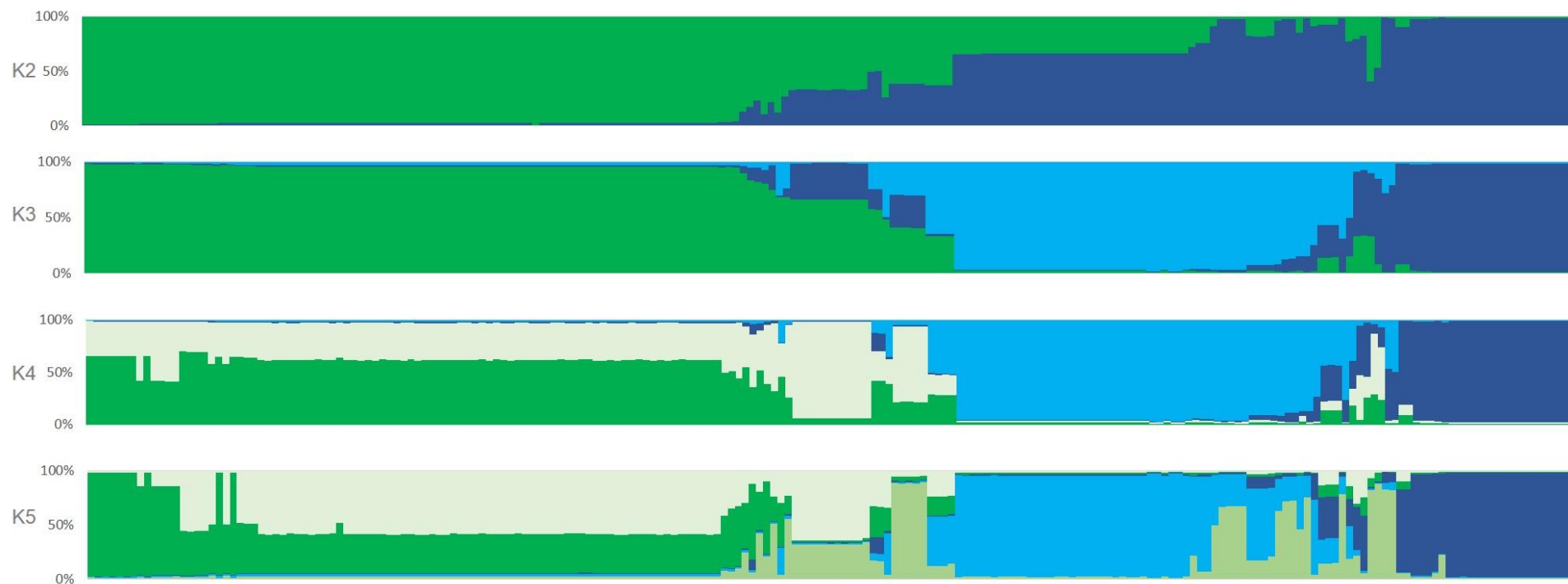


Figura 4.24 Estrutura estimada da população de *Leishmania infantum* inferida pelo programa STRUCTURE com base na amplificação de 14 marcadores de microssatélites de 210 amostras de cepas e tecidos caninos. Os gráficos de barras foram gerados utilizando o programa Excel a partir da distribuição dos valores alinhados de Q para os diferentes valores de K. Segundo análise hierárquica o número mais provável de populações é 3.

Tabela 4.11 Descrição do grupo de amostras analisadas nos ensaios de microsatélites

Código animal	Tipo amostra	IOC/L	Código Internacional	Município (MT)	Bairro	G	POP (k=3)*
110	cepa medula óssea	3131	MHOM/BR/2009/DAIANE-MO	C	Nova Esperança III	1	2
121	cepa fígado	3134	MCAN/BR/2009/GRANDÃO I	R	Carlos Bezerra	2	2
122	cepa medula óssea	3136	MCAN/BR/2009/PATETA	R	Iguaçu	3	2
-	cepa fígado	3211	MCAN/BR/2010/CALSITO II	C	Monte Líbano	6	2
256	cepa baço	3217	MCAN/BR/2010/256 I	C	CPA 2	8	3
257	cepa medula óssea	3219	MCAN/BR/2010/TITÃ I	C	Gamaliel	9	2
-	cepa baço	3224	MCAN/BR/2010/GREG	C	Alvorada	10	2
105	tecido baço	-	-	B	Anchieta	12	2
107	tecido baço	-	-	C	Flor do Cerrado	13	2
118	tecido baço	-	-	VG	Nova Fronteira	14	2
221	tecido baço	-	-	C	Alto da Glória	16	2
239	tecido baço	-	-	C	Jockey Clube	17	2
244	tecido baço	-	-	C	Nova Esperança I	18	2
253	tecido baço	-	-	C	Jardim Vitória	19	2
265	tecido baço	-	-	C	Alvorada	20	1
282	tecido baço	-	-	C	Carumbi	21	2
244	cepa ascite	3207	MCAN/BR/2010/LEAO III	C	Nova Esperança I	22	2
-	cepa medula óssea	3137	MCAN/BR/2009/SOL	R	Jardim Gramado	23	2
104	tecido baço	-	-	B	CPA4	tipo 19	2
104	cepa fígado	3128	MCAN/BR/2009/BOB-FÍGADO	B	CPA4	tipo 19	2
104	cepa baço	3129	MCAN/BR/2009/BOB-BAÇO	B	CPA4	tipo 19	2
231	tecido baço	-	-	C	Gamaliel	tipo 2	2
231	cepa medula óssea	3173	MCAN/BR/2009/BRONCRIS	C	Gamaliel	tipo 2	2
110	tecido baço	-	-	C	Nova Esperança III	tipo 20	2
226	tecido baço	-	-	C	Gamaliel	tipo 20	2
227	tecido baço	-	-	C	Alto da Glória	tipo 20	2
237	tecido baço	-	-	C	Gamaliel	tipo 20	2
240	tecido baço	-	-	C	Alto da Serra	tipo 20	2
241	tecido baço	-	-	C	Jardim Umarama	tipo 20	2
243	tecido baço	-	-	C	Santa Cruz	tipo 20	2
248	tecido baço	-	-	C	Dom Aquino	tipo 20	2
254	tecido baço	-	-	C	Ouro Fino	tipo 20	2
255	tecido baço	-	-	C	Gamaliel	tipo 20	2
256	tecido baço	-	-	C	CPA 2	tipo 20	2
257	tecido baço	-	-	C	Gamaliel	tipo 20	2
261	tecido baço	-	-	C	Bela Vista	tipo 20	2
283	tecido baço	-	-	C	Centro América	tipo 20	2
291	tecido baço	-	-	C	Planalto	tipo 20	2
240	cepa medula óssea	3202	MCAN/BR/2010/AKIRA I	C	Alto da Serra	tipo 20	2
-	cepa baço	3208	MCAN/BR/2010/ZEUS	C	Goiabeira	tipo 20	2
252	cepa baço	3213	MCAN/BR/2010/DIMY II	C	Campo Velho	tipo 20	2
261	cepa fígado	3226	MCAN/BR/2010/CHITARA II	C	Bela Vista	tipo 20	2
-	cepa medula óssea	3227	MCAN/BR/2010/MAGRÃO	C	Jardim Vista Alegre	tipo 20	2

122	tecido baço	-	-	R	Iguaçu	tipo 20	2
129	tecido baço	-	-	R	Jardim Primavera	tipo 20	2
-	cepa medula óssea	3138	MCAN/BR/2009/BRONCRIS	R	Jardim Itapuã	tipo 20	2
245	tecido baço	-	-	C	Jardim Vitória	tipo 3	2
252	tecido baço	-	-	C	Campo Velho	tipo 3	2
252	cepa medula óssea	3212	MCAN/BR/2010/DIMY I	C	Campo Velho	tipo 3	2
121	tecido baço	-	-	R	Carlos Bezerra	tipo 5	2
121	cepa fígado	3135	MCAN/BR/2009/GRANDÃO II	R	Carlos Bezerra	tipo 5	2

IOC/L código da cepa depositada na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz

MHOM indica cepa isolada de hospedeiro humano e MCAN isolada de hospedeiro canino; BR: indica cepa isolada no Brasil

MT: estado de coleta das amostras Mato Grosso.

Município de coleta das amostras: Barra do Garças (B); Cuiabá (C); Rondonópolis (R) e Várzea Grande (VG)

G: genótipo

*POP: população. Classificação de acordo com Ferreira et al. (2012)

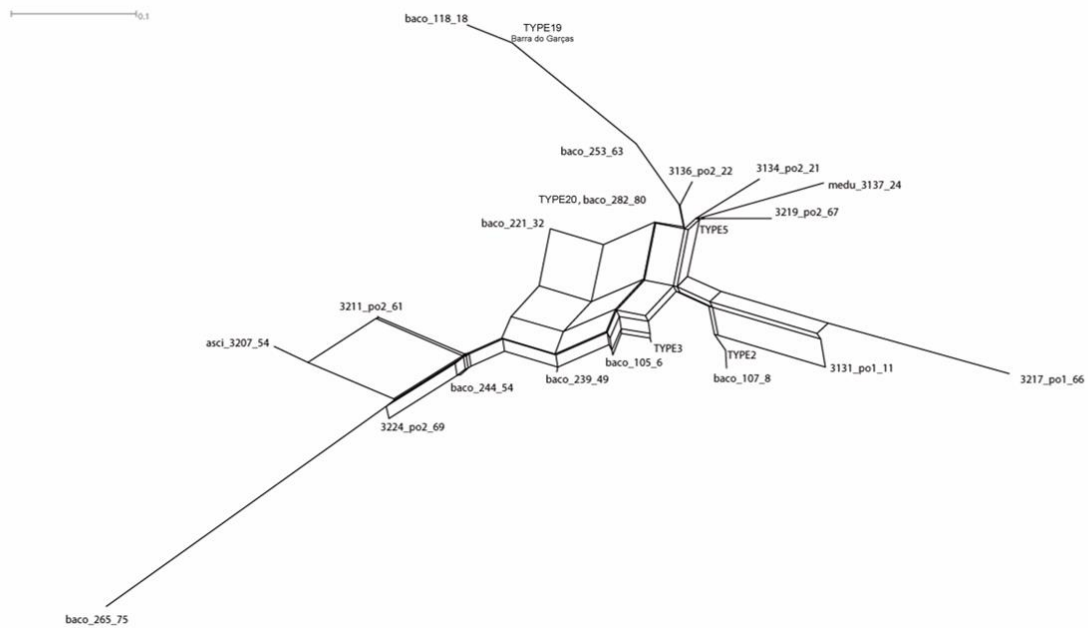


Figura 4.25 Rede filogenética construída no programa *SplitsTree* entre os genótipos de *Leishmania infantum* aplicando-se os valores da matriz de distância. Genótipos idênticos para os 14 marcadores de microssatélites foram agrupados e estão representados por “tipos”.

4.11 Infectividade In Vitro das Cepas Geneticamente Distintas

Foram selecionadas nove cepas com análise genética previamente determinada (Ferreira *et al.*, 2012). Cinco cepas provenientes de Cuiabá (MT) e quatro provenientes de Campo Grande (MS) (**Tabela 4.12**). Foi observada maior taxa de infecção da POP 1 ($24,4 \pm 6,3$) e da POP 2 ($20,0 \pm 5,6$) em relação a POP3 ($14,1 \pm 4,1$). No entanto esse perfil não se manteve nas 48 e 72 horas (**Figura 4.27 A**). Da mesma forma, o número médio de amastigotas por célula infectada foi maior nas cepas da POP 1 (0,5) e da POP 2 (0,5) em relação a POP 3 (0,4) nas 24 horas de infecção (**Figura 4.27 B**). No período total estudado, o número médio de amastigotas nas 400 células contadas por condição, foi 186,1 na POP 1, 201,1 na POP 2 e 156,1 na POP 3 (**Figura 4.28**). Os pontos polares da infecção dos macrófagos estão representados (**Figura 4.29**).

Tabela 4.12 Descrição das cepas analisadas

População	IOC/L	Código Internacional	Local de origem
POP 1	3131	MCAN/BR/2009/DAIANE-MO	Cuiabá / MT
	3217	MCAN/BR/2010/256 I	Cuiabá / MT
	3033	MCAN/BR/2007/CG-1	Campo Grande / MS
POP 2	3202	MCAN/BR/2010/AKIRA I	Cuiabá / MT
	3208	MCAN/BR/2010/ZEUS	
	3226	MCAN/BR/2010/CHITARA II	
POP 3	2651	MHOM/BR/2003/MAM	Campo Grande / MS
	3035	MCAN/BR/2007/CG-2	
	2664	MCAN/BR/2002/LVV-135	

*POP: população. Classificação de acordo com Ferreira *et al.* (2012)

IOC/L código da cepa depositada na Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz

MHOM indica cepa isolada de hospedeiro humano e MCAN isolada de hospedeiro canino

BR: indica cepa isolada no Brasil

Estado de coleta das amostras Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS).

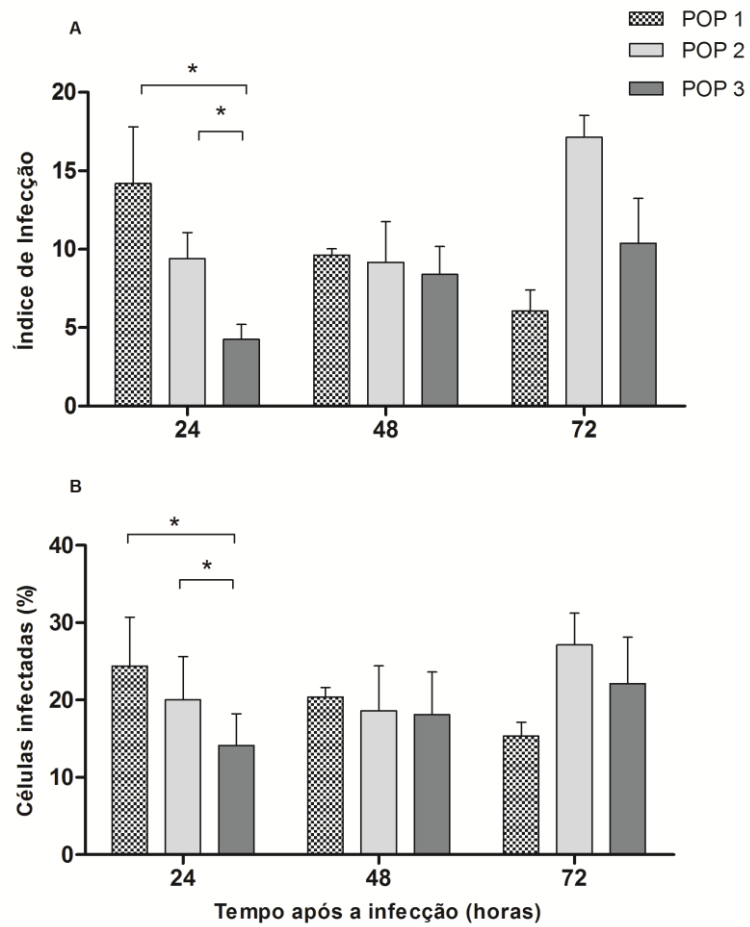


Figura 4.26 Índice de infecção (A) e percentual de células infectadas (B) com cepas de *L. infantum*. As cepas foram agrupadas em três populações geneticamente distintas (Ferreira et al., 2012).

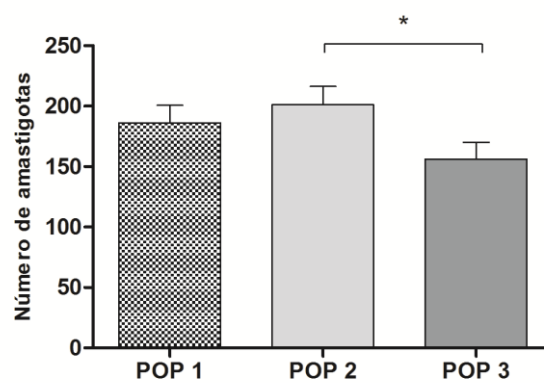


Figura 4.27 Número médio de amastigotas por 400 células DH82. As cepas de *Leishmania infantum* foram agrupadas em três populações geneticamente distintas (Ferreira et al., 2012).

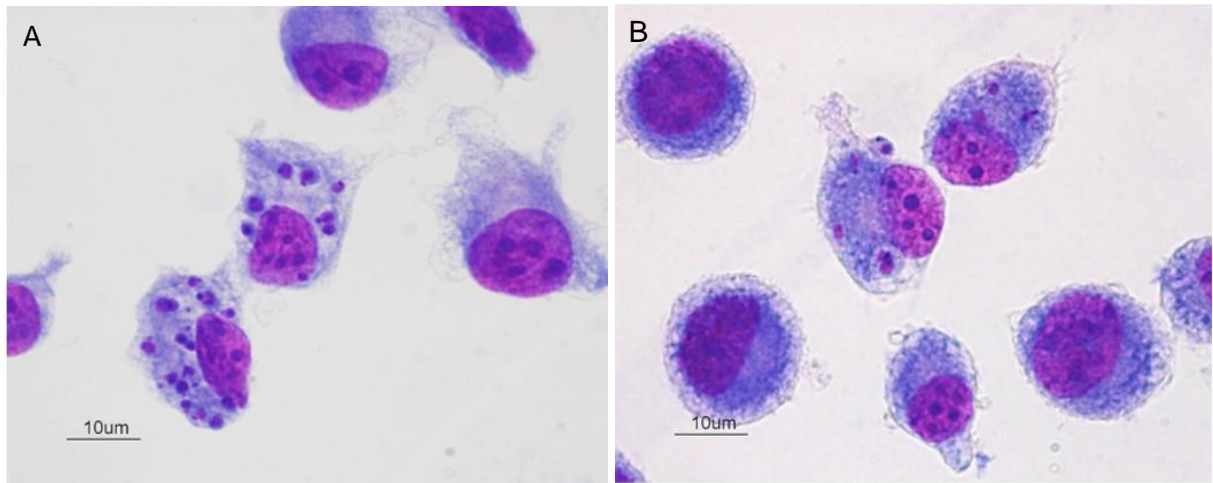


Figura 4.28 Infecção de macrófagos da linhagem DH82 por cepas geneticamente distintas de *L. infantum*. Cepas classificadas como POP 1 (A) e POP 3 (B). Microscópio óptico, 400X, barra de calibração 10µm.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo é uma avaliação transversal de noventa e dois cães com infecção natural por *L. infantum*. O grupo de animais é heterogêneo, o que reflete a realidade das populações canina e humana (considerando o cão como um modelo). Foi reunida uma série de dados que, em conjunto, mostram que na região estudada a Leishmaniose Visceral Canina é causada por uma população de parasitos geneticamente homogênea não tendo sido observada nenhuma correlação entre genótipos específicos do parasito e o fenótipo da infecção canina. Uma parte dos resultados gerados foi submetida à publicação (**ANEXO V**). Embora *ex vivo* não tenha sido observada associação entre as populações genéticas do parasita e os caracteres clínicos, os dados gerados pelos ensaios *in vitro* sugerem que há diferenças na infectividade entre cepas com genótipos de microssatélites distintos.

5.1 Apresentação Clínica da LVC e Confirmação Diagnóstica

A apresentação clínica da LVC varia amplamente. Os diversos sinais clínicos observados durante o presente estudo confirmam as observações já descritas previamente (Ferrer; Quinnell, Courtenay, Shaw, *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2004; Manna *et al.*, 2009; Coura-Vital *et al.*, 2011; Michelin *et al.*, 2011). Observou-se o predomínio de alterações cutâneas, como mostrado em outros estudos (Lima *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2006). Essa variabilidade da apresentação clínica é interpretada distintamente entre autores, levando a classificações não uniformes. Para este trabalho, os animais foram avaliados de acordo com duas metodologias, o que mostrou que os critérios escolhidos podem alterar significativamente os resultados dos parâmetros avaliados na infecção.

Seguindo a classificação semiquantitativa foi observada diferença na positividade dos testes DPP®LVC, ELISA e na cultura, particularmente quando utilizada amostra da medula óssea. Enquanto na classificação qualitativa, foi

detectada diferença entre os grupos clínicos no teste DPP®LVC e na cultura. Assim, infere-se que nesses testes, a proporção de positividade é dependente da apresentação clínica da infecção.

Quanto aos resultados da cultura de parasitos, com uso de ambas as metodologias de classificação clínica observou-se maior positividade no isolamento de material proveniente de animais com maior escore clínico, assim como relatado por (Manna *et al.*, 2006). De acordo com Madeira e colaboradores (Madeira *et al.*, 2009), baço, linfonodo e medula óssea são os materiais biológicos com taxa mais elevada de culturas positivas. Aqui foi observado que a medula e o baço são os órgãos com maior taxa de positividade. Em outro estudo (Maia *et al.*, 2009), 77,1% das culturas de baço, linfonodo e medula óssea coletadas tornaram-se positivas na primeira semana e 23% das amostras na segunda e terceira semanas, reforçando a necessidade de subcultura, pelo menos até a 3ª semana. Nas amostras deste estudo, o cultivo em meio bifásico para isolamento foi mantido por até quatro semanas com adição semanal de meio fresco, seguindo o protocolo de isolamento da CLIOC. Devido aos resultados satisfatórios da cultura a partir de amostras de baço, alguns autores recomendam seu uso como o órgão de escolha para o diagnóstico parasitológico da infecção por *Leishmania* (Barrouin-Melo *et al.*, 2004); (Rosypal *et al.*, 2005). No entanto, o procedimento invasivo para coletar o material biológico é uma razão válida para evitá-lo, podendo-se assim, utilizar o aspirado de medula óssea ou de linfonodo. No nosso estudo a positividade de 22,8% no aspirado esplênico é baixa, o que pode ter ocorrido em função da distância do local de coleta das amostras para o laboratório. Apesar de 100% específica, as culturas são hoje menos utilizadas para o diagnóstico, devido à demora no resultado, à suscetibilidade de contaminação microbiológica, à dependência da carga parasitária e, por vezes, à má adaptação da cepa ao meio. Por outro lado, ainda é necessária para obter um número suficiente de parasitos para identificação enzimática (MLEE) ou mesmo para algumas técnicas moleculares.

