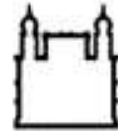




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONCALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

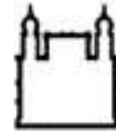
**DESORGANIZAÇÃO DA POLPA BRANCA ESPLÊNICA ESTÁ ASSOCIADA
COM A APRESENTAÇÃO CLÍNICA MAIS GRAVE DA LEISHMANIOSE
VISCERAL EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**

ISADORA DOS SANTOS LIMA

**Salvador – Bahia – Brasil
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONCALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

ISADORA DOS SANTOS LIMA

**DESORGANIZAÇÃO DA POLPA BRANCA ESPLÊNICA ESTÁ ASSOCIADA
COM A APRESENTAÇÃO CLÍNICA MAIS GRAVE DA LEISHMANIOSE
VISCERAL EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**

Orientador: WASHINGTON LUIS CONRADO DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao
curso de Pós-Graduação em
Patologia como requisito
parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Patologia
Humana e Experimental

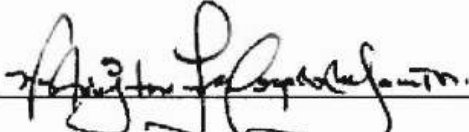
**Salvador – Bahia – Brasil
2013**

**DESORGANIZAÇÃO DA POLPA BRANCA ESPLÊNICA ESTÁ ASSOCIADA
COM A APRESENTAÇÃO CLÍNICA MAIS GRAVE DA LEISHMANIOSE
VISCERAL EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**

ISADORA DOS SANTOS LIMA

FOLHA DE APROVACAO

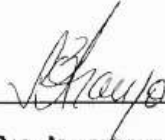
COMISSAO EXAMINADORA



Washington L. S. dos Santos
Pesquisador Titular
CPqGM - Fiocruz



Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti
Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia.



Dra. Iguaracyra Araújo
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, Isa e Ricardo, que sempre me apoiaram incondicionalmente, me acompanharam e deram força durante toda a minha caminhada até esse momento. Sem eles eu não seria nada, devo a eles minha vida, minha educação, e toda a minha felicidade. Eles fazem tudo valer a pena.

Ao meu orientador, Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, que tem sido um verdadeiro orientador, no real sentido da palavra. Obrigada pelo tempo dedicado e pelos ensinamentos valiosos aprendidos no curso do projeto.

A toda o grupo WLCS, em especial Valter, Joselli e Micely, pelo companheirismo e pela ajuda em diversos momentos do projeto. A Fernanda Gusmão, que embora não esteja mais no grupo, foi de grande ajuda durante a realização da maior parte do trabalho.

Aos amigos do LPBI 2, que direta ou indiretamente contribuíram em algum aspecto do trabalho. Em especial a Cristiane, pela ajuda em diversos momentos, e a Daniela, que mesmo não estando presente no laboratório, sempre esteve presente quando a procurei, sempre disposta a me ajudar no que fosse necessário.

Aos técnicos Livia e Sérgio.

Aos amigos do LPBI 1, em especial Manuela, Isaac, Lairton e Rodrigo, pela ajuda na realização do PCR, sem a qual não seria possível a realização dessa etapa do trabalho.

A Dr. Luiz Freitas, pela ajuda na observação das lâminas e classificação do baço dos animais, além de sua colaboração que veio enriquecer de uma forma geral este trabalho.

À administração do LPBI, em especial à Flavia pela ajuda e dedicação.

Aos amigos do curso PGPAT, pelos momentos de estudo e diversão passados juntos.