Todos os isolados obtidos foram identificados como *L. infantum*. É importante destacar a relevância da identificação das espécies de *Leishmania* em reservatórios domésticos, principalmente nas áreas de infecção mista, com

a presença de espécies simpátricas, como ocorre em Cuiabá, MT, Brasil (De Santis *et al.*, 2011) (**ANEXO VI**). Mesmo em áreas de transmissão esporádica como no Rio de Janeiro (Marzochi *et al.*, 1985; De Paula *et al.*, 2009; Figueiredo *et al.*, 2010), a identificação da espécie é fundamental para a vigilância das leishmanioses, uma vez que casos clínicos atípicos podem ocorrer em função de características das cepas (Cavalcanti *et al.*, 2012) (**ANEXO VII**).

Apesar da diferença na positividade na cultura, nos testes moleculares os não foi observada diferença quanto à apresentação clínica em nenhuma das classificações utilizadas. Na fase inicial da infecção, antes da soroconversão, a detecção do parasita só é possível através de PCR, pois nesta fase os cães não apresentam parasitismo consistente, tendo também poucas chances de infectar flebotomíneos (Courtenay *et al.*, 2002). Outros autores também já haviam demonstrado que a infectividade tem correlação positiva com a gravidade da doença (Quinnell e Courtenay, 2009), sendo quatro vezes maior em cães sintomáticos (Michalsky *et al.*, 2007), refletindo assim o parasitismo nesses animais. Mais importante, os autores mostraram que o parasitismo cutâneo não é crucial para a infectividade, mas sim o parasitismo dos linfonodos. Assim, a detecção molecular de parasitos nos tecidos alvo, como baço e linfonodo, de animais assintomáticos é fundamental. Os resultados positivos nos ensaios moleculares no grupo de animais assintomáticos (ou com baixo escore clínico) pode indicar que esses animais são mais resistentes ao desenvolvimento da doença ou que houve apenas o contato com o parasita, para tanto seria necessária uma análise realizada ao longo da infecção.

Nos ensaios direcionados para a amplificação de fragmento do gene codificante da proteína do choque térmico (hsp70), 17/92 animais tiveram resultados negativos, ao passo que apenas 1/92 foi negativo em relação ao kDNA. Segundo a interpretação do índice kappa por Landis e Koch (Landis e Koch, 1977), o índice de concordância entre esses testes foi fraco (kappa 0,092), independente da apresentação clínica. Uma razão para esse resultado seria a baixa sensibilidade, pois todos, exceto um, que são hsp70 positivo são kDNA positivos. Dessa forma, neste estudo, a PCR hsp70 com 234pb conjugada à restrição de fragmentos por enzimas (RFLP) se mostrou uma

valiosa ferramenta para a confirmação etiológica da LVC, porém com menor sensibilidade quando comparada à PCR do kDNA. Adicionalmente, o percentual de positividade independe da apresentação clínica, o que representa uma vantagem para detecção da infecção em cães assintomáticos. Vale ressaltar que outros métodos comprobatórios foram utilizados para confirmar a infecção por *L. infantum* nos animais incluídos no estudo.

Na LVC, a proliferação intensa de linfócitos B e a produção abundante de anticorpos são relatadas, porém essa ativação policlonal de linfócitos B é deletéria e não protetora (Almeida *et al.*, 2005b). Neste estudo, foi possível distinguir com clareza os grupos com maior e menor escore clínico em relação à síntese de IgG. Nos animais com escore mediano (3-6) a distinção não foi marcante, o que pode indicar a transição do *status* desse animal. Na análise com dois grupos clínicos, não foi observada diferença. Outros estudos também apontam para a correlação entre os níveis de IgG e a sintomatologia em cães com LVC (Moreno e Alvar, 2002; Quinnell, Courtenay, *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2005a; Porrozzi *et al.*, 2007; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007).

Aqui a positividade pelo teste DPP®LVC mostrou-se dependente da apresentação clínica em ambas as classificações. Epidemiologicamente, esse achado ganha importância, pois a probabilidade de um cão infectado se tornar infeccioso para o flebotomíneo está diretamente relacionada ao aumento dos títulos de IgG (Courtenay *et al.*, 2002). Em outro estudo, porém, não foi observada correlação entre a positividade no teste e a apresentação clínica (Castro-Junior *et al.*, 2014). É importante denotar que a sensibilidade dos testes diagnósticos pode variar durante o curso da infecção (Mettler *et al.*, 2005). De fato, estudos que se baseiam em infecção natural podem gerar resultados controversos, especialmente quando os animais são divididos em grupos clínicos, uma vez que o *status* assintomático pode representar resistência ou fase inicial da infecção (Oliva *et al.*, 2006). O teste DPP®LVC foi recentemente introduzido e o sucesso da implementação no sistema público ainda depende de melhorias na acurácia (Schubach *et al.*, 2014). No entanto, no fluxo da vigilância da doença no contexto, brasileiro a facilidade de uso e a rápida interpretação do resultado ainda superam essa desvantagem. A performance do teste rápido e do ELISA foi diferente no critério qualitativo de

classificação clínica. Como descrito (Rosario *et al.*, 2005; Porrozzi *et al.*, 2007), a performance dos testes sorológicos pode variar com o tipo do antígeno ou com os reagentes.

A concordância total entre os dois testes sorológicos foi moderada (0,475, $p < 0,001$) e entre o diagnóstico molecular por hsp70 e os testes sorológicos ELISA e DPP®LVC foi muito fraca, apresentando baixos valores de kappa. O padrão epidemiológico influencia fortemente os resultados sorológicos e moleculares. Costa e colaboradores (Costa *et al.*, 2014) observaram concordância perfeita entre o DPP®LVC e a PCR-kDNA em Campinas, onde o parasita foi recentemente introduzido, e fraca em Teresina, onde a Leishmaniose é endêmica. Já a correlação entre o ELISA e a PCR foi razoável em Campinas e fraca em Teresina. A maioria dos animais utilizados no presente estudo são provenientes de Cuiabá onde a prevalência da infecção é alta variando de 22,1% a 26,8% (Mestre *et al.*, 2011; De Almeida Ado *et al.*, 2012) e onde ocorrem casos de LVH persistente há algumas décadas, padrão semelhante ao da cidade de Teresina.

Embora alguns dados da literatura mostrem que os títulos de IgM específicos para *Leishmania* permanecem altos ao longo da infecção, não há relação com a apresentação clínica, não sendo por isso um bom marcador (Reis, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2006). No presente estudo, foram observados títulos de IgM mais altos nos animais menos sinais clínicos em ambas as classificações, o que sugere uma infecção mais recente nesses animais, é portanto improvável que se trate de animais mais resistentes.

A definição do *status* de infecção depende da sorologia e do diagnóstico direto por PCR, pois o isolamento do parasita pode ser influenciado por fatores como contaminação, carga parasitária, tipo do tecido coletado e tempo para processamento do material. Em se tratando de animais naturalmente infectados e pelo fato do desenho escolhido tratar-se de uma amostragem de conveniência, a interpretação dos resultados é complexa. Portanto, foram incluídos no estudo todos os animais com pelo menos um teste parasitológico positivo.

5.2 Parasitismo Tissular em Cães Naturalmente Infectados com Leishmania infantum

O baço é um dos principais órgãos-alvo do parasitismo nas leishmanioses viscerais (Mebius e Kraal, 2005) albergando alta carga de parasitos (Strauss-Ayali *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2012). Diversos estudos já demonstraram correlação positiva entre a carga parasitária e as manifestações clínicas, sendo mais evidente nas formas mais graves da doença (Barrouin-Melo *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2004; Francino *et al.*, 2006; Lage *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2009; Manna *et al.*, 2009; Teixeira Neto *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013). Neste estudo, foram adotadas duas classificações clínicas e, independentemente do método de classificação, os animais com maior sintomatologia apresentaram maior carga parasitária molecular (CP) no baço. Foi observada maior CP no baço do que no fígado, como já demonstrado (Michelin *et al.*, 2011), entretanto com fraca correlação positiva entre os dois tecidos o que denota a dinâmica da infecção. É possível que a alta CP esplênica seja consequência da constante chegada de nova carga de parasitos, proveniente de outros tecidos (Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Os melhores tecidos para avaliação da carga são, nessa ordem: medula óssea, baço, linfonodo, pele e fígado (Reis, Martins-Filho, *et al.*, 2006). Neste estudo foi avaliada a carga parasitária nos dois órgãos de interesse, baço e fígado, para a posterior correlação com a resposta celular.

Em camundongos, no início da infecção o fígado tem maior CP e a indução da formação de granulomas controla a CP com o tempo. Já a evolução da doença está relacionada com a alta CP esplênica (Leclercq *et al.*, 1996). Nesses animais a eliminação parasitária no fígado ocorre em torno de 4 semanas após a infecção (Engwerda *et al.*, 1998; Rousseau *et al.*, 2001). Considerando a CP pareada nos dois órgãos estudados, poderíamos sugerir que a baixa CP esplênica associada a alta CP hepática reflita um estágio inicial de infecção; já a CP esplênica mais alta associada a hepática mais baixa pode refletir um estágio avançado da infecção.

Os sinais clínicos em animais naturalmente infectados podem ser resultado de variáveis que incluem diversas comorbidades, estado nutricional e

suscetibilidade genética. Nos estudos com populações de cães errantes não é possível ter o controle de todos esses fatores e os sinais clínicos da LVC são bastante inespecíficos. A classificação de cães infectados por *L. infantum* com base em critérios clínicos é imprecisa, especialmente quando se pretende avaliar a resposta imune. Entendendo que a resposta imune está diretamente relacionada ao agente etiológico, os animais foram divididos de acordo com a CP. Assim, dois grupos foram definidos para cada tecido analisado – dois grupos considerando a CP esplênica e dois grupos considerando a CP hepática. Outros autores propuseram o agrupamento dos animais em função da CP em comparação a apresentação clínica mostrando diferenças entre os dois agrupamentos (Reis, Martins-Filho, *et al.*, 2006; Do Nascimento *et al.*, 2013). A proposta de separação dos grupos em função da CP, o número de animais e os valores mínimo e máximo, pode ser um denominador comum para os diferentes grupos de pesquisa e uma forma mais acurada do que a apresentação clínica para a avaliação da infecção canina.

No tocante à resposta imune humoral, foi observada tendência a maior frequência de cães positivos para IgG em função da CP esplênica. Para a IgM observou-se o oposto, com tendência à diminuição na frequência de positivos. Da mesma forma, Reis e colaboradores (Reis, Martins-Filho, *et al.*, 2006) demonstraram correlação positiva entre a síntese de anticorpos IgG e a carga parasitária na pele, na medula óssea, no baço, no fígado e linfonodos. Para a IgM, os autores observaram correlação com a alta carga parasitária apenas no fígado e nos linfonodos. Devido a especificidade do antígeno utilizado no teste rápido, é possível inferir que a hipergamaglobulinemia é altamente específica ao parasita e que nos animais com maior carga parasitária a resposta imune humoral é direcionada a leishmânias do complexo donovani.

5.3 Expressão Gênica de Citocinas Tissulares e Aspectos Histopatológicos de Cães Naturalmente Infectados

Nos animais com maior CP foi observada resposta imune celular esplênica heterogênea, com maior redução na expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias (IFN γ , TNF, IL-12 e IL-6) do que das anti-inflamatórias (IL-10 e

TGFβ). Na doença humana ativa o sistema imune não é suprimido, mas sim altamente ativado, principalmente nos órgãos alvo do parasita, como baço, fígado e medula óssea, onde há concentração das células envolvidas na resposta imune específica (Goto e Prianti, 2009).

Na LVC, ocorre aumento tanto na expressão esplênica como na síntese sérica das citocinas pró-inflamatórias IFNγ e TNFα em cães com baixo parasitismo esplênico e aumento de IL-10 nos cães com maior carga parasitária (Do Nascimento *et al.*, 2013). Os autores sugerem que há um balanço entre essas citocinas e que o perfil de uma resposta Th1 contribui para o controle parasitário e determina o resultado clínico.

Da mesma forma, a resistência clínica tem sido associada à expressão predominante de citocinas Th1, tais como IL-2, IFNγ e TNFα e a susceptibilidade e a persistência do parasita tem sido caracterizadas pelo predomínio de citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-10 (Boggiatto *et al.*, 2010). Os resultados apresentados aqui não sustentam tais associações, mostrando uma resposta mista à infecção, como demonstrado em outros estudos (Correa *et al.*, 2007; Lage *et al.*, 2007; Strauss-Ayali *et al.*, 2007; Panaro *et al.*, 2009). Foi observada menor redução na expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória/reguladora, sugerindo sua maior disponibilidade no tecido com maior CP. Provavelmente uma complexa rede de interações ocorrem no baço destes animais culminando na desativação de linfócitos para limitar a magnitude da resposta imune. Em infecções virais e parasitárias (Wherry, 2011; Bhadra *et al.*, 2012), inclusive na LV (Gautam *et al.*, 2014), ocorre um fenômeno denominado exaustão celular, mediado principalmente pela expressão da proteína de morte programada (“programmed cell death 1”, PD-1) e que pode estar relacionado à forte imunossupressão observada em estágios avançados da doença. Recentemente foi demonstrada a exaustão de células T do sangue periférico de cães com LV com consequente redução da expressão de citocinas (Esch *et al.*, 2013). Neste contexto, a redução geral da expressão de citocinas observada pode também estar relacionada ao esgotamento induzido pelo excesso de antígeno em circulação em animais com alta carga parasitária.

O aumento da CP esplênica foi correlacionado a perda da microarquitetura do tecido. Foi observada desde uma polpa branca bem organizada até a ocorrência de uma estrutura extensivamente desorganizada, que consistiu em alterações hiper e hipoplásicas e alterações na estrutura folicular. Os vários níveis de desorganização da polpa branca foram correlacionados com o aumento da CP. Essa quebra da arquitetura esplênica na LV já foi demonstrada em humanos (Veress *et al.*, 1977; Saxena *et al.*, 2011); (Engwerda *et al.*, 2004; Yurdakul *et al.*, 2011; Raeymaeckers *et al.*, 2012) e na infecção canina (Sanchez *et al.*, 2004; Santana *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). Ademais, o desenvolvimento da patologia esplênica está associado à progressão da doença (Santana *et al.*, 2008) e aos altos níveis de TNF (Engwerda *et al.*, 2002).

Com o uso de um sistema multiplex de análise de expressão gênica, foi avaliada a expressão de genes relacionados à resposta imune, à síntese de proteínas, ao desenvolvimento e morte celular, ao metabolismo lipídico, ao movimento celular e à bioquímica de pequenas moléculas. Deste modo, foi observado que a expressão das quimiocinas CCL2, CXCL8, bem como da proteína kinase MAP4K4, foi regulada positivamente nos animais com maior CP. Deve-se ressaltar que, no fígado, a CP está relacionada à presença ou formação de granulomas, e as moléculas quimiotáticas são importantes no recrutamento e ativação dos leucócitos.

Em experimentos *in vitro* com macrófagos humanos infectados por *L. infantum* e estimulados com CCL2 foi demonstrada maior síntese de óxido nítrico, aumentando a capacidade das células de eliminar o parasita (Brandonisio *et al.*, 2002). Adicionalmente, as quimiocinas CCL2 e CCL3 aumentam a capacidade leishmanicida dos macrófagos humanos infectados com *L. infantum* mediada pela síntese de óxido nítrico (Bhattacharyya *et al.*, 2002). Esses resultados *in vitro* sugerem que o aumento dessas quimiocinas estaria relacionado ao controle da CP. Nos nossos resultados, o aumento da expressão gênica de CCL2 representa um momento da infecção anterior ao controle da CP, onde a indução da expressão gênica precede a síntese da proteína efetora. Na Leishmaniose cutânea também já foi proposto que as quimiocinas CCL2, CCL4 e CCL5 atuam não apenas como fatores

quimiotáticos mas como co-ativadores de macrófagos e, conseqüentemente, podem desempenhar um papel na eliminação de parasitos (Ritter *et al.*, 1996; Dorner *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2003).

Na LVC, cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentam correlação positiva entre a expressão de CCL2 e CXCL8, a CP e o número de macrófagos na pele (Menezes-Souza *et al.*, 2012). Da mesma forma, há aumento de CCL2 no baço dos cães infectados em relação àqueles não infectados (Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Sendo assim, demonstram que os mecanismos de controle da CP envolvem quimiotaxia e ativação de leucócitos, e que CCL2 e CXCL8 possuem um papel central neste contexto.

Os membros da grande família das proteínas MAP kinases atuam como uma cascata de sinalização em resposta a sinais extracelulares que incluem fatores de crescimento, hormônios, citocinas, bem como fatores de estresse celular (Chang e Karin, 2001). Essa cascata de sinalização está envolvida em uma grande variedade de processos celulares como proliferação, diferenciação, ciclo celular, regulação da transcrição e desenvolvimento. A proteína kinase de ativação mitogênica MAP4K4 (“mitogen-activated protein kinase kinase 4”) é um componente da cadeia de ativação das proteínas MAP kinases em resposta ao estresse ambiental, às citocinas pró-inflamatórias e aos sinais de desenvolvimento celular (Whitmarsh e Davis, 2007). Em mamíferos já foram identificadas quatro vias de ativação das MAP kinases, e a MAP4K4 especificamente pode ativar as vias JNK e p38 (Kyriakis e Avruch, 2001). Na infecção *in vitro* de macrófagos murinos com promastigotas de *L. mexicana* ocorre a ativação da via de sinalização MAP kinase via TLR-4 com conseqüente indução da expressão de COX-2, iNOS e arginase 1 e que essas moléculas por sua vez, inibiram a síntese de IL-12 da célula hospedeira (Shweash *et al.*, 2011). Em modelo *in vitro* de infecção com *L. infantum*, a síntese de IL-12, TNF α e NO é regulada pela fosforilação das MAP kinases levando a eliminação dos parasitos intracelulares (Agallou *et al.*, 2014). Aqui foi demonstrado que a maior expressão de MAP4K4 em animais com maior carga parasitária indica indução da expressão dessa proteína em resposta à infecção. As demais moléculas não foram diferencialmente expressas em nenhum dos agrupamentos realizados e o padrão de expressão de citocinas revelou mais

uma vez a resposta mista, não sendo possível determinar o envolvimento de alguma delas na resistência ou suscetibilidade à evolução da infecção.

Os dados de produção de citocinas na LVC são limitados e algumas vezes controversos (Maia e Campino, 2012), principalmente no fígado, onde poucos trabalhos têm se concentrado. Há diferenças na expressão de TNF α , IL-4 e IL-10 entre cães infectados e animais sadios, sem distinção em relação a apresentação clínica (Michelin *et al.*, 2011). Estes autores verificaram ainda que o fígado foi o principal órgão produtor de citocinas. Estudos visando à validação destes resultados em termos de síntese das quimiocinas e de MAP4K4 deverão ser realizados para um melhor entendimento do papel destas moléculas na resposta imune hepática de cães com LVC.

Em modelos experimentais, o fígado é um órgão alvo para o estudo de mecanismos efetores de proteção, pois a formação de granulomas é uma reação deste órgão para controlar a proliferação de parasitos (Stanley e Engwerda, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008). Aqui, foi demonstrado que animais com maior CP hepática apresentam infiltrado inflamatório intenso e maior formação de granulomas. A presença de granulomas também é observada na LVH (Geramizadeh *et al.*, 2011). No modelo murino, o TNF α e o INF γ estão diretamente envolvidos na formação dos granulomas hepáticos (Stanley e Engwerda, 2007).

Paralelamente, os achados histopatológicos no fígado mostram os efeitos inflamatórios da presença do parasita bem como a indução da formação de granulomas. Da mesma forma, Melo e colaboradores (Melo *et al.*, 2009) mostraram que no fígado de cães assintomáticos e sintomáticos, ocorre uma reação inflamatória crônica caracterizada por infiltração de células mononucleares no espaço portal e parênquima hepático, bem como a formação de granulomas. Os mesmos achados também foram relatados em cães experimentalmente infectados com leishmanias do complexo *donovani* (Gonzalez *et al.*, 1988; Oliveira *et al.*, 1993; Tafuri *et al.*, 1996). Neste trabalho, verificou-se que os granulomas hepáticos foram mais numerosos em cães com maior CP, independente dos sinais clínicos. Em um estudo com cães naturalmente infectados, a análise histomorfométrica mostrou que o parasitismo diminui com o aumento do diâmetro do granuloma (Lima *et al.*,

2007). Aqui, os animais foram agrupados de acordo com a CP desconsiderando a fase de maturação dos granulomas, assim não é possível dizer se a maior CP estaria associada a granulomas menores, como no estudo de Lima e colaboradores. Sugere-se que a maior CP no fígado associada a igual ou menor CP no baço reflita os momentos iniciais da infecção e que os granulomas em formação ainda não foram capazes de reduzir e controlar a CP.

No modelo murino de infecção com *L. donovani*, os granulomas estão totalmente desenvolvidos dentro de duas a quatro semanas após a infecção e com oito semanas estão estrutural e funcionalmente maduros com mecanismos leishmanicidas ativados (conhecidos como granulomas estéreis). Após este tempo os granulomas estéreis passam gradualmente por um processo de involução (Stanley e Engwerda, 2007). Aqui, a observação de animais com menor CP e menos granulomas poderia ser em função da involução dos granulomas. No modelo de infecção por *L. major*, a cura estéril nunca é alcançada e a persistência do parasita no fígado medeia a imunidade no longo prazo tornando o órgão resistente à reinfecção (Belkaid *et al.*, 2002). A ocorrência de fibrose com intensa deposição de colágeno ocorre em fases mais avançadas da infecção (Melo *et al.*, 2009), comprometendo a função hepática. Assim, uma avaliação mais completa, incluindo colorações para tecido fibroso e seus marcadores poderia ser útil e auxiliaria na definição da evolução.

De forma geral, foi observada maior expressão de citocinas no fígado do que no baço. Esse achado, corrobora dados já observados em que há maior síntese de IL-10, IL-4, IFN γ e TNF no fígado do que no baço (Correa *et al.*, 2007, Michelin, 2011 #407; Michelin *et al.*, 2011), mesmo em animais não infectados. Da mesma forma, em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* foi observado nível mais elevado de TNF α no fígado do que no baço (Mukherjee *et al.*, 2003). Estes autores observaram que, nos camundongos infectados, houve uma diminuição persistente da resposta linfoproliferativa de esplenócitos desde três semanas até pelo menos 120 dias após a infecção.

5.4 Caracterização das Populações e Genótipos de *L. infantum* através da Análise do Polimorfismo de Microssatélites

Com o objetivo de avaliar o papel de genótipos dos parasitos nos perfis clínico, parasitológico ou imunológico da infecção canina, foi realizada a análise de microssatélites diretamente do DNA isolado do baço desses animais.

Os microssatélites têm sido utilizados como ferramenta molecular para a análise da estrutura populacional de leishmanias relacionadas tanto à doença cutânea (Kebede *et al.*, 2013; Kuhls *et al.*, 2013) como à visceral (Ferreira *et al.*, 2012; Amro *et al.*, 2013; Motoie *et al.*, 2013). Ademais, pode ser uma ferramenta útil na distinção entre cepas provenientes de hospedeiros assintomáticos e sintomáticos (Hide *et al.*, 2013). Seu uso é particularmente interessante na elucidação dos aspectos epidemiológicos da dispersão do parasita e da origem de surtos (Gelanew *et al.*, 2011; Leblois *et al.*, 2011). Sua aplicação se torna ainda mais útil, quando realizada diretamente do tecido do hospedeiro, sem a necessidade do isolamento do parasita, que envolve alguns contratempos já discutidos acima.

Neste estudo foi realizada a análise com quatorze marcadores para o complexo Donovanii a partir do DNA tissular e de isolados dos cães, sendo possível analisar por completo 38% (37/99). Da mesma forma, Motoie e colaboradores (Motoie *et al.*, 2013) realizaram a avaliação de marcadores de microssatélites diretamente do tecido de cães e mostraram que a genotipagem completa somente foi possível em 45% das amostras (112/250). Os autores sugerem que a falha na amplificação pode ser atribuída ao fato de que amostras clínicas podem conter uma pequena quantidade de parasitos. De fato, das 31 amostras de tecido analisadas por completo neste estudo, 20 haviam sido classificadas como alta CP e onze como baixa CP.

A análise de amostras pareadas, isolados e tecido de um mesmo animal, sugere que existem distintos genótipos de parasitos em um mesmo hospedeiro, e que estes podem apresentar tropismo para um determinado tecido ou sofrer seleção. Esse achado abre caminho para a busca dos mecanismos envolvidos com essa seleção/tropismo, que pode por sua vez determinar a diferença entre a virulência de cepas. Hide e colaboradores (Hide *et al.*, 2013), mostraram que

hospedeiros assintomáticos são carreadores de cepas geneticamente distintas daquelas isoladas de hospedeiros sintomáticos e de pacientes HIV+. Uma vez que foi observada baixa variabilidade genotípica das cepas circulantes entre os cães deste estudo, não foi possível realizar correlação com nenhuma das características clínicas e de resposta imune avaliadas.

Neste estudo, a alta ocorrência de marcadores monomórficos, a alta predominância de um mesmo alelo dentre os marcadores polimórficos, bem como a baixa heterozigose observadas indicam homogeneidade da população estudada. Esse dado é sustentado por outros estudos com *L. infantum* que mostraram que há uma deficiência geral de heterozigotos nessa espécie (Kuhls *et al.*, 2007; Amro *et al.*, 2009; Hide *et al.*, 2013). Foi demonstrada a ocorrência de um *deficit* substancial de heterozigotos em *Leishmania braziliensis* que pode ser indicativo de altos níveis de endocruzamento (Rougeron *et al.*, 2009). A deficiência de heterozigotos pode ser também resultado da subdivisão da população (efeito de Wahlund), da presença de alelos nulos, de seleção natural ou conversão gênica e de endogamia (Kuhls *et al.*, 2011). Dos quatorze marcadores analisados no presente trabalho, cinco se mostraram polimórficos. No estudo de Cortes (Cortes *et al.*, 2014) foram analisados os mesmos quatorze marcadores de microssatélites em cepas isoladas de diferentes hospedeiros em Portugal. Todos os marcadores foram polimórficos para todas as amostras e determinaram a ocorrência de duas populações. Dentre as amostras caninas, todas pertencentes a mesma população, ocorreu a divisão em duas subpopulações no STRUCTURE, porém com pouca força como mostrado na análise de clusters. Interessantemente, essa subdivisão se correlacionou com a área geográfica. Provavelmente as diferenças genéticas estão relacionadas à segregação geográfica, como mostrado em outros estudos com *L. braziliensis* (Cupolillo *et al.*, 2003) e *L. infantum* (Bulle *et al.*, 2002). É notável observar que no estudo de Cortes não foram encontradas diferenças no genótipo de amostras provenientes de humanos e canídeos silvestres e domésticos. Em um estudo com amostras de cães e flebótomos de uma pequena área de Portugal, foi mostrado baixo polimorfismo e variabilidade nos oito marcadores analisados dentre as amostras caninas (Montoya *et al.*, 2007).

A identificação de picos duplos pode representar uma infecção mista formada por distintas populações homocigotas ou pela presença de heterocigotas. Esse perfil foi observado em 4 marcadores, Lm2TG (L), Li22-35 (E), Li71-33 (P) e Lm4TA (M). Um achado notório foi o de diferentes perfis de microssatélites a partir do tecido e da cepa isolada do mesmo animal, ou seja, foi observado um perfil (homo ou heterocigoto) na amostra do tecido e outro perfil na cepa isolada do mesmo animal. É possível que os heterocigotas obtidos nessas amostras sejam resultado de infecção mista com diversidade de clones, uma vez que um dos alelos é igual ao alelo do homocigoto da amostra pareada. Ou seja, os picos duplos observados no cromatograma seriam resultado da infecção mista como sugerido (Boite *et al.*, 2014). Ainda, a diferença entre uma cepa isolada e uma amostra tecidual, pode ser resultado do cultivo *in vitro* em que são mantidos os clones distintos. Essa diferença entre cepa e tecido mostra ainda que pode haver populações mistas circulando no mesmo animal. Sugere-se que ocorre uma seleção de clones nos sistemas e que essa seleção é diferenciada nos hospedeiros e no cultivo *in vitro* das promastigotas. Isso provavelmente se deve a interações entre o parasita e seus hospedeiros, reservatórios naturais e principalmente os vetores. De fato, alguns trabalhos em modelos experimentais demonstram claramente diferenças importantes na virulência de clones de *L. infantum* (Garin *et al.*, 2001; Mendez *et al.*, 2001).

No total, foram identificados 23 genótipos, apesar do baixo polimorfismo e *déficit* de heterocigotas. A observação de genótipos exclusivos em Rondonópolis e em Barra do Garças sugere que há segregação de genótipos dos parasitos, no entanto o reduzido número de amostras não permite a confirmação desta hipótese.

Na análise de populações a partir dos microssatélites, foram incluídas mais 173 amostras avaliadas anteriormente por nosso grupo (Ferreira *et al.*, 2012), totalizando 210 amostras. Segundo a análise hierárquica, foi observada a ocorrência de três populações, com predominância da POP 2. Apenas uma cepa foi caracterizada como POP 3 e uma amostra de tecido como POP 1, ambas de Cuiabá. Essas amostras estão em uma região mal definida e tem chance semelhante de estarem em uma ou outra população. No estado de São

Paulo, Motoie e colaboradores (Motoie *et al.*, 2013) mostraram a ocorrência de duas populações (A e B) com divisão em duas subpopulações (A1 e A2) e marcante relação com a distribuição geográfica das amostras. No presente estudo, a maior parte das amostras caracterizadas por completo são provenientes de uma pequena área geográfica, o que pode ter limitado a observação de variabilidade genética.

Foi comparado o perfil de infecção de cepas pertencentes a populações genéticas distintas, POP 1, POP 2 e POP 3 em uma linhagem de macrófagos caninos (DH82). A cinética de infecção *in vitro* já foi demonstrada em cepas pertencentes a diferentes zimodemas no Velho Mundo (Cunha *et al.*, 2013). Aqui, foi mostrada pela primeira vez, que a infectividade de cepas geneticamente distintas pertencentes a um mesmo zimodema pode ser diferente. No estudo de Maia (Maia *et al.*, 2007) foi mostrado que a taxa de infecção dos macrófagos DH82 é baixa em relação a outras linhagens girando em torno de 100 a 200 amastigotas a cada 100 células. No presente estudo foi observada uma taxa de infecção em torno de 150 a 200 amastigotas a cada 400 células. Sabe-se que a taxa de infectividade de uma cepa diminui com as sucessivas passagens *in vitro* (Moreira *et al.*, 2012), o que pode explicar a menor taxa de infecção observada.

6. CONCLUSÕES

1. O diagnóstico laboratorial realizado por múltiplos testes confirmou a alta sensibilidade dos testes moleculares, em especial o kDNA, enquanto o alvo hsp70 apresentou-se com uma boa sensibilidade diagnóstica e como alvo para o diagnóstico etiológico na leishmaniose canina;

2. A resposta imune humoral é marcante na infecção por *L. infantum* e os níveis de anticorpos IgG são mais elevados nos animais com maior sintomatologia e com maior carga parasitária, enquanto os níveis de IgM são mais elevados em animais com baixa carga parasitária e menor escore clínico;

3. O teste rápido DPP®LVC mostrou maior positividade e valor absoluto nas leituras de absorvância mais elevado nos animais com maior escore clínico além de correlação direta com a carga parasitária;

4. A alta carga parasitária no baço promove, além da forte resposta inflamatória, o rompimento da arquitetura esplênica caracterizado majoritariamente pela desorganização da polpa branca;

5. Existe uma associação da ruptura esplênica causada pela alta carga parasitária com diminuição da expressão de genes das interleucinas 6, 10 e 12, do IFN γ , do TNF α e do TGF β . A IL-10 foi a citocina com menor diminuição da expressão o que deve relacionar-se com sua maior disponibilidade no órgão. Aqui, sugerimos que o excesso de antígeno em circulação em animais com alta carga parasitária promove a diminuição da expressão dessas citocinas que estão diretamente relacionados ao combate do parasita;

6. No fígado há uma resposta imunológica mista e bem balanceada que através da formação de granulomas é capaz de conter a infecção. Observamos ainda, o aumento da expressão das quimiocinas CCL2, CXCL8 e da proteína MAP kinase 4 relacionadas à ativação celular e que devem ser moléculas chaves para o combate ao parasita;

7. Não foi possível associar variabilidade genética dos parasitos com parâmetros clínicos, parasitológicos ou imunológicos, provavelmente devido à população estudada ser muito homogênea. A grande maioria das amostras

foram caracterizadas como pertencente a POP2, população predominante em Mato Grosso, segundo estudo prévio do nosso grupo de trabalho;

8. Há evidências de infecção policlonal em animais naturalmente infectados quando analisamos amostras pareadas (tecidos e isolados do tecido). Nessas amostras, parasitos isolados apresentavam perfil distinto do observado no tecido de origem e ainda perfis distintos de parasitos em diferentes órgãos do mesmo animal. Estes dados apontam para a possibilidade de distinto tropismo tecidual entre clones de mesmo isolado;

10 – A infecção de células caninas de linhagem (DH82) com promastigotas de diferentes populações de *L. infantum* circulantes no Brasil mostram padrões de infecção distintos. Aparentemente mesmo sendo o mesmo parasita tem um comportamento diferencial *in vitro*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGALLOU, M.; DOTSIKA, E.; FRYDAS, S.; KARAGOUNI, E. Toll-like receptor 4 promotes control of *Leishmania infantum* infection through inducement of leishmanicidal activity in host macrophages: role of mitogen activated kinases. **J Biol Regul Homeost Agents**, 28, (1): 41-52, 2014

AJZENBERG, D.; COLLINET, F.; MERCIER, A.; VIGNOLES, P.; DARDE, M. L. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. **J Clin Microbiol**, 48, (12): 4641-5, 2010

AL-JAWABREH, A.; DIEZMANN, S.; MULLER, M.; WIRTH, T.; SCHNUR, L. F.; STRELKOVA, M. V.; KOVALENKO, D. A.; RAZAKOV, S. A.; SCHWENKENBECHER, J.; KUHLS, K.; SCHONIAN, G. Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania (Leishmania) major* by microsatellite analysis. **BMC Evol Biol**, 8: 183, 2008

ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E.; ATTA, A. M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet.Immunol.Immunopathol.**, 106, (1-2): 151-158, 2005a

_____. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet.Parasitol.**, 127, (3-4): 227-232, 2005b

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, 7, (5): e35671, 2012

ALVARENGA, J. S.; LIGEIRO, C. M.; GONTIJO, C. M.; CORTES, S.; CAMPINO, L.; VAGO, A. R.; MELO, M. N. KDNA genetic signatures obtained by LSSP-PCR analysis of *Leishmania (Leishmania) infantum* isolated from the new and the old world. **PLoS One**, 7, (8): e43363, 2012

ALVES, C. N. F.; DE AMORIM, I. F. G.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN-[gamma], TNF-[alpha], IL-10 and TGF-[beta] in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 128, (4): 349-358, 2009

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. [Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997]. **Cad.Saude Publica**, 20, (1): 259-265, 2004

AMPUERO, J.; RIOS, A. P.; CARRANZA-TAMAYO, C. O.; ROMERO, G. A. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104, (7): 992-7, 2009

AMRO, A.; SCHONIAN, G.; AL-SHARABATI, M. B.; AZMI, K.; NASEREDDIN, A.; ABDEEN, Z.; SCHNUR, L. F.; BANETH, G.; JAFFE, C. L.; KUHL, K. Population genetics of *Leishmania infantum* in Israel and the Palestinian Authority through microsatellite analysis. **Microbes Infect**, 11, (4): 484-92, 2009

AMRO, A.; HAMDI, S.; LEMRANI, M.; MOUNA, I.; MOHAMMED, H.; MOSTAFA, S.; RHAJAOU, M.; HAMARSHEH, O.; SCHONIAN, G. Moroccan *Leishmania infantum*: genetic diversity and population structure as revealed by multi-locus microsatellite typing. **PLoS One**, 8, (10): e77778, 2013

ANDRADE, R. A.; SILVA ARAUJO, M. S.; REIS, A. B.; GONTIJO, C. M.; VIANNA, L. R.; MAYRINK, W.; MARTINS-FILHO, O. A. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. **Vet Immunol Immunopathol**, 128, (1-3): 79-86, 2009

ANSARI, N. A.; KUMAR, R.; GAUTAM, S.; NYLEN, S.; SINGH, O. P.; SUNDAR, S.; SACKS, D. IL-27 and IL-21 are associated with T cell IL-10 responses in human visceral leishmaniasis. **J Immunol**, 186, (7): 3977-85, 2011

ARAUJO, M. S.; DE ANDRADE, R. A.; VIANNA, L. R.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M. C.; MELLO, M. N.; MARTINS-FILHO, O. A. Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, 26, (18): 2211-2224, 2008

ARAUJO, M. S.; DE ANDRADE, R. A.; SATHLER-AVELAR, R.; MAGALHAES, C. P.; CARVALHO, A. T.; ANDRADE, M. C.; CAMPOLINA, S. S.; MELLO, M. N.; VIANNA, L. R.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; MALAQUIAS, L. C.; ROCHA, L. M.; MARTINS-FILHO, O. A. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, 141, (1-2): 64-75, 2011

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER, R. H., JR. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, 53, (3): 251-255, 1995

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; CONCEIÇÃO EULÍO, M.; PEDRAL SAMPAIO, D.; BADARÓ, R. Studies on control of Visceral Leishmaniasis: impact of dog control on Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 59, (1): 53-57, 1998

BABIKER, Z. O.; DAVIDSON, R.; MAZINDA, C.; KIPNGETICH, S.; RITMEIJER, K. Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. **Am J Trop Med Hyg**, 76, (4): 689-93, 2007

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A., JR.; JERONIMO, S.; CARVALHO, E. M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, 12, (8): 1228-31, 2000

BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D., JR. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis**, 154, (4): 639-49, 1986

BANETH, G.; JAFFE, C. L. Canine visceral leishmaniasis in Israel: an overview of an emerging disease with reference to wild canids and human infection. In: (Ed.). **Canine Leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona**. Spain 1999.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, 106, (4): 315-24, 2002

BANULS, A. L.; BASTIEN, P.; POMARES, C.; AREVALO, J.; FISA, R.; HIDE, M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. **Clin Microbiol Infect**, 17, (10): 1451-61, 2011

BAPTISTA-FERNANDES, T.; MARQUES, C.; ROOS RODRIGUES, O.; SANTOS-GOMES, G. M. Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 30, (1): 41-53, 2007

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, 28, (7): 329-337, 2006

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G.; BASTOS, F. I.; XIMENES, R. A.; BARATA, R. B.; RODRIGUES, L. C. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**, 377, (9780): 1877-89, 2011

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P. H.; DOS-SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, 99, (2): 195-197, 2004

BASSO, D.; PESARIN, F.; SALMASO, L.; SOLARI, A. Nonparametric One-Way ANOVA. In: SPRINGER (Ed.). **Permutation Tests for Stochastic Ordering and ANOVA: Theory and Applications with R**. New York, 2009. p.133-172.

BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; TAMINH, M.; RIOUX, J. A.; ROIZÈS, G.; PAGÈS, M. Interclonal variations in molecular karyotype in *Leishmania infantum* imply a 'mosaic' strain structure. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 40, (1): 53-61, 1990

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, 420, (6915): 502-7, 2002

BELO, V. S.; STRUCHINER, C. J.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S.; DE OLIVEIRA, R. B.; NETO, R. G.; DA SILVA, E. S. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. **Vet Parasitol**, 195, (1-2): 1-13, 2013

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, 55, (3): 273-277, 1996

BHADRA, R.; GIGLEY, J. P.; KHAN, I. A. PD-1-mediated attrition of polyfunctional memory CD8+ T cells in chronic toxoplasma infection. **J Infect Dis**, 206, (1): 125-34, 2012

BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; DASGUPTA, B.; MAZUMDER, D.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. **J Infect Dis**, 185, (12): 1704-8, 2002

BOCETA, C.; ALONSO, C.; JIMENEZ-RUIZ, A. Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, 22, (2): 55-62, 2000

BOGGIATTO, P. M.; RAMER-TAIT, A. E.; METZ, K.; KRAMER, E. E.; GIBSON-CORLEY, K.; MULLIN, K.; HOSTETTER, J. M.; GALLUP, J. M.; JONES, D. E.; PETERSEN, C. A. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clin Vaccine Immunol**, 17, (2): 267-73, 2010

BOITE, M. C.; DE OLIVEIRA, T. S.; FERREIRA, G. E.; TRANNIN, M.; DOS SANTOS, B. N.; PORROZZI, R.; CUPOLILLO, E. Polymorphisms and ambiguous sites present in DNA sequences of *Leishmania* clones: looking closer. **Infect Genet Evol**, 25: 110-6, 2014

BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DA SILVA, V. O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W. R.; GOMES, E. M.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. Long lasting protection against

canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). **Vaccine**, 20, (27-28): 3277-84, 2002

BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; BAUER, F. S.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; MORGADO, A. A.; SOARES, I. S.; BATISTA, L. M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, 26, (39): 4991-4997, 2008

BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; FUMAROLA, I.; SISTO, M.; LEOGRANDE, D.; ACQUAFREDDA, A.; SPINELLI, R.; MITOLO, V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in Leishmania infantum-infected human macrophages. **Clin Exp Med**, 2, (3): 125-9, 2002

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Séries e Manuais Técnicos.** MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S. Brasília, DF: Núcleo de Comunicação 2006.

_____. **Portaria Interministerial.** SAÚDE, M. D. 1.426 2008.

_____. **Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. NOTA TÉCNICA.** MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S. 48 2011.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S. 2014: Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan 2012.

BRAZIL, R. P. The dispersion of Lutzomyia longipalpis in urban areas. **Rev Soc Bras Med Trop**, 46, (3): 263-4, 2013

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, 303, (5663): 1532-5, 2004

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. **Nat Rev Microbiol**, 5, (8): 577-82, 2007

BRUCE, M. C.; MACHESO, A.; MCCONNACHIE, A.; MOLYNEUX, M. E. Comparative population structure of Plasmodium malariae and Plasmodium falciparum under different transmission settings in Malawi. **Malar J**, 10: 38, 2011

BULLE, B.; MILLON, L.; BART, J. M.; GALLEGOS, M.; GAMBARELLI, F.; PORTUS, M.; SCHNUR, L.; JAFFE, C. L.; FERNANDEZ-BARREDO, S.; ALUNDA, J. M.; PIARROUX, R. Practical approach for typing strains of Leishmania infantum by microsatellite analysis. **J Clin Microbiol**, 40, (9): 3391-7, 2002

BURNS, J. M. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 90: 775-779, 1993

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; KATZ, G.; RODAS, L. A. C.; POLETTO, D. W.; LAGE, L. C.; SPINOLA, R. M. F.; CRUZ, O. G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, 17 (5): 1263-1267, 2001

CARVALHO FERREIRA, A. L.; CARREGAL, V. M.; DE ALMEIDA FERREIRA, S.; LEITE, R. S.; DE ANDRADE, A. S. Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real-time PCR and ITS-1 nested PCR. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 78, (4): 418-21, 2014

CASTRO-JUNIOR, J. G.; FREIRE, M. L.; CAMPOS, S. P.; SCOPEL, K. K.; PORROZZI, R.; DA SILVA, E. D.; COLOMBO, F. A.; DA SILVEIRA RDE, C.; MARQUES, M. J.; COIMBRA, E. S. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP(R)) and PCR assays. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 56, (3): 225-9, 2014

CAVALCANTI, A.; LOBO, R.; CUPOLILLO, E.; BUSTAMANTE, F.; PORROZZI, R. Canine cutaneous leishmaniasis caused by neotropical *Leishmania infantum* despite of systemic disease: A case report. **Parasitol Int**, 61, (4): 738-40, 2012

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. **American journal of human genetics**, 19, (3 Pt 1): 233-57, 1967

CERBINO NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cad Saude Publica**, 25, (7): 1543-51, 2009

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 103: 67-75, 2005

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, 410, (6824): 37-40, 2001

CHAPPUIS, F. Diagnostic accuracy of two rK39 antigen-based dipsticks and the formol gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. **J. Clin. Microbiol.**, 43: 5973-5977, 2005

CHAPPUIS, F.; RIJAL, S.; SOTO, A.; MENTEN, J.; BOELAERT, M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **BMJ**, 333: 723, 2006

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Micro**, 5, (11): 873-882, 2007

COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; CARVALHO, F. A.; CHAVES, K. F.; TEIXEIRA, K. N.; RODRIGUES, R. C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infect Immun**, 71, (7): 3988-94, 2003

CONRAD, M.; ZUBACOVA, Z.; DUNN, L. A.; UPCROFT, J.; SULLIVAN, S. A.; TACHEZY, J.; CARLTON, J. M. Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted human pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite. **Mol Biochem Parasitol**, 175, (1): 30-8, 2011

CORREA, A. P.; DOSSI, A. C.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R.; MUNARI, D. P.; DE LIMA, V. M. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Parasitol**, 143, (3-4): 267-74, 2007

CORTES, S.; ROLAO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 98, (1): 12-7, 2004

CORTES, S.; MAURICIO, I. L.; KUHLS, K.; NUNES, M.; LOPES, C.; MARCOS, M.; CARDOSO, L.; SCHONIAN, G.; CAMPINO, L. Genetic diversity evaluation on Portuguese *Leishmania infantum* strains by multilocus microsatellite typing. **Infect Genet Evol**, 26: 20-31, 2014

COSTA, C. H.; WERNECK, G. L.; RODRIGUES, L., JR.; SANTOS, M. V.; ARAUJO, I. B.; MOURA, L. S.; MOREIRA, S.; GOMES, R. B.; LIMA, S. S. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, 99, (3): 229-36, 2005

COSTA, C. H. N.; GOMES, R. B. B.; SILVA, M. R. B.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K. S.; SANTOS, R. S.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Competence of the Human Host as a Reservoir for *Leishmania chagasi* **The Journal of Infectious Diseases**, 182: 997-1000, 2000

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44, (2): 232-242, 2011

COSTA, D. J.; CARVALHO, R. M.; ABBEHUSEN, M.; TEIXEIRA, C.; PITOMBO, M.; TRIGO, J.; NASCIMENTO, F.; AMORIM, L.; ABREU-SILVA, A. L.; DO SOCORRO PIRES CRUZ, M.; MIRANDA, J. C.; FUKUTANI, K.; DE

OLIVEIRA, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**, 8, (4): e60535, 2013

COSTA, L. N.; BORBA, A. S.; CASTAGNA, C. L.; CARVALHO FILHO, E. B.; MARSON, F. A.; SA JUNIOR, F. F.; ANGERAMI, R. N.; LEVY, C. E. Evaluation of PCR in the diagnosis of canine leishmaniasis in two different epidemiological regions: Campinas (SP) and Teresina (PI), Brazil. **Epidemiol Infect**: 1-8, 2014

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; VIEIRA, P. M.; CARNEIRO, C. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **Vet J**, 190, (2): e43-7, 2011

COURA-VITAL, W.; REIS, A. B.; FAUSTO, M. A.; LEAL, G. G.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, M. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. **PLoS One**, 8, (8): e71833, 2013

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.-J.; GARCEZ, L.-M.; SHAW, J.-J.; DYE, C. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, 186, (9): 1314-1320, 2002

COURTENAY, O.; CARSON, C.; CALVO-BADO, L.; GARCEZ, L. M.; QUINNELL, R. J. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. **PLoS Negl Trop Dis**, 8, (1): e2583, 2014

CUNHA, J.; CARRILLO, E.; SANCHEZ, C.; CRUZ, I.; MORENO, J.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors**, 6: 122, 2013

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G., JR.; MOMEN, H. **A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy.** The American journal of tropical medicine and hygiene. 50: 269-311 1994.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L. R.; TOALDO, C. B.; DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; DE BRITO, M. E.; FALQUETO, A.; DE FARIAS NAIFF, M.; GRIMALDI, G., JR. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **J Clin Microbiol**, 41, (7): 3126-32, 2003

DA SILVA, L. A.; DE SOUSA CDOS, S.; DA GRACA, G. C.; PORROZZI, R.; CUPOLILLO, E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene

as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infect Genet Evol**, 10, (1): 77-83, 2010

DA SILVA, M. R.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, 72, (6): 811-4, 2005

DA SILVA, S. M.; AMORIM, I. F.; RIBEIRO, R. R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S.; FREZARD, F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, 56, (6): 2858-67, 2012

DA SILVA, V. O.; BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DE SOUZA, E. P.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). **Vaccine**, 19, (9-10): 1082-92, 2000

DANTAS-TORRES, F.; BRANDAO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 48, (3): 151-6, 2006

DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ**, 326: 377-382, 2003

DE ALMEIDA ADO, B.; SOUSA, V. R.; DA CRUZ, F. A.; DAHROUG, M. A.; FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA MDE, F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiaba, Mato Grosso, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, 21, (4): 359-65, 2012

DE ALMEIDA FERREIRA, S.; LEITE, R. S.; ITUASSU, L. T.; ALMEIDA, G. G.; SOUZA, D. M.; FUJIWARA, R. T.; DE ANDRADE, A. S.; MELO, M. N. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, (4): e1596, 2012

DE AMORIM, I. F.; FREITAS, E.; ALVES, C. F.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; DA COSTA-VAL, A. P. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. **Vet Parasitol**, 173, (1-2): 55-63, 2010

DE ANDRADE, R. A.; REIS, A. B.; GONTIJO, C. M.; BRAGA, L. B.; ROCHA, R. D.; ARAUJO, M. S.; VIANNA, L. R.; MARTINS-FILHO, O. A. Clinical value of anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. **Vet Immunol Immunopathol**, 116, (1-2): 85-97, 2007

DE ARAUJO, V. E.; PINHEIRO, L. C.; ALMEIDA, M. C.; DE MENEZES, F. C.; MORAIS, M. H.; REIS, I. A.; ASSUNCAO, R. M.; CARNEIRO, M. Relative risk

of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, (11): e2540, 2013

DE ARRUDA, M. M.; FIGUEIREDO, F. B.; CARDOSO, F. A.; HIAMAMOTO, R. M.; BRAZUNA, J. C.; DE OLIVEIRA, M. R.; NORONHA, E. F.; ROMERO, G. A. Validity and reliability of enzyme immunoassays using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS One**, 8, (7): e69988, 2013

DE CARVALHO, M. R.; VALENCA, H. F.; DA SILVA, F. J.; DE PITA-PEREIRA, D.; DE ARAUJO PEREIRA, T.; BRITTO, C.; BRAZIL, R. P.; BRANDAO FILHO, S. P. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (Franca, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Trop**, 116, (1): 108-10, 2010

DE LEONARDIS, F.; GOVONI, M.; LO MONACO, A.; TROTTA, F. Visceral leishmaniasis and anti-TNF-alpha therapy: case report and review of the literature. **Clin Exp Rheumatol**, 27, (3): 503-6, 2009

DE LIMA, V. M.; PEIRO, J. R.; DE, O. V. IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis. **Vet.Immunol.Immunopathol.**, 115, (1-2): 189-193, 2007

DE PAULA, C. C.; FIGUEIREDO, F. B.; MENEZES, R. C.; MOUTA-CONFORT, E.; BOGIO, A.; MADEIRA MDE, F. [Canine visceral leishmaniasis in Marica, State of Rio de Janeiro: first report of an autochthonous case]. **Rev Soc Bras Med Trop**, 42, (1): 77-8, 2009

DE PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum* chagasi in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop**, 107, (1): 66-9, 2008

DE SANTIS, B.; SANTOS, E. G.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CAVALCANTI ADOS, S.; SANTOS, B. N.; DE MOURA, S. T.; MALHADO, K.; CHAVES, S. A. Characterization of *Leishmania infantum* species in dogs from the urban area of Cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 44, (6): 771-3, 2011

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniosis in Brazil. Geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de SÆo Paulo**, 4 149-212, 1962

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 89, (3): 463-9, 1994

DESJEUX, P. Disease Watch Focus: Leishmaniasis. **Nature Rev. Microbiol**, 2: 692-693, 2004

DI GIORGIO, C.; FARAUT-GAMBARELLI, F.; IMBERT, A.; MINODIER, P.; GASQUET, M.; DUMON, H. Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* isolates from patients with visceral leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, 44, (1): 71-6, 1999

DIERINGER, D.; SCHLOTTERER, C. Two distinct modes of microsatellite mutation processes: evidence from the complete genomic sequences of nine species. **Genome Res**, 13, (10): 2242-51, 2003

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin Infect Dis**, 25, (5): 1240-2, 1997

DO NASCIMENTO, P. R.; MARTINS, D. R.; MONTEIRO, G. R.; QUEIROZ, P. V.; FREIRE-NETO, F. P.; QUEIROZ, J. W.; MORAIS LIMA, A. L.; JERONIMO, S. M. Association of pro-inflammatory cytokines and iron regulatory protein 2 (IRP2) with *Leishmania* burden in canine visceral leishmaniasis. **PLoS One**, 8, (10): e73873, 2013

DORNER, B. G.; SCHEFFOLD, A.; ROLPH, M. S.; HUSER, M. B.; KAUFMANN, S. H.; RADBRUCH, A.; FLESC, I. E.; KROCZEK, R. A. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, (9): 6181-6, 2002

DOS-SANTOS, W. L.; JESUS, E. E.; PARANHOS-SILVA, M.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, J. C.; BALEEIRO, C. O.; NASCIMENTO, E. G.; MOREIRA, E. D.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Vet.Immunol.Immunopathol.**, 123, (3-4): 251-259, 2008

DUJARDIN, J. C.; CAMPINO, L.; CANAVATE, C.; DEDET, J. P.; GRADONI, L.; SOTERIADOU, K.; MAZERIS, A.; OZBEL, Y.; BOELAERT, M. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. **Emerg Infect Dis**, 14, (7): 1013-8, 2008

DUPREY, Z. H.; STEURER, F. J.; ROONEY, J. A.; KIRCHHOFF, L. V.; JACKSON, J. E.; ROWTON, E. D.; SCHANTZ, P. M. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. **Emerg.Infect.Dis.**, 12, (3): 440-446, 2006

ENGWERDA, C. R.; MURPHY, M. L.; COTTERELL, S. E.; SMELT, S. C.; KAYE, P. M. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **Eur J Immunol**, 28, (2): 669-80, 1998

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; COTTERELL, S. E.; MYNOTT, T. L.; TSCHANNERL, A.; GORAK-STOLINSKA, P. M.; KAYE, P. M. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **Am J Pathol**, 161, (2): 429-37, 2002

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol**, 20, (11): 524-30, 2004

ERESH, S.; MCCALLUM, S. M.; BARKER, D. C. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. **Parasitology**, 109 (Pt 4): 423-33, 1994

ESCH, K. J.; JUELGAARD, R.; MARTINEZ, P. A.; JONES, D. E.; PETERSEN, C. A. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **J Immunol**, 191, (11): 5542-50, 2013

FALQUETO, A. S.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PORROZZI, R.; DA COSTA, M. V. S.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G. Cross-sectional and Longitudinal Epidemiologic Surveys of Human and Canine *Leishmania infantum* Visceral Infections in an Endemic Rural Area of Southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 80, (4): 559-565, 2009

FARAUT-GAMBARELLI, F.; PIARROUX, R.; DENIAU, M.; GIUSIANO, B.; MARTY, P.; MICHEL, G.; FAUGERE, B.; DUMON, H. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, 41, (4): 827-30, 1997

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M.; COELHO, E. A.; MICHALICK, M. S.; DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; LUIZ TAFURI, W.; RESENDE DDE, M.; HERMONT, V.; ABRANTES CDE, F.; GAZZINELLI, R. T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, 26, (46): 5888-95, 2008

FERREIRA, E. C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; DA SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet.Parasitol.**, 146, (3-4): 235-241, 2007

FERREIRA, G. E.; DOS SANTOS, B. N.; DORVAL, M. E.; RAMOS, T. P.; PORROZZI, R.; PEIXOTO, A. A.; CUPOLILLO, E. The genetic structure of *Leishmania infantum* populations in Brazil and its possible association with the transmission cycle of visceral leishmaniasis. **PLoS One**, 7, (5): e36242, 2012

FERRER, L. Clinical aspects of Canine Leishmaniasis. Wiesbaden: Hoechst Roussel, 1999.

FIGUEIREDO, F. B.; BARBOSA FILHO, C. J.; SCHUBACH, E. Y.; PEREIRA, S. A.; NASCIMENTO, L. D.; MADEIRA MDE, F. [Report on an autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in the southern zone of the municipality of Rio de Janeiro]. **Rev Soc Bras Med Trop**, 43, (1): 98-9, 2010

FRAGA, D. B.; SOLCA, M. S.; SILVA, V. M.; BORJA, L. S.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; VERAS, P. S.; DOS-SANTOS, W. L. Temporal distribution of positive results of tests for detecting Leishmania infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: a 13 years survey and association with human disease. **Vet Parasitol**, 190, (3-4): 591-4, 2012

FRAGA, D. B.; DA SILVA, E. D.; PACHECO, L. V.; BORJA, L. S.; DE OLIVEIRA, I. Q.; COURA-VITAL, W.; MONTEIRO, G. R.; OLIVEIRA, G. G.; JERONIMO, S. M.; REIS, A. B.; VERAS, P. S. A multicentric evaluation of the recombinant Leishmania infantum antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors**, 7: 136, 2014

FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; DA COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 111, (2-3): 161-173, 2003

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**, 137, (3-4): 214-21, 2006

FREZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, 14, (7): 2317-36, 2009

GALVEZ, R.; MIRO, G.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Questionnaire-based survey on the clinical management of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). **Prev Vet Med**, 102, (1): 59-65, 2011

GANTT, K. R.; GOLDMAN, T. L.; MCCORMICK, M. L.; MILLER, M. A.; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, E. T.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi. **J Immunol**, 167, (2): 893-901, 2001

GARCIA, A. L.; KINDT, A.; QUISPE-TINTAYA, K. W.; BERMUDEZ, H.; LLANOS, A.; AREVALO, J.; BANULS, A. L.; DE DONCKER, S.; LE RAY, D.; DUJARDIN, J. C. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infect Genet Evol**, 5, (2): 109-16, 2005

GARIN, Y. J. F.; SULAHIAN, A.; PRATLONG, F.; MENECEUR, P.; GANGNEUX, J. P.; PRINA, E.; DEDET, J. P.; DEROUIN, F. Virulence of

Leishmania infantum Is Expressed as a Clonal and Dominant Phenotype in Experimental Infections. **Infection and Immunity**, 69, (12): 7365-7373, 2001

GAUTAM, S.; KUMAR, R.; SINGH, N.; SINGH, A. K.; RAI, M.; SACKS, D.; SUNDAR, S.; NYLEN, S. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, 209, (2): 290-9, 2014

GAVGANI, A. S.; HODJATI, M. H.; MOHITE, H.; DAVIES, C. R. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. **Lancet**, 360: 374-379, 2002

GELANEW, T.; CRUZ, I.; KUHLS, K.; ALVAR, J.; CANAVATE, C.; HAILU, A.; SCHONIAN, G. Multilocus microsatellite typing revealed high genetic variability of Leishmania donovani strains isolated during and after a Kala-azar epidemic in Libo Kemkem district, northwest Ethiopia. **Microbes Infect**, 13, (6): 595-601, 2011

GERAMIZADEH, B.; JAHANGIRI, R.; MORADI, E. Causes of hepatic granuloma: a 12-year single center experience from southern Iran. **Arch Iran Med**, 14, (4): 288-9, 2011

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against Leishmania donovani infections. **Vaccine**, 20, (1-2): 59-66, 2001

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Vet.Immunol.Immunopathol.**, 121, (1-2): 23-33, 2008

GOMES, A. H.; FERREIRA, I. M.; LIMA, M. L.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAUJO, M. F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. **Vet Parasitol**, 144, (3-4): 234-41, 2007

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol**, 7, (3): 338-349, 2004

GONZALEZ, J. L.; ROLLAN, E.; NOVOA, C.; CASTANO, M. Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. **Histol Histopathol**, 3, (4): 323-9, 1988

GOTO, H.; PRIANTI, M. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 51, (5): 241-6, 2009

GRACA, G. C.; VOLPINI, A. C.; ROMERO, G. A.; OLIVEIRA NETO, M. P.; HUEB, M.; PORROZZI, R.; BOITE, M. C.; CUPOLILLO, E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous

leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 107, (5): 664-74, 2012

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, 35, (11-12): 1169-1180, 2005

GRIMALDI, G., JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, 6, (3): 230-250, 1993

GRIMALDI, G., JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PINTO, I.; DE-AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 106, (1): 54-9, 2012

GRUENHEID, S.; PINNER, E.; DESJARDINS, M.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. **J Exp Med**, 185, (4): 717-30, 1997

GUEVARA, P.; ALONSO, G.; DA SILVEIRA, J. F.; DE MELLO, M.; SCORZA, J. V.; ANEZ, N.; RAMIREZ, J. L. Identification of new world Leishmania using ribosomal gene spacer probes. **Mol Biochem Parasitol**, 56, (1): 15-26, 1992

GUIMARAES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T.; FROMENT, G. S.; SOARES, R. P.; MORGADO, F. N.; CONCEICAO-SILVA, F.; SARAIVA, E. M. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, (16): 6748-53, 2009

GUMY, A.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with Leishmania major and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **International Journal for Parasitology**, 34, (4): 433-444, 2004

GUPTA, V.; TRIPATHI, S.; TILAK, V.; BHATIA, B. D. A study of clinico-haematological profiles of pancytopenia in children. **Trop Doct**, 38, (4): 241-3, 2008

HADIGHI, R.; MOHEBALI, M.; BOUCHER, P.; HAJJARAN, H.; KHAMESIPOUR, A.; OUELLETTE, M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant Leishmania tropica parasites. **PLoS Med**, 3, (5): e162, 2006

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, 27, (9): 403-9, 2011

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, 354: 1191-1199, 1999

HIDE, M.; MARION, E.; POMARES, C.; FISA, R.; MARTY, P.; BANULS, A. L. Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers. **Int J Parasitol**, 43, (5): 389-97, 2013

HO, E. A.; SOONG, T. H.; LI, Y. Comparative merits of sternum, spleen and liver punctures in the study of human leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 41: 629-636, 1948

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Mol Biol Evol**, 23, (2): 254-67, 2006

JAMJOOM, M. B.; ASHFORD, R. W.; BATES, P. A.; CHANCE, M. L.; KEMP, S. J.; WATTS, P. C.; NOYES, H. A. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and "*L. archibaldi*" from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. **Parasitology**, 129, (Pt 4): 399-409, 2004

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, 71, (8): 4278-88, 2003

KEBEDE, N.; OGHUMU, S.; WORKU, A.; HAILU, A.; VARIKUTI, S.; SATOSKAR, A. R. Multilocus microsatellite signature and identification of specific molecular markers for *Leishmania aethiopia*. **Parasit Vectors**, 6: 160, 2013

KREUTZER, R. D.; GROGL, M.; NEVA, F. A.; FRYAUFF, D. J.; MAGILL, A. J.; ALEMAN-MUNOZ, M. M. Identification and genetic comparison of leishmanial parasites causing viscerotropic and cutaneous disease in soldiers returning from Operation Desert Storm. **Am J Trop Med Hyg**, 49, (3): 357-63, 1993

KUHLS, K.; KEILONAT, L.; OCHSENREITHER, S.; SCHAAR, M.; SCHWEYNOCH, C.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes Infect**, 9, (3): 334-43, 2007

KUHLS, K.; CHICHARRO, C.; CANAVATE, C.; CORTES, S.; CAMPINO, L.; HARALAMBOUS, C.; SOTERIADOU, K.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; MAURICIO, I.; MILES, M.; SCHAAR, M.; OCHSENREITHER, S.; RADTKE, O. A.; SCHONIAN, G. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. **PLoS Negl Trop Dis**, 2, (7): e261, 2008

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. A.; SCHONIAN, G. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Negl Trop Dis**, 5, (6): e1155, 2011

KUHLS, K.; CUPOLILLO, E.; SILVA, S. O.; SCHWEYNOCH, C.; BOITE, M. C.; MELLO, M. N.; MAURICIO, I.; MILES, M.; WIRTH, T.; SCHONIAN, G. Population structure and evidence for both clonality and recombination among Brazilian strains of the subgenus *Leishmania* (Viannia). **PLoS Negl Trop Dis**, 7, (10): e2490, 2013

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol Rev**, 81, (2): 807-69, 2001

LACHAUD, L.; BOURGEOIS, N.; PLOURDE, M.; LEPROHON, P.; BASTIEN, P.; OUELLETTE, M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. **Clin Infect Dis**, 48, (2): e16-22, 2009

LAGE, R. S.; OLIVEIRA, G. C.; BUSEK, S. U.; GUERRA, L. L.; GIUNCHETTI, R. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet.Immunol.Immunopathol.**, 115, (1-2): 135-145, 2007

LAGUNA, F.; VIDELA, S.; JIMENEZ-MEJIAS, M. E.; SIRERA, G.; TORRE-CISNEROS, J.; RIBERA, E.; PRADOS, D.; CLOTET, B.; SUST, M.; LOPEZ-VELEZ, R.; ALVAR, J. Amphotericin B lipid complex versus meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV: a randomized pilot study. **J Antimicrob Chemother**, 52, (3): 464-8, 2003

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: ACADEMIC, P. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London, v.1, 1987. p.1-120.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, 33, (1): 159-74, 1977

LEBLOIS, R.; KUHLS, K.; FRANÇOIS, O.; SCHÖNIAN, G.; WIRTH, T. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. **Infection, Genetics and Evolution**, 11, (5): 1091-1095, 2011

LECLERCQ, V.; LEBASTARD, M.; BELKAID, Y.; LOUIS, J.; MILON, G. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. **J Immunol**, 157, (10): 4537-45, 1996

LEITE, R. S.; FERREIRA SDE, A.; ITUASSU, L. T.; DE MELO, M. N.; DE ANDRADE, A. S. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Vet Parasitol**, 170, (3-4): 201-6, 2010

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; DE MELO, M. N.; LUIZ, T. W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Trop.**, 92, (1): 43-53, 2004

LIMA, W. G.; OLIVEIRA, P. S.; CALIARI, M. V.; GONCALVES, R.; MICHALICK, M. S.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, 117, (1-2): 129-36, 2007

LIRA, R.; SUNDAR, S.; MAKHARIA, A.; KENNEY, R.; GAM, A.; SARAIVA, E.; SACKS, D. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. **J Infect Dis**, 180, (2): 564-7, 1999

MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B.; PINTO, A. G.; NASCIMENTO, L. D.; FURTADO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; DE PAULA, C. C.; BOGIO, A.; GOMES, M. C.; BESSA, A. M.; PASSOS, S. R. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Res.Vet.Sci.**, 87, (2): 260-262, 2009

MAIA-ELKHOURY, A. N.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad Saude Publica**, 24, (12): 2941-7, 2008

MAIA, C.; ROLAO, N.; NUNES, M.; GONCALVES, L.; CAMPINO, L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. **Acta Trop**, 103, (2): 150-5, 2007

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol**, 158, (4): 274-87, 2008

MAIA, C.; RAMADA, J.; CRISTÓVÃO, J. M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **The Veterinary Journal**, 179, (1): 142-144, 2009

MAIA, C.; NUNES, M.; CRISTOVAO, J.; CAMPINO, L. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. **Acta Trop**, 116, (3): 193-9, 2010

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. **J Trop Med**, 2012: 541571, 2012

MANCIANTI, F.; MECIANI, N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. **Am J Vet Res**, 49, (8): 1409-11, 1988

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Vet Parasitol**, 125, (3-4): 251-62, 2004

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V. F.; MICHELE, P. L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, 142, (3-4): 271-280, 2006

MANNA, L.; GRAVINO, A. E.; PICILLO, E.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, 1149: 358-360, 2008

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A. E. Evidence for a relationship between Leishmania load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, 87, (1): 76-78, 2009

MARCONDES, M.; IKEDA, F. A.; VIEIRA, R. F.; DAY, M. J.; LIMA, V. M.; ROSSI, C. N.; PERRI, S. H.; BIONDO, A. W. Temporal IgG subclasses response in dogs following vaccination against Leishmania with Leishmune(R). **Vet Parasitol**, 181, (2-4): 153-9, 2011

MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; DE SOUZA, W. J.; DE TOLEDO, L. M.; GRIMALDI, J. G.; MOMEN, H.; PACHECO, R. S.; SABROZA, P. C.; DE SOUZA, M. A.; RANGEL JUNIOR, F. B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, 80, (3): 349-357, 1985

MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS Pathog**, 9, (1): e1003053, 2013

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol Rev**, 201: 206-24, 2004

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol**, 5, (8): 606-16, 2005

MELO, F. A.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; CALIARI, M. V.; TAFURI, W. L.; CALABRESE, K. S. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Int.J.Exp.Pathol.**, 90, (5): 538-548, 2009

MENDEZ, S.; FERNANDEZ-PEREZ, F. J.; SANTIN, M.; DE LA FUENTE, C.; CUQUERELLA, M.; GOMEZ-MUNOZ, M. T.; ALUNDA, J. M. Correlation between in vitro and in vivo infectivity of Leishmania infantum clones. **J Eukaryot Microbiol**, 48, (6): 616-21, 2001

MENEZES-SOUZA, D.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GUERRA-SA, R.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; OLIVEIRA, G. C.; REIS, A. B. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi presenting

distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Vet Parasitol**, 177, (1-2): 39-49, 2011

MENEZES-SOUZA, D.; GUERRA-SA, R.; CARNEIRO, C. M.; VITORIANO-SOUZA, J.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SILVEIRA-LEMONS, D.; OLIVEIRA, G. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, (4): e1566, 2012

MESTRE, G. L.; RIBEIRO, A. L.; MIYAZAKI, R. D.; RODRIGUES, J. S.; DE ALMEIDA ADO, B.; SOUSA, V. R.; MISSAWA, N. A. Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiaba, Mato Grosso. **Rev Bras Parasitol Vet**, 20, (3): 228-34, 2011

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. **J Clin Microbiol**, 43, (11): 5515-9, 2005

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; DA ROCHA LIMA, A. C.; FRANCA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; DOS SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to Lutzomyia longipalpis phlebotomine sand flies. **Vet Parasitol**, 147, (1-2): 67-76, 2007

MICHELIN, A.; PERRI, S. H.; DE LIMA, V. M. Evaluation of TNF-alpha, IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of L. (L.) chagasi naturally infected dogs. **Ann Trop Med Parasitol**, 105, (5): 373-83, 2011

MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol**, 24, (8): 371-7, 2008

MIRO, G.; GALVEZ, R.; FRAILE, C.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Infectivity to Phlebotomus perniciosus of dogs naturally parasitized with Leishmania infantum after different treatments. **Parasit Vectors**, 4: 52, 2011

MOHAMMADIHA, A.; MOHEBALI, M.; HAGHIGHI, A.; MAHDIAN, R.; ABADI, A. R.; ZAREI, Z.; YEGANEH, F.; KAZEMI, B.; TAGHIPOUR, N.; AKHOUNDI, B. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of Leishmania (Leishmania) infantum infection in human and dog blood samples. **Exp Parasitol**, 133, (1): 89-94, 2013

MONTOYA, L.; GALLEGO, M.; GAVIGNET, B.; PIARROUX, R.; RIOUX, J. A.; PORTUS, M.; FISA, R. Application of microsatellite genotyping to the study of a restricted Leishmania infantum focus: different genotype compositions in isolates from dogs and sand flies. **Am J Trop Med Hyg**, 76, (5): 888-95, 2007

MORALES, M. A.; CHICHARRO, C.; ARES, M.; CANAVATE, C.; BARKER, D. C.; ALVAR, J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 95, (1): 104-7, 2001

MOREIRA, D.; SANTAREM, N.; LOUREIRO, I.; TAVARES, J.; SILVA, A. M.; AMORIM, A. M.; OUAISSI, A.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; SILVESTRE, R. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, (1): e1469, 2012

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, 18 (9): 399-405, 2002

MOTOIE, G.; FERREIRA, G. E.; CUPOLILLO, E.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in Sao Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. **Infect Genet Evol**, 18: 48-59, 2013

MUKHERJEE, P.; GHOSH, A. K.; GHOSE, A. C. Infection pattern and immune response in the spleen and liver of BALB/c mice intracardially infected with *Leishmania donovani* amastigotes. **Immunol Lett**, 86, (2): 131-8, 2003

NASCIMENTO, M. S.; ALBUQUERQUE, T. D.; DO-VALLE-MATTA, M. A.; CALDAS, I. S.; DINIZ, L. F.; TALVANI, A.; BAHIA, M. T.; ANDRADE, C. M.; GALVAO, L. M.; CAMARA, A. C.; GUEDES, P. M. Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, 153, (3-4): 202-8, 2013

NASEREDDIN, A.; EREQAT, S.; AZMI, K.; BANETH, G.; JAFFE, C. L.; ABDEEN, Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **J Parasitol**, 92, (1): 178-83, 2006

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. **J Clin Microbiol**, 40, (5): 1666-9, 2002

NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; MENZ, I.; PARRA, L. E.; XU, Z.; CHU, H. J.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; LUVIZOTTO, M. C. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, 23, (40): 4805-10, 2005

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Vet Dermatol**, 16, (4): 213-32, 2005

OCHSENREITHER, S.; KATRIN, K. **Multilocus Microsatellite Typing as a New Tool for Discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 Strains.** Journal of Clinical Microbiology. 44: 495-503 2006.

ODDONE, R.; SCHWEYNOCH, C.; SCHONIAN, G.; DE SOUSA CDOS, S.; CUPOLILLO, E.; ESPINOSA, D.; AREVALO, J.; NOYES, H.; MAURICIO, I.; KUHLS, K. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania* (*Viannia*) species. **J Clin Microbiol**, 47, (9): 2818-25, 2009

ODIWUOR, S. O.; SAAD, A. A.; DE DONCKER, S.; MAES, I.; LAURENT, T.; EL SAFI, S.; MBUCHI, M.; BUSCHER, P.; DUJARDIN, J. C.; VAN DER AUWERA, G. Universal PCR assays for the differential detection of all Old World *Leishmania* species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 30, (2): 209-18, 2011

OLIVA, G.; SCALONE, A.; FOGLIA MANZILLO, V.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **J Clin Microbiol**, 44, (4): 1318-22, 2006

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A.; DE OLIVEIRA, O.; DE OLIVEIRA, G. R.; ESPINDOLA, I. A.; DORVAL, M. E.; BRAZIL, R. P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 101, (8): 869-74, 2006

OLIVEIRA, G. G.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 88, (2): 243-8, 1993

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Rev**, 18, (2): 293-305, 2005

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends Parasitol**, 29, (7): 339-45, 2013

PAGÈS, M.; BASTIEN, P.; VEAS, F.; ROSSI, V.; BELLIS, M.; WINCKER, P.; RIOUX, J.-A.; ROIZÈS, G. Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 36, (2): 161-168, 1989

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 65: 510-517, 2001

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SILVA-ANTUNES, I.; MORGADO, A. A.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; LAVOR, C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, 27, (27): 3505-3512, 2009

PALATNIK, C. B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J. O.; MENDONCA-PREVIATO, L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. **Infect Immun**, 57, (3): 754-63, 1989

PANARO, M. A.; BRANDONISIO, O.; CIANCIULLI, A.; CAVALLO, P.; LACASELLA, V.; PARADIES, P.; TESTINI, G.; DE CAPRARIIS, D.; MITOLO, V.; OTRANTO, D. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Parasitology**, 136 823-831, 2009

PARRA, L. E.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; SOUZA, L. O.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; MENZ, I. Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, 25, (12): 2180-2186, 2007

PETERS, B. S.; FISH, D.; GOLDEN, R.; EVANS, D. A.; BRYCESON, A. D.; PINCHING, A. J. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. **Q J Med**, 77, (283): 1101-11, 1990

PIARROUX, R.; AZAIEZ, R.; LOSSI, A. M.; REYNIER, P.; MUSCATELLI, F.; GAMBARELLI, F.; FONTES, M.; DUMON, H.; QUILICI, M. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**, 49, (3): 364-9, 1993

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect.Immun.**, 62, (1): 229-235, 1994

PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S. Y.; SLAPPENDEL, R.; FRAGIO, C.; RUITENBERG, E. J.; BERNADINA, W.; RUTTEN, V. P. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Vet.Immunol.Immunopathol.**, 69, (2-4): 121-126, 1999

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M. V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. D.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G., JR. 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.**, 14, (5): 544-548, 2007

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M.; FERREIRA, E. C.; ROCHA-LIMA, A. C.; XAVIER, A. A.; GONTIJO, C. M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Trop.**, 111, (3): 289-294, 2009

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, 122, (Pt 3): 253-61, 2001

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; SHAW, M. A.; DAY, M. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, C.; KAYE, P. M. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J.Infect.Dis.**, 183, (9): 1421-1424, 2001

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M.; KAYE, P. M.; SHAW, M. A.; DYE, C.; DAY, M. J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet.Immunol.Immunopathol.**, 91, (3-4): 161-168, 2003

QUINNELL, R. J.; KENNEDY, L. J.; BARNES, A.; COURTENAY, O.; DYE, C.; GARCEZ, L. M.; SHAW, M. A.; CARTER, S. D.; THOMSON, W.; OLLIER, W. E. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, 55, (1): 23-8, 2003

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, 136, (14): 1915-1934, 2009

QUINNELL, R. J.; CARSON, C.; REITHINGER, R.; GARCEZ, L. M.; COURTENAY, O. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, (1): e1992, 2013

RAEYMAECKERS, S.; DOCX, M.; DEMEYERE, N. MRI-findings of nodular lesions in an enlarged spleen, associated with visceral Leishmaniasis. **Eur J Radiol**, 81, (10): 2550-3, 2012

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. **Journal of Clinical Microbiology**, 37, (9): 2931-2935, 1999

REALE, S.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; DI MAURO, C.; CIPRI, V.; CALDERONE, S.; MANNA, L.; VITALE, F. Multilocus microsatellite polymorphism analysis to characterize *Leishmania infantum* strains isolated in Sicily. **Transbound Emerg Dis**, 57, (1-2): 37-41, 2010

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*. **Annual Review of Immunology**, 13, (1): 151-177, 1995

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res.Vet.Sci.**, 81, (1): 68-75, 2006

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet.Immunol.Immunopathol.**, 112, (3-4): 102-116, 2006

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W. L.; CORREA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet.Immunol.Immunopathol.**, 128, (1-3): 87-95, 2009

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, 26, (7): 341-349, 2010

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. **Trends Parasitol.**, 18: 289-290, 2002

REYBURN, H.; ASHFORD, R.; MOHSEN, M.; HEWITT, S.; ROWLAND, M. A randomized controlled trial of insecticide-treated bednets and chaddars or top sheets, and residual spraying of interior rooms for the prevention of cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 94: 361-366, 2000

RIBEIRO, R. R.; MOURA, E. P.; PIMENTEL, V. M.; SAMPAIO, W. M.; SILVA, S. M.; SCHETTINI, D. A.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; TAFURI, W. L.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; FREZARD, F.; MICHALICK, M. S. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, 52, (7): 2564-72, 2008

RITTER, U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BROCKER, E.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. **J Infect Dis**, 173, (3): 699-709, 1996

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol. Today**, 16: 292-297, 2000

ROCHA, L. S.; FALQUETO, A.; DOS SANTOS, C. B.; FERREIRA, A. L.; DA GRACA, G. C.; GRIMALDI, G., JR.; CUPOLILLO, E. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**, 2010

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMÓN, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.;

ALBEROLA, J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, 37, (6): 683-693, 2007

ROJAS, R.; VALDERRAMA, L.; VALDERRAMA, M.; VARONA, M. X.; OUELLETTE, M.; SARAIVA, N. G. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. **J Infect Dis**, 193, (10): 1375-83, 2006

ROLAO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O. R.; CAMPINO, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **J Parasitol**, 90, (5): 1150-4, 2004

ROSARIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANCA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 100, (2): 197-203, 2005

ROSSI, V.; WINCKER, P.; RAVEL, C.; BLAINEAU, C.; PAGES, M.; BASTIEN, P. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. **Mol Biochem Parasitol**, 65, (2): 271-82, 1994

ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; DUNCAN, R. B.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum infantum*. **J Vet Intern Med**, 19, (6): 802-9, 2005

ROTUREAU, B.; RAVEL, C.; NACHER, M.; COUPPIE, P.; CURTET, I.; DEDET, J. P.; CARME, B. Molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. **J Clin Microbiol**, 44, (2): 468-73, 2006

ROUGERON, V.; DE MEEUS, T.; HIDE, M.; WALECKX, E.; BERMUDEZ, H.; AREVALO, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; DUJARDIN, J. C.; DE DONCKER, S.; LE RAY, D.; AYALA, F. J.; BANULS, A. L. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, (25): 10224-9, 2009

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; FERRUA, B.; MICHIELS, J. F.; ANJUERE, F.; FRAGAKI, K.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiol**, 1: 17, 2001

RUSSELL, R.; IRIBAR, M. P.; LAMBSON, B.; BREWSTER, S.; BLACKWELL, J. M.; DYE, C.; AJIOKA, J. W. Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. **Mol Biochem Parasitol**, 103, (1): 71-7, 1999

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat Immunol**, 3, (11): 1041-7, 2002

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. **J Hered**, 96, (7): 755-8, 2005

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; UTZET-SADURNI, M.; GIGER, U.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, 39 36-47, 2008

SANCHEZ, M. A.; DIAZ, N. L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F. J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, 70, (6): 618-624, 2004

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol**, 30, (10): 515-24, 2008

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

SANTOS, F. N.; BORJA-CABRERA, G. P.; MIYASHIRO, L. M.; GRECHI, J.; REIS, A. B.; MOREIRA, M. A.; MARTINS FILHO, O. A.; LUVIZOTTO, M. C.; MENZ, I.; PESSOA, L. M.; GONCALVES, P. R.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. **Vaccine**, 25, (33): 6176-90, 2007

SARAIVA, L.; LEITE, C. G.; DE CARVALHO, L. O.; ANDRADE FILHO, J. D.; DE MENEZES, F. C.; FIUZA VDE, O. Information system and geographic information system tools in the data analyses of the control program for visceral leishmaniasis from 2006 to 2010 in the sanitary district of venda nova, belo horizonte, minas gerais, Brazil. **J Trop Med**, 2012: 254361, 2012

SARKER, C. B.; ALAM, K. S.; JAMAL, M. F.; RAHMAN, S.; HUQ, M. H.; MUSA, A. K.; SUTRADHAR, S. R.; TALUKDER, S. I.; DEBNATH, C. R. Sensitivity of splenic and bone marrow aspirate study for diagnosis of kala-azar. **Mymensingh Med J**, 13, (2): 130-3, 2004

SAVAGE, R. S.; GHAHRAMANI, Z.; GRIFFIN, J. E.; DE LA CRUZ, B. J.; WILD, D. L. Discovering transcriptional modules by Bayesian data integration. **Bioinformatics**, 26, (12): i158-67, 2010

SAXENA, A. K.; SODHI, K. S.; NARAYANAN, S.; SINGHI, S.; KHANDELWAL, N. Splenic lesions in visceral leishmaniasis. **Indian J Pediatr**, 78, (6): 753-4, 2011

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the Leishmania recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet Parasitol**, 104, (4): 275-85, 2002

SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 47, (1): 349-58, 2003

SCHRIEFER, A.; SCHRIEFER, A. L.; GOES-NETO, A.; GUIMARAES, L. H.; CARVALHO, L. P.; ALMEIDA, R. P.; MACHADO, P. R.; LESSA, H. A.; DE JESUS, A. R.; RILEY, L. W.; CARVALHO, E. M. Multiclonal Leishmania braziliensis population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. **Infect Immun**, 72, (1): 508-14, 2004

SCHUBACH, E. Y.; FIGUEIREDO, F. B.; ROMERO, G. A. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 108, (9): 568-74, 2014

SEGATTO, M.; RIBEIRO, L. S.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H.; OLIVEIRA, M. R.; CARVALHO, S. F.; MACEDO, A. M.; VALADARES, H. M.; DIETZE, R.; BRITO, C. F.; LEMOS, E. M. Genetic diversity of Leishmania infantum field populations from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 107, (1): 39-47, 2012

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimony-resistant amastigotes of Leishmania infantum. **Acta Trop**, 74, (1): 25-31, 2000

SHWEASH, M.; ADRIENNE MCGACHY, H.; SCHROEDER, J.; NEAMATALLAH, T.; BRYANT, C. E.; MILLINGTON, O.; MOTTRAM, J. C.; ALEXANDER, J.; PLEVIN, R. Leishmania mexicana promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. **Mol Immunol**, 48, (15-16): 1800-8, 2011

SIDDIG, M.; GHALIB, H.; SHILLINGTON, D. C.; PETERSEN, E. A. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 82: 66-68, 1988

SILVA, J. S.; ANDRADE, A. C.; SANTANA, C. C.; SANTOS, L. Q.; OLIVEIRA, C. I.; VERAS, P. S.; VASSALLO, J.; DOS-SANTOS, W. L. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. **PLoS One**, 7, (1): e29103, 2012

SILVA, L. C.; CASTRO, R. S.; FIGUEIREDO, M. M.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **Int J Exp Pathol**, 2013

SMYTH, A. J.; GHOSH, A.; HASSAN, M. Q.; BASU, D.; DE BRUIJN, M. H.; ADHYA, S.; MALLIK, K. K.; BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of Leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, 105 (Pt 2): 183-92, 1992

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. **Vet Parasitol**, 90, (1-2): 37-45, 2000

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol**, 39, (2): 560-3, 2001

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**, 165, (1-2): 1-18, 2009

SOLCA MDA, S.; GUEDES, C. E.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G.; DOS SANTOS, W. L.; FRAGA, D. B.; VERAS, P. S. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of Leishmania in spleen samples from naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, 184, (2-4): 133-40, 2012

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 105, (1): 1-6, 2011

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol Cell Biol**, 85, (2): 138-47, 2007

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet.Res.**, 38, (4): 547-564, 2007

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, 9, (5): 951-8, 2002

_____. Treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**, 6, (16): 2821-9, 2005

TAFURI, W. L.; BARBOSA, A. J.; MICHALICK, M. S.; GENARO, O.; FRANCA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo**, 38, (2): 81-89, 1996

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**, 28, (10): 2731-9, 2011

TEAM, R. D. C. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.** Vienna, Austria: 2009. ISBN 3-900051-07-0.

TEIXEIRA NETO, R. G.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; VITOR, R. W.; COURA-VITAL, W.; QUARESMA, P. F.; KER, H. G.; DE MELO, L. A.; GONTIJO, C. M.; REIS, A. B. Relationship of Leishmania-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**, 169, (3-4): 248-57, 2010

TOJAL DA SILVA, A. C.; CUPOLILLO, E.; VOLPINI, A. C.; ALMEIDA, R.; ROMERO, G. A. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Trop Med Int Health**, 11, (9): 1388-98, 2006

TRAVI, B. L.; VELEZ, I. D.; BRUTUS, L.; SEGURA, I.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J. Lutzomyia evansi, an alternate vector of Leishmania chagasi in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 84, (5): 676-7, 1990

TRAVI, B. L.; OSORIO, E. Y.; SALDARRIAGA, O. A.; CADENA, H.; TABARES, C. J.; PENICHE, A.; LEE, S.; MELBY, P. C. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived Leishmania chagasi promastigotes. **Am J Trop Med Hyg**, 81, (6): 994-1003, 2009

TRIGO, J.; ABBEHUSEN, M.; NETTO, E. M.; NAKATANI, M.; PEDRAL-SAMPAIO, G.; DE JESUS, R. S.; GOTO, Y.; GUDERIAN, J.; HOWARD, R. F.; REED, S. G. Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f + MPL-SE. **Vaccine**, 28, (19): 3333-3340, 2010

TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J. B.; MACHADO, J. G.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H. Leishmania spp. and/or Trypanosoma cruzi diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, 164, (2-4): 118-23, 2009

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, 3, (7): Research0034, 2002

VELEZ, I. D.; COLMENARES, L. M.; MUNOZ, C. A. Two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to meglumine antimonial treatment. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 51, (4): 231-6, 2009

VERESS, B.; OMER, A.; SATIR, A. A.; EL HASSAN, A. M. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, 33, (5): 605-10, 1977

VEXENAT, J. A.; FONSECA DE CASTRO, J. A.; CAVALCANTE, R.; DA SILVA, M. R.; BATISTA, W. H.; CAMPOS, J. H.; PEREIRA, F. C.; TAVARES, J. P.; MILES, M. A. Preliminary observations on the diagnosis and transmissibility of canine visceral leishmaniasis in Teresina, n.e. Brazil. **Arch.Inst.Pasteur Tunis**, 70, (3-4): 467-472, 1993

VIOL, M. A.; LIMA, V. M.; AQUINO, M. C.; GALLO, G.; ALVES, I. P.; GENEROSO, D.; PERRI, S. H.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H.; NUNES, C. M.; BRESCIANI, K. D. Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Parasitol Res**, 111, (4): 1607-13, 2012

VOULDOUKIS, I.; DRAPIER, J. C.; NUSSLER, A. K.; TSELENTIS, Y.; DA SILVA, O. A.; GENTILINI, M.; MOSSALAYI, D. M.; MONJOUR, L.; DUGAS, B. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrob Agents Chemother**, 40, (1): 253-6, 1996

WERNECK, G. L.; COSTA, C. H.; WALKER, A. M.; DAVID, J. R.; WAND, M.; MAGUIRE, J. H. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiol Infect**, 135, (2): 195-201, 2007

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cad Saude Publica**, 24, (12): 2937-40, 2008

WHERRY, E. J. T cell exhaustion. **Nat Immunol**, 12, (6): 492-9, 2011

WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J. Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. **Oncogene**, 26, (22): 3172-84, 2007

WHO. **Control of the leishmaniases**. WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva. 2010

XAVIER, S. C.; DE ANDRADE, H. M.; MONTE, S. J.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC.Vet.Res.**, 2: 17, 2006

XU, C. F.; LEWIS, K.; CANTONE, K. L.; KHAN, P.; DONNELLY, C.; WHITE, N.; CROCKER, N.; BOYD, P. R.; ZAYKIN, D. V.; PURVIS, I. J. Effectiveness of computational methods in haplotype prediction. **Hum Genet**, 110, (2): 148-56, 2002

YURDAKUL, P.; DALTON, J.; BEATTIE, L.; BROWN, N.; ERGUVEN, S.; MAROOF, A.; KAYE, P. M. Compartment-specific remodeling of splenic micro-architecture during experimental visceral leishmaniasis. **Am J Pathol**, 179, (1): 23-9, 2011

ZANIN, F. H.; COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; MARQUES-DA-SILVA, E. A.; SILVA COSTA, M. M.; REZENDE, S. A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes Infect**, 9, (9): 1070-7, 2007

ZHANG, W. W.; CHAREST, H.; GHEDIN, E.; MATLASHEWSKI, G. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol**, 78, (1-2): 79-90, 1996

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, (16): 8807-11, 1997

ZIJLSTRA, E. E. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 86: 505-507, 1992

8. ANEXOS

ANEXO I. Declaração da Comissão de Ética para o Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência

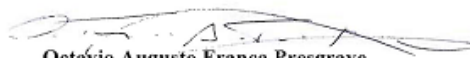


Comissão de Ética
no Uso de Animais

Rio de Janeiro, October 24, 2014.

Dear Mrs.
Nazare Fernanda Morgado

The Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Oswaldo Cruz Foundation declares that research which uses tissues fragments after euthanasia, without animal manipulation does not need to be submitted for this Committee, according to Brazilian's Law 11794/08.



Octávio Augusto França Presgrave

Coordinator

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04828550

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

ANEXO II. Genes analisados no ensaio de PCR multiplex em tempo real.

Função	Gene	Forward (5'-->3 ')	Reverse (5'-->3 ')	Referência NCBI	Tam anho do prod uto	Referência
citocinas	IFN beta	GGAAATCGAGAAATCACGCC	GTGGTCTCATTCCATCCTGT	NM_001135787	123	-
	IL17A	TTGGAATCTGCACCGCAATG	CAGCCACCAGCATCTTCTCT	NM_001165878	206	-
	IL1 β	CCCTGGAAATGTGAAGTGCT	ACACGAAATGCCTCAGACTC	NM_001037971.1	116	-
	IL2	GCAACTCTTGTCTTGCATCG	ATTCTGTGGCCTTCTTGGGC	NM_001003305	209	-
	IL23	CTCTCACAGAAGCTCTGCAC	CTTGGTAGGTCCACATGTCC	XM_538231.3	68	-
	IL27	CTGAGAAGATGCACCTGTGG	CCTTTCCTCTCCTCATGCTG	XM_844736.2	145	-
	IL27 EBI3	CCAGAGCAGCTCATCAAGCC	TCCGTGATGCTTGTATCGGA	XM_542161.3	153	-
	IL4	CCTCACAGCGAGAAACGACTC	ATCTGTTGGAGCAGTTGTGTG	NM_001003159	143	-
	IL6	TCCAGAACAACATGAGGGTGA	TCCTGATTCTTACCTTGCTCTT	NM_001003301.1	100	-
	iNOS	GCCCACGGAAGAAGTTAAAG	CAGGTCAAGTATCGGGTGTG	NM_001003186	160	-
quimiocinas	CCL01	ACTTTTCAGAGAAGAGGATCGC	TGGAGCTGGTGTGTTTGTAAACA	NM_001005252	60	Nascimento et al., 2013; Santiago et al., 2006
	CCL02/MCP-1	AGCAAGTGTCCCAAAGAAGC	TGGGTTTGGCTTTTCTTGTC	NM_001003297.1	122	-
	CCL03/MIP1 α	CAATAGCCTGCTGCTTCTCC	CAGATCGGCCACATATTCCT	NM_001005251.1	176	-
	CCL04	CGTCCTTCTCTCCTTGTGC	TGAACCCATTGGTGCTGAGAG	NM_001005250.1	67	-
	CCL05	GCAGCTACCTTGTCAATCCT	GAGCACTTGCTGCTGGTGTA	NM_001003010.2	161	-
	CCL13	TCAGTGCCCTATCACTTGC	TTCGTAAGATGACAGC	NM_001003966	121	-
	CCL17	CCATCGTGTTTGTAACTGTCCA	AATATCTGACCGCCTTCTTAC	NM_001003051.1	81	Nascimento et al., 2013
	CCL19	CGAGCCTTCACTACCTCCT	AGTGTGGTGAACACAACGGC	NM_001005256.1	65	-
	CCL20	CCGGATCTATCATGGGCTTC	TCTTGACTCTATGGCTGAGGA	NM_001005254	156	-
	CCL21	CTTCCTTGCTCCTGGTTCTGG	CCGGAATCTTCTTAGGCTG	NM_001005258.1	101	-

	CCL26	TTACCACACGTGGCAGTGAT	AGGGAAGGATCTTGTGGCTA	NM_001005253	66	-
	CXCL08	ACACTCCACACCTTTCCAT	GGCACACCTCATTTCATTG	AF048717	116	-
	CXCL09	CAGATGGTCCTTAAGCCACTTT	CCTTTCCCTGTGAACCTCAA	-	51	Nascimento et al., 2013
	CXCL10	TGAACCAAAGTGCTGTTCTTATT	ACGATGGACTTGCAGGAATC	NM_001010949.1	168	-
	CXCL13	GGGTGCCCAAAAAGAGAAATC	GATGGGAGGGTTCAAGCATAACA	XM_845089.1	0	Silva et al., 2012
receptores de quimiocinas	CCR01	TTCCAAGACAGCCTGTTCAC	ACCTTTTAGCCAGATGCCTG	NM_001038606	193	White et al., 2013
	CCR02	CGCATTCTCTGTTCAACC	TCGTAATGGTGGTGGGTTTC	XM_541906.1	58	White et al., 2013
	CCR03	TGGTTGTCTGCTACTCTGGA	TGTTTGTCTGCTCACAAGT	NM_001005261	190	Nascimento et al., 2013
	CCR04	CCATGACTGACGTGTACCTG	TCCAAAACCCACTGGTCTG	NM_001003020	104	Nascimento et al., 2013
	CCR05	TGAAAAGAAGAGGCACAAGG	CCAAAGAATTCCTGGAAGGT	NM_001012342	117	Nascimento et al., 2013
	CCR07	CCTTCCTGTGTGGTTTCAGC	TTCATTGGTTTCCCAGGTC	XM_548131.4	58	White et al., 2013
	CCR09	GACCATCACTGTCCTTACCG	ATGGTTTGAGTGACCTGGAA	XM_541909.3	150	White et al., 2013
	CCR10	CTAGTGTCTCCCTGGTGGTG	CGACAAAGGGTAGGGTTAGG	XM_844228.2	162	White et al., 2013
resposta inflamatória	ARG1	GCAGAGCATGAGTTCCACGG	GGACATCAACAAAGGGCACG	XM_532053.3	182	Probst et al., 2012; Descoteaux et al., 2012
	CD40	CAAGAAGCCAGAGAATAAGG	AATTCCTCCAAGTCCTCCAC	NM_001002982	57	Descoteaux et al., 2012
	FOXP3	AAACAGCACATTCCCAGAGTTC	AGGATGGCCCAGCGGATGAG	NM_001168461.1	102	-
	G6PD	ACTTTGTACGCAGTGACGAG	TGCCGTAAACGTAAGGGATG	XM_538209.3	105	Probst et al., 2012
	GATA-3	CCCAAGAGCAGCTCGTTCA	GCGTTGGAGTGGTCAGCAT	AF459800	106	Strauss-Ayali et al., 2007
	IGF1	CAAGGCTCAGAAGGAAGTACA	TCTTCACAACCTCAGGAAGGTC	XM_848024.2	97	Probst et al., 2012
	IFNAR-1	GCAGTGTTTTTAGTGACGCT	CTCAAGAAGACTTTTCGCAGC	NM_000629	133	-
	IFNAR-2	TAGAAGGATTCAGCGGGAAC	CCAGCCAGAAATTGTGTGAG	NM_207584	57	-
	MAP2K5	GGCACCTGTAATGCTGTGG	TATCACATCCAGCACGTCCC	XM_847775.3	154	Probst et al., 2012
	MAP4K4	TGAACGCAATGACAAGGTC	GCTCAGAAGAGAAGTCCTGC	XM_003431519.2	94	Probst et al., 2012
	MT1E	TGCAAATGCAAGGAGTGC	GGAGCAGCAACTCTTCTTGC	NM_001003173	51	Probst et al., 2012
	OAS1	TAAAGTTGTCAAGGGTGGCT	AAGAAAGACCACAAGGTCGG	NM_001048131.1	79	-
	OAS2	GCATTTAATGTGCTCGGTCA	GGAAAACCTCTCCTCCCTCAG	NM_001048134	111	-
	OAS3	TCGACCCTCCTCCAGAGC	TTTGTCTGAGCTGCGACCTG	NM_001048091	153	-

	OASL	AAAGTGGTCAAGGTAGGCTC	ATCAGACTCAGGATGGCTT	NM_001253787	137	-
	RAB7	CTGAACCCATCAAACCTGGAC	TCTGTGCTCTGCTCTCACTG	NM_001003316.1	90	Probst et al., 2012
	SEC61B	CTCAAGGTTGGCCCTGTTCC	TGTACTTGCCCCAAATGTGC	NM_001003326.1	85	Probst et al., 2012
	TAX1bp1	CCCTCGCAAGATTCACAATG	CGAGCAGTACTCCATCCAAC	XM_859678.2	199	Probst et al., 2012
	T-bet	CCCCTTCGGTGTGGACTGAGA	GGAGGAGCTGTCCGCACTGG	XM_548164.2	122	Strauss-Ayali et al., 2007
	VAV1	CTGTTTCATCTCTGGTACGCC	GATACTTTCTGCCCTGAGC	XM_542134.3	53	Probst et al., 2012
síntese de proteínas, desenvolvimento e morte celular	ADAMTS1	GCTATGTCTTGATCCGGGAC	CCACGGAATGTCATCGTCTT	NM_001242712	52	Probst et al., 2012
	AKTIP	GGAGTCCACGTTATGAACCC	TTCAGATCGTTTGCGGACAG	XM_535302.3	63	Probst et al., 2012
	APLP2	TACTTCGACCTCTCCAAGGG	GAGTTGGGGGAATCATCGTC	XM_536530.3	124	Probst et al., 2012
	DDX6	AAGATCAGGTCGCTTTGGTC	AATGTTGCTTGGGATCGGTT	XM_844882.2	124	Probst et al., 2012
	RGS19	AGAACATGCTCTTCTGGCTG	GTCCAGGCTCACCTCCTT	XM_548528.4	131	Probst et al., 2012
	SNAPIN	GACAACCTAGCCACTGAGCTG	TTCTTCACGTAGGGGTCGAG	XM_547578.3	77	Probst et al., 2012
	VASP	CAGGAAAGTCAGCAAGCAAG	GTGCTCTCTGCTTTAGGGAC	NM_001003256	63	Probst et al., 2012
metabolismo lipídico, movimento celular e bioquímica de pequenas moléculas	ABCA1	GCAACATGAGTGCCACTTTC	CATCTGAGAACAGGCGAGAC	XM_538773.4	176	Descoteaux et al., 2012
	ACSF2	ATGGTGAGCGTGATGTATGG	GAAGGAGCCTCTCTCTTTC	XM_537673.3	99	Descoteaux et al., 2012
	ACSL1	CAAACAGGTGGCGGAGATAG	TCTGTTCTGAGCGAAGATGC	XM_852283.2	103	Descoteaux et al., 2012
	AGPAT1	TTCCTGAGGGCACAAGAAAC	TACCTGACATCGTCCCGAAG	XM_855613.2	167	-
	AGPAT2	ACAATGGAGACCTGCTACCT	CCCTGATTGTTCTGAGCTG	XM_548370.4	144	-
	AGPAT5	TTCTCAGCACGGAGGGATCT	GCCTTCTTGAGCAGCAAATG	XM_003432116.1	190	Descoteaux et al., 2012
	CASP4	AAAGAGTGCTGAACCACGAG	AGATGGTGAACCTGAGGAGA	NM_001003125	191	Descoteaux et al., 2012
	CAV1	CAAGCATCTCAACGACGAC	TTGTCACAGTGAAGGTGGTG	NM_001003296	119	Descoteaux et al., 2012
	CD36	TGGGAAAGACAACGTAAGCC	AATGAGGCTGCATCTGTACC	NM_001177734	114	Descoteaux et al., 2012
	CD38	CCGAGGAACAAAGTGGACC	GACAGATCTGGCCTTTCTG	NM_001003143	100	Descoteaux et al., 2012
	CD83	CAGAAGGAAGGCTCCTTAGC	TCCTTAGGGCATCCTGTAC	XM_847554.2	164	Descoteaux et al., 2012
	CD86	GACCACATCCTCTGGATTGC	ACCGTACTCTTTCCTTGGTC	NM_001003146	172	Descoteaux et al., 2012
	CYP27A1	GCTGGTGTAGACACGACATC	TTATGGGGACCACAGGGTAG	XM_848001.2	250	Descoteaux et al., 2012
	DGAT2	GGCATTTCCTACGTTGTTGC	CCAGTGCTCCAACCTACCATC	XM_542303.3	53	Descoteaux et al., 2012
	Hmgcr	TGGAAACCCATGAACGAGGT	AGCTCCATCACCAAGGAGT	XM_536323.3	122	Descoteaux et al., 2012

	ICAM1	CCTCATGCAACCAGACCTCC	GGGAACCAGTATACGGTGAGG	NM_001003291	184	Descoteaux et al., 2012
	ITGAV	CAGTCGACAGGCCCATATTC	TTGCAGATGTTGTCCTCACC	XM_845896.2	51	Probst et al., 2012
	MT1E	GCAAGAAGAGTTGCTGCTCCTG	AGGTTTGTACATGTTGCTTGCT	NM_001003173	155	Probst et al., 2012
	PLA2G4F	ACTTTGCAGAGTGGTGTGAG	GCTCAGTGGGAACATAAGCA	XM_544639.3	75	Probst et al., 2012
	PPAP2B	AATGCAGAGGTGATGACAGC	AGGTACAGCACCAAATACAG	XM_536696.3	103	Descoteaux et al., 2012
	PTAFR	GCTTCCACCAGGGTATCAAC	AAGAAGGCAGAGAGTGACCT	XM_544462.2	50	Santiago et al., 2006
	RHOG	GGATGGTGTGTCAGGTTGAGAG	GGATGCAGTGACCTATGGAC	XM_542335.3	125	Probst et al., 2012
	SIAH1-like	GAGAAAAGAAATGAGCCGCC	AGACGGGGTACACTTTGAGG	XM_003638931.1	67	Probst et al., 2012
	SQLE	CTGCTTTCTGTCCTGTCTCC	GAAAATGGCTCGGGGTTTTG	XM_845547.2	123	Descoteaux et al., 2012
	TAXBP1	CCCTCGCAAGATTCACAATG	CGAGCAGTACTCCATCCAAC	XM_859678.2	199	Probst et al., 2012
	MMP12	AAACTTGTTCTGTTGCTG	CTTTTGGATCACTGGAATGG	XM_849501.2	71	Descoteaux et al., 2012
genes constitutivos	B2M	TCCTCATCCTCCTCGCT	TTCTCTGCTGGGTGTCG	XM_003640047.1	85	Brinkhof et al., 2006
	RPS5	TCTCTCCTGTCTGTGCCACG	TTCACTGCAATGTAGTCCTGC	XM_533568	198	-
	RPS19	CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG	GTTCTCATCGTAGGGAGCAAG	XM_533657	95	Brinkhof et al., 2006
	GAPDH	CCAGGTGGTCTCCTGTGACT	CCAGGAAATGAGCTTGACAAA	XM_003434387.2	103	-
	RP32	ATGCCCAACATTGGTTATGG	CTCTTCCACGATGGCTTTG	NM_001252169.1	181	-
	HPRT	CCAGTCAACAGGGGACATAA	TGACCAAGGAAAGCAAAGTC	NM_001003357.1	128	-

ANEXO III. Dados descritivos dos animais incluídos no estudo

Animal	Local	Sexo	Porte	Raça	Pelagem	Condição Nutricional (0 - boa; 3 - ruim)	Cultura	ELISA IgG cut off soros Rio	ELISA IgM cut off soros Rio	DPP® LVC	PCR KDNA	PCR hsp70	Escore clínico	
1	100	Barra do Garças	M	G	SRD	C	0	N	P	N	P	P	P	6
4	103	Barra do Garças	F	G	SRD	C	0	N	P	N	N	P	P	0
6	105	Barra do Garças	F	G	Dálmata	C	3	P	P	N	P	P	P	9
9	108	Cuiabá	M	G	Rottweiler	C	0	N	P	N	P	P	P	0
10	109	Cuiabá	F	G	Rottweiler	C	0	N	P	N	P	P	P	2
11	110	Cuiabá	F	G	SRD	C	2	P	P	N	P	P	P	4
21	120	Rondonópolis	F	G	Rottweiler	C	0	N	N	N	N	P	P	3
22	121	Rondonópolis	M	G	SRD	C	3	P	P	N	P	P	P	4
44	232	Cuiabá	F	G	SRD	C	0	N	P	P	N	P	N	0
50	238	Cuiabá	M	G	SRD	C	0	N	P	indeterminado	P	P	N	0
78	266	Cuiabá	F	G	SRD	C	2	N	N	N	N	P	P	5
8	107	Cuiabá	M	M	SRD	C	0	P	P	N	P	P	P	6
12	111	Cuiabá	F	M	SRD	C	1	N	P	N	P	P	P	8
14	113	Cuiabá	F	M	SRD	C	2	P	P	N	P	P	P	8
15	114	Cuiabá	F	M	SRD	C	3	N	N	N	N	P	P	7
16	115	Várzea Grande	F	M	SRD	C	1	N	P	N	P	P	P	5
17	116	Várzea Grande	M	M	SRD	C	0	P	P	P	P	P	P	0
19	118	Várzea Grande	F	M	SRD	C	0	N	P	P	N	P	P	0
20	119	Várzea Grande	M	M	SRD	C	0	N	P	P	N	P	N	1

24	123	Rondonópolis	M	M	Boxer	C	0	N	N	N	N	P	P	0
26	125	Rondonópolis	M	M	Pitbull	C	0	P	P	P	P	P	P	5
27	126	Rondonópolis	M	M	SRD	C	0	N	P	P	P	P	P	1
34	222	Cuiabá	F	M	Pitbull	C	0	N	N	indeterminado	N	P	P	0
53	241	Cuiabá	F	M	SRD	C	2	N	P	N	P	P	P	10
64	252	Cuiabá	M	M	Pitbull	C	0	P	P	N	P	P	P	3
66	254	Cuiabá	M	M	SRD	C	2	P	P	N	P	P	P	8
67	255	Cuiabá	M	M	SRD	C	2	P	P	N	P	P	P	12
77	265	Cuiabá	M	M	SRD	C	0	P	P	N	P	P	P	9
79	267	Cuiabá	F	M	Pitbull	C	0	N	N	P	P	P	P	0
83	283	Cuiabá	F	M	SRD	C	0	P	P	N	P	P	P	7
84	284	Cuiabá	F	M	Pitbull	C	0	N	N	N	N	P	P	0
		Barra do												
3	102	Garças	F	P	Pincher	C	0	N	P	N	N	P	P	0
5	104	Cuiabá	M	P	SRD	C	3	P	-	-	P	P	N	9
23	122	Rondonópolis	M	P	SRD	C	0	P	P	P	P	P	P	0
25	124	Rondonópolis	F	P	SRD	C	0	P	P	N	P	P	P	12
28	127	Rondonópolis	M	P	SRD	C	2	N	P	P	P	P	P	10
30	129	Rondonópolis	M	P	SRD	C	2	N	N	N	P	P	P	5
49	237	Cuiabá	M	P	Pincher	C	0	N	P	P	P	P	N	3
52	240	Cuiabá	F	P	SRD	C	0	P	P	P	P	P	P	5
54	242	Cuiabá	F	P	SRD	C	2	N	P	indeterminado	P	P	P	6
55	243	Cuiabá	F	P	Pincher	C	3	P	P	P	P	P	P	8
72	260	Cuiabá	F	P	SRD	C	0	N	N	N	N	P	P	4
75	263	Cuiabá	M	P	Pincher	C	1	N	N	N	N	P	N	5
81	281	Cuiabá	M	P	SRD	C	0	P	N	N	P	P	P	6
85	285	Cuiabá	F	P	Pincher	C	0	N	P	N	P	P	P	12
57	245	Cuiabá	F	-	SRD	C	0	N	P	N	P	P	P	5

58	246	Cuiabá	F	-	SRD	C	1	N	P	N	P	P	N	2
60	248	Cuiabá	M	-	SRD	C	1	P	P	P	P	P	P	7
61	249	Cuiabá	F	-	SRD	C	0	N	P	N	P	P	P	3
62	250	Cuiabá	F	-	SRD	C	0	N	N	N	P	P	P	0
63	251	Cuiabá	M	-	SRD	C	0	P	P	P	P	P	P	0
70	258	Cuiabá	F	-	SRD	C	0	P	P	N	P	P	P	5
74	262	Cuiabá	M	-	SRD	C	3	P	P	N	P	P	P	12
76	264	Cuiabá	M	-	SRD	C	2	N	P	P	P	P	P	7
82	282	Cuiabá	F	-	SRD	C	0	N	P	N	P	P	P	1
86	286	Cuiabá	F	-	SRD	C	0	N	N	P	N	P	P	1
87	287	Cuiabá	F	-	SRD	C	0	N	N	P	N	P	P	2
88	288	Cuiabá	M	-	SRD	C	3	N	P	P	P	P	N	12
89	290	Cuiabá	F	-	SRD	C	0	N	N	N	N	N	N	3
90	291	Cuiabá	M	-	SRD	C	0	P	P	P	N	P	N	2
91	292	Cuiabá	M	-	SRD	C	0	N	N	N	N	P	P	0
92	293	Cuiabá	M	-	SRD	C	0	N	N	P	N	P	N	0
7	106	Cuiabá	M	G	SRD/Pastor	L	0	N	P	N	P	P	P	2
18	117	Várzea Grande	M	G	SRD	L	0	N	P	N	P	P	P	8
36	224	Cuiabá	M	G	SRD	L	2	N	P	P	P	P	P	6
29	128	Rondonópolis	M	M	SRD	L	0	N	P	N	P	P	P	5
51	239	Cuiabá	M	M	SRD	L	3	P	P	P	P	P	P	15
59	247	Cuiabá	M	M	Pator belga	L	0	P	P	P	P	P	P	2
		Barra do												
2	101	Garças	M	P	SRD	L	0	N	P	P	N	P	P	0
13	112	Cuiabá	F	P	SRD	L	0	N	-	-	N	P	P	0
32	220	Cuiabá	M	P	SRD/Cocker	L	1	N	P	indeterminado	N	P	P	6
80	268	Cuiabá	F	P	SRD	L	0	N	N	P	P	P	P	0
43	231	Cuiabá	F	-	SRD	L	1	P	P	N	P	P	N	6

69	257	Cuiabá	F	-	SRD	L	1	P	P	N	P	P	P	6
41	229	Cuiabá	M	G	SRD	-	0	P	P	N	P	P	P	2
73	261	Cuiabá	F	M	SRD	-	0	P	P	P	P	P	P	11
71	259	Cuiabá	M	P	SRD	-	2	P	P	N	P	P	P	14
31	219	Cuiabá	F	-	SRD	-	0	P	P	indeterminado	P	P	N	0
33	221	Cuiabá	F	-	SRD	-	0	P	P	indeterminado	P	P	P	5
35	223	Cuiabá	M	-	SRD	-	3	P	P	P	P	P	N	10
37	225	Cuiabá	M	-	SRD	-	3	P	N	N	P	P	P	7
38	226	Cuiabá	M	-	SRD	-	1	P	P	N	P	P	P	6
39	227	Cuiabá	M	-	SRD	-	2	N	P	P	P	P	P	5
40	228	Cuiabá	F	-	SRD	-	0	N	N	N	N	P	P	1
42	230	Cuiabá	M	-	SRD	-	1	N	P	N	N	P	N	7
45	233	Cuiabá	F	-	SRD	-	0	N	P	P	P	P	N	0
46	234	Cuiabá	M	-	SRD	-	2	N	N	P	P	P	P	6
47	235	Cuiabá	F	-	SRD	-	0	N	P	P	P	P	P	8
48	236	Cuiabá	M	-	SRD	-	0	N	P	P	P	P	N	0
56	244	Cuiabá	M	-	SRD	-	3	P	N	N	P	P	P	3
65	253	Cuiabá	F	-	SRD	-	1	N	P	N	P	P	P	11
68	256	Cuiabá	M	-	SRD	-	2	P	P	P	P	P	P	7

L - longa; C - curta; N - negativo; P - positivo; SRD - sem raça definida

Dados perdidos - preenchidos com "-"

ANEXO IV. Quadros referentes aos testes ANOVA

Figura 4.4A	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	8,212	3	2,737	23,39	0,001
Dentro dos grupos	11,82	101	0,117		
Total	20,03	104			

Figura 4.4B	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	3,772	3	1,257	8,066	0,001
Dentro dos grupos	15,59	100	0,155		
Total	19,36	103			

Figura 4.4C	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	23330	3	7444	10,23	0,001
Dentro dos grupos	62600	86	727,9		
Total	84930	89			

Figura 4.4D	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	7,813	2	3,906	33,12	0,001
Dentro dos grupos	12,03	102	0,118		
Total	19,84	104			

Figura 4.4E	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	3,430	2	1,715	10,63	0,001
Dentro dos grupos	16,29	101	0,161		
Total	19,72	103			

Figura 4.4F	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	21710	2	10850	14,89	0,001

Dentro dos grupos	64140	88	728,9		
Total	85850	90			

Figura 4.8A	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	32,72	2	16,36	5,102	0,0081
Dentro dos grupos	272,6	85	3,207		
Total	305,3	87			

Figura 4.8C	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	3,334	2	1,667	0,725	0,4884
Dentro dos grupos	142,5	62	2,299		
Total	145,9	64			

Figura 4.11A	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	7,898	2	3,949	34,22	0,0001
Dentro dos grupos	11,31	98	0,1154		
Total	19,21	100			

Figura 4.11B	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	2,461	2	1,230	7,180	0,0012
Dentro dos grupos	16,62	97	0,1714		
Total	19,08	99			

Figura 4.11C	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	27120	2	13560	20,68	0,0001
Dentro dos grupos	53770	82	655,8		
Total	80890	84			

Figura 4.15C	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	3912	2	1956	5,570	0,0054

Dentro dos grupos	29500	84	351,1		
Total	33410	86			

Figura 4.15D	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	4040	2	2020	5,914	0,0043
Dentro dos grupos	22880	67	341,5		
Total	26920	69			

Figura 4.15E	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Valor de P
Entre grupos	2312	2	1156	3,123	0,001
Dentro dos grupos	31090	84	370,2		
Total	33410	86			

ANEXO V. Manuscrito aceito para publicação

PLOS ONE

Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-14-47300R1
Article Type:	Research Article
Full Title:	Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in <i>Leishmania infantum</i> -naturally infected dogs
Short Title:	Spleen immune response in CVL
Corresponding Author:	Amanda Santos Cavalcanti, DVM Oswaldo Cruz Foundation Rio de Janeiro, RJ BRAZIL
Keywords:	canine visceral leishmaniasis; <i>Leishmania infantum</i> ; immune response; spleen
Abstract:	Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) shares many aspects with the human disease and dogs are considered the main urban reservoir of <i>L. infantum</i> in zoonotic VL. Infected dogs develop progressive disease with a large clinical spectrum. A complex balance between the parasite and the genetic/immunological background of the host are decisive for infection evolution and clinical outcome. This study comprised 92 <i>Leishmania</i> infected mongrel dogs of various ages from Mato Grosso, Brazil. Spleen samples were collected for determining parasite load, humoral response, cytokine mRNA expression and histopathology alterations. By real-time PCR for the <i>ssrRNA</i> <i>Leishmania</i> gene, two groups were defined; a low (lowP, n=46) and a high parasite load groups (highP, n=42). When comparing these groups, results show variable individual humoral immune response with higher specific IgG production in infected animals but with a notable difference in CVL rapid test optical densities (DPP®) between highP and lowP groups. Splenic architecture disruption was characterized by disorganization of white pulp, more evident in animals with high parasitism. All cytokine transcripts in spleen were less expressed in highP than lowP groups with a large heterogeneous variation in response. Individual correlation analysis between cytokine expression and parasite load revealed a negative correlation for both pro-inflammatory cytokines: IFN γ , IL-12, IL-6; and anti-inflammatory cytokines: IL-10 and TGF β . TNF showed the best negative correlation ($r^2 = 0.231$; $p < 0.001$). Herein we describe impairment on mRNA cytokine expression in <i>leishmania</i> infected dogs with high parasite load associated with a structural modification in the splenic lymphoid micro-architecture. We also discuss the possible mechanism responsible for the uncontrolled parasite growth and clinical outcome.
Order of Authors:	Amanda Santos Cavalcanti, DVM Marcelo Ribeiro-Alves Luiza de O.R. Pereira Gustavo Leandro da Cruz Mestre Anna Beatriz Robottom Ferreira Fernanda Nazaré Morgado Mariana Cortes Boité Elisa Cupolillo Milton Osorio Moraes Renato Porrozi
Opposed Reviewers:	
Response to Reviewers:	Dear Editor, The authors appreciated the reviewers' comments and discussions and we are also grateful for the opportunity to answer their questions and submit our revised

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation



Communication/Comunicação

Characterization of *Leishmania infantum* species in dogs from the urban area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil

Caracterização da espécie *Leishmania infantum* em cães de área urbana de Cuiabá, Estado do Mato Grosso

Bianca De Santis¹, Elizabeth Gloria Oliveira Barbosa Santos¹, Elisa Cupolillo², Renato Porrozzi², Amanda dos Santos Cavalcanti², Bárbara Neves dos Santos², Saulo Teixeira De Moura³, Kellen Malhado⁴ and Sergio Augusto Miranda Chaves⁵

ABSTRACT

Introduction: Visceral leishmaniasis presents urban behavior in some Brazilian cities, with domestic dogs as the main infection source. In Cuiabá, MT, canine visceral leishmaniasis was diagnosed and characterized as recommended by the Ministry of Health. **Methods:** Biological samples from suspected canine carriers were analyzed by the isoenzyme electrophoresis technique. The 6PGDH enzyme and reference strain IOC/L0566 (MHOM/BR/1975/M2903) of *Leishmania (Leishmania) infantum* was used as one of the controls. **Results:** Electrophoresis analysis revealed that the canine isolates belonged to the species *L. (L.) infantum*. **Conclusions:** The authors emphasize the importance of species characterization, particularly in areas of mixed infection like Cuiabá.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis. *Leishmania infantum*. Cuiabá.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose visceral apresenta comportamento urbano em algumas cidades brasileiras, sendo os cães domésticos as principais fontes de infecção. Em Cuiabá-MT, a leishmaniose visceral canina foi diagnosticada e caracterizada, como recomendação do Ministério da Saúde. **Métodos:** Amostras biológicas de cães suspeitos foram analisadas por eletroforese de isoenzimas. Foram utilizadas a enzima 6PGDH e a cepa de referência IOC/L0566 (MHOM/BR/1975/M2903) de *Leishmania (Leishmania) infantum*, como um dos controles. **Resultados:** A análise eletroforética revelou que os isolados pertenciam à espécie *L. (L.) infantum*. **Conclusões:** Os autores ressaltam a importância da caracterização da espécie, principalmente em cidades com infecção mista, como Cuiabá.

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral canina. *Leishmania infantum*. Cuiabá.

Visceral leishmaniasis (VL) is considered one of the parasitic diseases of greatest impact on public health worldwide. Annually affecting an average of 500,000 people, and endemically¹ distributed in 65 countries due to the expansion of the area of infection, with a significant increase in the number of cases, VL has become one of the priorities of the group of tropical diseases^{1,2}.

1. Laboratório de Zoonoses, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 2. Laboratório de Referência Nacional de Tipagem de *Leishmania*, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 3. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, São Vicente, MT. 4. Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde de Cuiabá, MT. 5. Laboratório de Ecologia, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Address to: Dra. Elizabeth Gloria Oliveira Barbosa dos Santos. Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ. Rua Leopoldo Bulhões 1480, Mangueiras, 21041-210 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Phone: 55 21 2598-2580

e-mail: elizabeth@ensp.fiocruz.br

Received in 19/09/2010

Accepted in 29/01/2011

More than 90% of VL cases reported in the New World have occurred in Brazil, principally in the northeastern region, where it produces high levels of morbidity. Initially, VL presented a rural character, but has expanded to the urban areas of medium and big cities in the last few decades. This profile modification is mainly observed in the municipal districts of Southeastern and Centralwestern regions of the country, where the VL is urbanized and the domestic dog (*Canis familiaris*) is the main infection source^{2,3}. It should be highlighted that Cuiabá, the capital of the State of Mato Grosso, is an endemic area for both cutaneous and visceral leishmaniasis.

According to Moura et al⁴, during the canine survey conducted in the urban area of the City of Cuiabá, 64.5% seropositivity for leishmaniasis was verified using the indirect immunofluorescence reaction technique (IIR). Of these, 88% presented high titration (50% with 1:640, 33.3% with 1:320 and 4.8% with 1:160). According to the authors, these results strongly suggested the presence of VL circulating among canines, although species etiologic characterization was not achieved.

The isoenzyme electrophoresis technique permits identification of the type of microorganism isolated. Studies conducted by Cupolillo et al⁵ classified strains of *Leishmania* according to species as belonging to the New World and the Old World. Species characterization is fundamental for understanding the biology of the parasite and, although in Brazil the main species is *Leishmania infantum*⁵, Tolezano et al⁶ proved that infection in two dogs with clinical VL, from Araçatuba, SP, had been caused by *Leishmania amazonensis*.

The purpose of the present work was to characterize the etiologic type of CVL present in the captured dogs from Cuiabá, MT. The study was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA/FIOCRUZ), under protocol no. 0300/2006.

The Zoonosis Control Center (ZCC) of Cuiabá, MT, selected 44 dogs from urban area of the municipal district, according to clinical, epidemiological and laboratorial criteria compatible with CVL. A convenience sample was used; the goal was to diagnose dogs captured by Cuiabá ZCC with suspected CVL. The dogs were selected based on one of two possibilities: clinical suspicion of and/or seropositivity for CLV, which resided in areas where other serologically positive dogs had been identified or which had records regarding the presence of specific vectors (*Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi*). All the dogs studied were donated by their owners to the Cuiabá ZCC.

The dogs were later euthanized according to internal procedures of Cuiabá ZCC: seronegative dogs that were not adopted and all seropositive dogs, in accordance with directives approved by the Brazilian Ministry of Health⁷.

Biological samples (bone marrow and/or spleen and/or liver) were collected from the 44 dogs suspected of having VL or possibly infected by *Leishmania* sp. Resolution 714, dated June 20th 2002, of the Federal Council of Veterinary Medicine (CFMV) was used as the basis of the euthanasia protocol, which outlines the procedures and methods of euthanasia for animals and provides further guidelines⁸. The chosen method was intravenous administration of potassium chloride (KCl), performed by a veterinarian of the Cuiabá ZCC, preceded by general anesthesia achieved with intravenous administration of 25mg/kg of sodium thiopental.

Under the effect of the preanesthetic 1% Aceprom (acepromazine 0.1mg/kg IM, 30 to 40min in advance), some dogs were easily contained for trichotomy, in the area delineated by the tip of the breastbone or the iliac crest, for marrow puncture^{9,10}. However, others remained agitated, requiring general anesthesia, with use of 25mg/kg of sodium thiopental to achieve the procedure. For the trichotomy, asepsis of the site was performed using detergent, followed by washing with running water, drying and rinsing with 70% alcohol. After intravenous administration of sodium thiopental anesthetic, the dogs were administered potassium chloride, as described.

The marrow puncture was performed on all 44 dogs, in accordance with procedures adopted by Müller et al¹⁰ and Silva¹¹. Then trichotomy and asepsis of the area consisting of the abdominal cavity of the dogs followed, for liver and/or spleen puncture. Following incision, sample collection was initiated with consecutive movements insertion and removal of 2ml of 0.9% sterile saline. Next, specimens of bone marrow, liver and spleen were transferred aseptically, in phosphate-buffered saline containing gentamicin (40g/mL), and inoculated directly into tubes of NNN blood-agar medium containing an overlay of Schneider's *Drosophila* medium (Sigma, St. Louis, MO), supplemented with heat-inactivated (60°C for 20min) fetal bovine serum (FBS) and incubated at 25°C. Parasites isolated from primary culture were transferred to flasks of Schneider's medium containing 20% FBS and gentamicin (40g/mL) at the same temperature. Promastigotes were grown in culture medium and were used for identification by isoenzyme analysis.

All of the cultures *in vitro* were expanded to obtain sufficient parasite mass to achieve biochemical characterization. From the cultures *in vitro*, in NNN and Schneider's medium, using biological samples from the 44 dogs studied, *Leishmania* sp growth was observed in 16 samples from 8 dogs: 9 bone marrow, 4 liver aspirate and 3 spleen aspirate.

Isoenzymatic characterization was achieved in 9 samples from 5 canines. The tests followed a previously described protocol by Cupolillo et al⁵ and the enzymes tested were: 6PGDH (6-phospho-glucoc-dehydrogenase, E.C. 1.1.1.43), G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase, E.C.1.1.1.43) and NH (nucleoside hydrolase, E.C.3.2.2.1). The following strains were used as references for comparison with the electrophoretic profiles obtained: IOC/L0566 (MHOM/BR/1975/M2903) *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*; IOC/L0575 (IFLA/BR/1967/PH8) *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*; IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75) *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*.

Analysis of the results proved that the samples of marrow, liver and spleen puncture from dogs suspected of carrying VL captured in the urban area of Cuiabá were infected with the species *L. (L.) infantum*, as demonstrated when comparing by the isoenzymatic profiles to the reference strain IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75) (Figure 1).

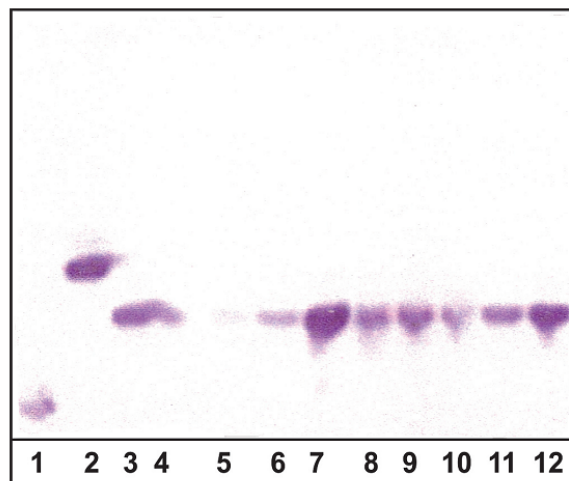


FIGURE 1 - 6PGDH Isoenzymatic profile in agarose gel.

1: IOC/L0566 (MHOM/BR/1975/M2903) *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, 2: IOC/L0575 (IFLA/BR/1967/PH8) *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, 3: IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75) *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, 4 and 8: aspirate spleen samples, 5 and 7: samples of liver aspirate, 6, 9, 10, 11 and 12: samples of bone marrow puncture.

CVL is presented as a progressive disease that is often slow and has an insidious onset. When infected, dogs can exhibit a variety of moderate to severe clinical signs or can be asymptomatic, thus contributing as a principal source of infection in urban areas. In a recent seroepidemiological survey for leishmaniasis in dogs domiciled in the urban area of Cuiabá, prevalence of 3.4% positivity¹² was determined, with simultaneous cases of VL and tegumentary leishmaniasis registered in the municipal district¹³.

Programmed actions for the control of CVL include actively searching for symptomatic dogs to apply parasitological exams and to confirm the identification of the *Leishmania*⁷ species. In a study involving 7 sylvan dogs maintained in captivity in the State of Mato Grosso, the presence of the species *L. (L.) infantum chagasi* was identified in all of them using the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique¹⁴.

In the present study, the isoenzyme electrophoresis technique was performed to characterize the *Leishmania* species. In different clinical samples of dogs selected by the Cuiabá ZCC that presented clinical, epidemiological and laboratorial evidence compatible with VL, the species responsible was confirmed as *L. (L.) infantum*. Its taxonomy was in agreement with the law of priority for the classification of microorganisms¹⁵.

The importance of *Leishmania* species identification in studies involving domestic and sylvan reservoirs should be highlighted, particularly in areas of mixed infection, with the presence of sympatric species, as occurs in Cuiabá, MT, Brazil.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FINANCIAL SUPPORT

National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

REFERENCES

1. World Health Organization. Tropical Disease Research. Strategic Direction for Research - Leishmaniasis; 2004. [cite 2008 June 20]. Available from: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm/>.
2. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol 2004; 7:338-349.
3. World Health Organization. Zoonoses and Veterinary Public Health - Leishmaniasis. Programmes and Projects; 2008. [cited 2008 June 20]. Available from: <http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>.
4. Moura ST, Fernandes CGN, Pandolpho VC, Silva RR. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de CUIABA, estado de Mato Grosso, Brasil. Braz J Vet Res Animal Sci 1999; 36:101-102.
5. Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg 1994; 50:296-311.
6. Tolezano JE, Uliam SRB, Tanaguchi HH, Araújo MFL, Barbosa JAR, Barbosa JER, et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba county, São Paulo state, Brazil. Vet Parasitol 2007; 41:280-284.
7. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.
8. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução nº 714. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências; June 20, 2002.
9. Olsson DC, Pippi NL, Martins DB, Tognoli GK, Junior EBS, Müller DC, et al. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. Ciência Rural 2008; 38:56-59.
10. Müller DCM, Pippi NL, Basso PC, Olsson DC, Junior EBS, Guerra ACO. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. Ciência Rural 2009; 39:2243-2251.
11. Silva ES. Leishmaniose visceral canina na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil. Diagnóstico, aspectos clínicos e caracterização de amostras de *Leishmania*. [Dissertation]. [Belo Horizonte]: Centro de Pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz; 1997. 153 p.
12. Almeida ABPF, Faria RP, Pimentel MFA, Dahroug MAA, Turbino NCMR, Souza VRF. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de CUIABÁ, estado de Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42:156-159.
13. Só Notícias Web Page [Internet]. Rondonópolis e CUIABÁ concentram 87% dos casos de leishmaniose em MT. [cited 2010 June 20]. Available from: www.sonoticias.com.br/.
14. Souza NP, Almeida ABPF, Freitas TPV, Paz RCR, Dutra V, Nakazato L, et al. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no estado de Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43:333-335.
15. Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101:117-118.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Parasitology International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parint

Case report

Canine cutaneous leishmaniasis caused by neotropical *Leishmania infantum* despite of systemic disease: A case report ☆☆☆Amanda Cavalcanti ^{a,*}, Rogério Lobo ^{b,1}, Elisa Cupolillo ^a, Fábio Bustamante ^b, Renato Porrozi ^a^a Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil^b Autonomous Clinical Veterinarians, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2011
 Received in revised form 2 May 2012
 Accepted 4 May 2012
 Available online 11 May 2012

Keywords:

Canine leishmaniasis
Leishmania infantum
 Chronic wounds

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is an anthroponosis caused by a protozoan *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*). Here, we report a typical case of canine cutaneous leishmaniasis due to *L. infantum* infection without any other systemic symptom in one dog in the city of Rio de Janeiro, Brazil. A mongrel female dog was admitted in a veterinary clinic with reports of chronic wounds in the body. Physical examination revealed erosive lesions in the limbs, nasal ulcers, presence of ectoparasites and seborrheic dermatitis. Blood samples and fragments of healthy and injured skin were collected. The complete hemogram revealed aregenerative normocytic normochromic anemia and erythrocyte rouleaux, and biochemical analysis revealed normal renal and hepatic functions. Cytology of the muzzle and skin lesions suggested pyogranulomatous inflammatory process. The histopathology of a skin fragment was performed and revealed suspicion of protozoa accompanied by necrotizing dermatitis. The diagnosis of leishmaniasis was accomplished by positive serology, isolation of *Leishmania* from the skin lesion, and also by molecular test (PCR targeting the conserved region of *Leishmania* kDNA). Culture was positive for damaged skin samples. PCR targeting a fragment of *Leishmania* *hsp70* gene was performed employing DNA extracted from damaged skin. RFLP of the amplified *hsp70* fragment identified the parasite as *L. infantum*, instead of *Leishmania braziliensis*, the main agent of cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro. Characterization of isolated promastigotes by five different enzymatic systems confirmed the species identification of the etiological agent. Serology was positive by ELISA and rapid test. This case warns to the suspicion of viscerotropic *Leishmania* in cases of chronic skin lesions and brings the discussion of the mechanisms involved in the parasite tissue tropism.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is an anthroponosis caused by a protozoan *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*). The cycle of leishmaniasis involves invertebrate vectors and vertebrate hosts and a wide variety of mammals, including humans and dogs, which are considered the main domestic reservoir of *L. infantum*. Both human and canine diseases present clinical polymorphism. The human disease includes fever, anemia, hepatosplenomegaly and progressive weight loss. Leishmaniasis in dogs is characterized by a long asymptomatic period and a marked humoral immune response. Incubation period of up to 23 months was reported [1]. Animals may remain asymptomatic, develop a mild illness or develop the typical symptomatic disease [2,3].

Classical symptoms of canine disease resemble those for human disease and also include skin lesions such as diffuse, non-pruritic, generalized or localized alopecia; dry seborrhea with silver white, scales disseminated all over the body or more localized; cutaneous (essentially on pressure points, footpads and ears) or mucosa ulcers, eczema in nose or ears; loss of weight and appetite, localized or generalized lymphadenopathy, ocular lesions, blepharitis, bilateral keratoconjunctivitis, uveitis and glaucoma (probably as a result of severe uveitis), epistaxis, anemia, kidney failure, chronic diarrhea, onychogryphosis, runny nose and swelling of the legs [4]. It has been shown that ulcerative lesions and other skin abnormalities are often accompanied by other signs [2,5]. According to Gálvez and colleagues [6] lymphadenomegaly, exfoliative dermatitis and weight loss emerged as most relevant signals of canine VL on which the veterinarians based their suspicion of infection.

In neotropical regions cutaneous canine leishmaniasis, in general, are associated with *Leishmania braziliensis* infection, although other species have also been reported [7,8]. In endemic areas of tegumentary leishmaniasis in Brazil, dogs represent accidental hosts and their role as a domestic reservoir is not clear. This paper aims to report a case of typical localized cutaneous leishmaniasis due to *L. infantum* infection in a dog from the city of Rio de Janeiro, Brazil.

☆ Source of funding: CNPq, Faperj, and Fiocruz.

☆☆ Conflict of interest: No conflicts of interest have been declared.

* Corresponding author at: Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Pavilhão 26, sala 509, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21040-360, Brazil. Tel.: +55 21 3865 8203.

E-mail address: amandasc@ioc.fiocruz.br (A. Cavalcanti).¹ These authors have contributed equally to this article.

2. Case report

In August 2010, a mongrel female dog, of five years old, was admitted in a veterinary clinic with history of chronic wounds in the body. Physical examination revealed erosive lesions in the limbs, nasal ulcers, presence of ectoparasites (fleas and ticks) and light seborrheic dermatitis (Fig. 1). The dog had no other systemic symptoms. The complete hemogram revealed aregenerative normocytic normochromic anemia (erythrocyte $3.94 \times 10^{12}/\text{mm}^3$, hematocrit 26% and hemoglobin 8.6%) and presence of erythrocyte *rouleaux*, related to increased concentration of plasma protein detected, which can be suggestive of any infectious process. Other cells types presented normal count. Biochemical analysis revealed normal renal and hepatic functions. Cytology of the muzzle and skin lesions suggested pyogranulomatous inflammatory process, probably due to an autoimmune process. Nonspecific treatment was prescribed based on prednisone (Meticorten®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brazil), enrofloxacin (Baytril®, Bayer HealthCare, São Paulo, Brazil), fipronyl topic (Frontline®, Merial Saúde Animal, São Paulo, Brazil), and sulfur soap, which led to the lesion healing. In January 2011 the owner brought the animal with relapse of lesions, as well as, a new lesion in the perianal region. Blood samples and tissue fragments of healthy and injured skin were collected. The nonspecific treatment was conducted again. Histopathology was performed and revealed extensive epidermal necrosis with ulceration and acute inflammation accompanied by dense fibrosis in the dermis. Periodic acid Schiff (PAS) shows the presence of bacteria and yeast/protozoa-necrotizing dermatitis. The suspicion of the presence of protozoa led us to perform different tests for leishmaniasis. The diagnosis of leishmaniasis was established by isolation of *Leishmania* from skin fragments cultured on biphasic medium (Novy–MacNeil–Nicolle/Schneider), by positive molecular tests and also by serology. Culture was positive only in damaged skin samples. Molecular diagnosis was also positive when DNA extracted from damaged skin fragments were submitted to PCR assays targeting both *hsp70* [9] and kDNA [10] *Leishmania* spp. regions. *Leishmania* species identification was performed by enzymatic digestion of the PCR *hsp70* amplicon (PCR-RFLP *hsp70*) with *Hae*III and *Bst*UI using the conditions recommended by the manufacturer (New England Biolabs). Restriction fragments were visualized on silver-stained 6% polyacrylamide gel and compared with the patterns obtained for reference



Fig. 1. Typical leishmaniasis cutaneous ulcer in the anterior limb of a five year old female mongrel dog associated with *Leishmania infantum* infection.

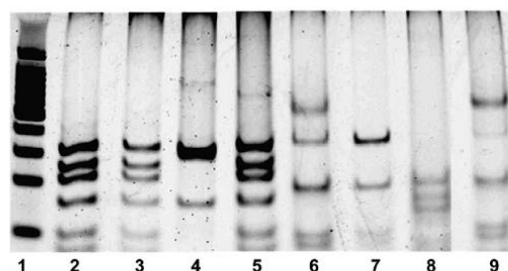


Fig. 2. PCR-RFLP profiles of *hsp70* gene observed employing DNA extracted from *Leishmania* isolate, clinical sample (lesion biopsy) and reference strains after *Hae*III (lanes 2–5) and *Bst*UI (lanes 6–9) enzymatic digestion. Electrophoretic patterns of the digested product were visualized on silver-stained 6% polyacrylamide gel. Lanes: 1 100 bp MW standard; 2,6 *Leishmania* isolate obtained from the dog skin lesion fragment; 3,7 dog skin lesion fragment; 4,8 *Leishmania braziliensis* reference strain (MHOM/BR/1975/M2903); 5,9 *Leishmania infantum* reference strain (MHOM/BR/1974/PP75).

strains. The banding profile observed was correspondent to *L. infantum* (Fig. 2), distinguished from *L. braziliensis*, the most common species associated with cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Only after two months of parasite isolation an adequate quantity of parasites was achieved to perform isoenzymatic characterization. Five different enzymatic systems were assayed [11], glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glucose phosphate isomerase (GPI), malic enzyme (ME), isocitrate dehydrogenase (IDHNADP) and 6 phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH). The profiles obtained for all the enzymes, confirmed species identification as *L. infantum*. Serology by ELISA with *Leishmania*-specific antigens of *L. infantum* was positive (1:640) and was corroborated by immunochromatographic rapid test (Dual Path Platform for Canine Visceral Leishmaniasis, Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil).

The *L. infantum* main target organs such as spleen or bone marrow were not accessed once the dog died before the confirmation of leishmaniasis and the *Leishmania* species identification.

3. Discussion

In this study, we report a case of typical cutaneous ulcer caused by viscerotropic *Leishmania* species, *L. infantum*, in a dog from the city of Rio de Janeiro, Brazil. The animal did not present any other symptom related to visceral leishmaniasis. A moderate anemia was observed in this dog. Although anemia is a common finding in CVL [12], this can be also associated to many other conditions, including inappropriate diet.

Canine atypical cases presented by Ordeix and colleagues [13] were characterized by multiple coalescent, erythematous and firm umbilicate papules at various sites caused by *Leishmania* spp. and skin positive test for *L. infantum* antigens. As in our study, in four out of five cases reported by the authors, no other abnormalities were found after physical examination. Atypical CL caused by viscerotropic strains has been reported in human cases [14–17] as well as in canine cases [13]. However, as far as we know, such tegumentary clinical manifestation as presented here, skin ulcers without systemic clinical signs of leishmaniasis, have never been reported in Brazil.

In a retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *L. infantum* in Italy, Ciaramella and colleagues [18] reported that skin abnormalities were very common with the appearance of ulcers in forty per cent of the cases. Appearance of ulcers is also reported in the Galvez and colleagues [6] study. However, it is always accompanied by other symptoms. Skin lesions caused by viscerotropic strains also have been reported in HIV-positive human patients [16,19], but overall the lesions are accompanied by other signs of visceral disease and are sometimes considered the first indicator of recurrence [20].

The *L. infantum* tropism to skin tissue or deep organs may depend on the characteristics of parasite strain and/or on the host genetic and immunological status [15]. It was proposed that mechanical forces imposed on cutaneous tissues result in local inflammatory responses that, in dogs with CVL, may attract *Leishmania*-infected macrophages into the dermis. This mechanism has been proposed to explain the occurrence of metastatic cutaneous lesions in areas subjected to external traumas, such as pressure point trauma, superficial bites and ear cropping [21]. Herein, a dog presented ulcers in pressure areas of the body, suggesting the parasite spreading through the skin. After non-specific treatment, we observed a briefly healing of lesions that after some months relapsed. Probably, partially controlling the inflammation process, the animal has recovered, circumstantially from the skin lesions. The immunosuppression related to the corticosteroid treatment applied, can be an explanation for the fatal outcome for this case, promoting the parasite spread and visceralization, taking the animal to death.

In the Old World, cutaneous lesions caused by *L. infantum* are commonly associated with strains belonging to zymodeme MON-24 [14], although cases caused by *L. infantum* zymodeme MON-1 have also been reported [15]. Here, we report a cutaneous case caused by *L. infantum* IOC/Z1, which corresponds to the MON-1 zymodeme. The occurrence of human VL cases in Rio de Janeiro has remained stable since 1994, and the State reported three cases in 2003 with one death. By 2006, eighty-seven indigenous cases were detected all in suburban areas in the western city. In 2006, the Ministry of Health in Brazil ranked the city as an area of sporadic transmission, which means an average of less than 2.4 human VL cases in the last five years. Canine *Leishmania*-infection in the city is caused by *L. braziliensis*, which causes cutaneous lesions, and *L. infantum* is responsible for visceral cases. The last CVL case report was in 2010 [22]. In terms of epidemiological surveillance, this case together with a few others recently reported in the city are important because may precede human cases. Moreover, it is possible that many similar cases of chronic wounds, non-responsive to conventional treatments, go unnoticed by small animal's clinicians. Veterinarians should keep in mind that non-curative chronic ulcers could be leishmaniasis. Moreover, a rapid and precise toll, like PCR-based methods, for the etiological agent diagnosis is important in order to choose the appropriated clinical procedure. This case also warns the suspicion of viscerotropic *Leishmania* in cases of chronic skin lesions and brings the discussion of the mechanisms involved in the parasite tropism to the skin or visceral organs.

References

- [1] Santos-Gomes G, Campino L, Abranches P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2002;95(2):193–8.
- [2] Ferrer L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick R, editor. Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, Spain. Wiesbaden: Hoechst Roussel; 1999.
- [3] Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases 2001;183(9):1421–4.
- [4] Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadoré JL, et al. Atypical forms of canine leishmaniasis. The Veterinary Journal 2001;162(2):108–20.
- [5] Maia C, Nunes M, Cristóvão J, Campino L. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. Acta Tropica 2010;116(3):193–9.
- [6] Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Molina R. Questionnaire-based survey on the clinical management of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). Preventive Veterinary Medicine 2011;102(1):59–65.
- [7] Longoni SS, Marín C, Sauri-Arce CH, López-Céspedes A, Rodríguez-Vivas RI, Villegas N, et al. An iron-superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potential role in the transmission of cutaneous leishmaniasis and trypanosomiasis in Yucatan, Mexico. Vector Borne and Zoonotic Diseases 2011;11(7):815–21.
- [8] Santaella J, Ocampo CB, Saravia NG, Méndez F, Góngora R, Gomez MA. *Leishmania (Viannia)* infection in the domestic dog in Chaparral, Colombia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2011;84(5):674–80.
- [9] da Silva LA, Sousa CS, Da Graça GC, Porrozi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. Infection, Genetics and Evolution 2010;10(1):77–83.
- [10] da Silva AC Tojal, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. Tropical Medicine & International Health 2006;11(9):1388–98.
- [11] Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1994;50(3):296–311.
- [12] Da Costa-Val ADF, Cavalcanti RR, Gontijo NF, Michalick MSM, Alexander B, Williams P. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. The Veterinary Journal 2007;174:636–43.
- [13] Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. Veterinary Dermatology 2005;16(3):187–91.
- [14] Bongiorno MR, Pistone G, Aricò M. Unusual clinical variants of cutaneous leishmaniasis in Sicily. International Journal of Dermatology 2009;48(3):286–9.
- [15] Campino L, Bajanca R, Franca I, Pratloung F, Dedet JP, Fiadeiro T. Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania infantum* zimodeme MON-1 em Portugal. Acta Médica Portuguesa 2005;18:475–8.
- [16] Colebunders R, Depraetere K, Verstraeten T, Lambert J, Hauben E, Van Marck E, et al. Unusual cutaneous lesions in two patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. Journal of the American Academy of Dermatology 1999;41(5, Supplement):847–50.
- [17] Ponce C, Ponce E, Morrison A, Cruz A, Kreutzer R, McMahon-Pratt D, et al. *Leishmania donovani chagasi*: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. Lancet 1991;12(337):67–70.
- [18] Ciarabella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. The Veterinary Record 1997;141(21):539–43.
- [19] Boumis E, Chinello P, Della Rocca C, Paglia MG, Proietti MF, Petrosillo N. Atypical disseminated leishmaniasis resembling post-kala-azar dermal leishmaniasis in an HIV-infected patient. International Journal of STD & AIDS 2006;17(5):351–3.
- [20] Postigo C, Llamas R, Zarco C, Rubio R, Pulido F, Costa JR, et al. Cutaneous lesions in patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. The Journal of Infection 1997;35(3):265–8.
- [21] Prats N, Ferrer L. A possible mechanism in the pathogenesis of cutaneous lesions in canine leishmaniasis. Veterinary Record 1995;137(4):103–4.
- [22] Figueiredo FB, Barbosa Filho CJL, Nascimento LD, Madeira MF. Report on an autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in the southern zone of the municipality of Rio de Janeiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2010;43(1):98–9.

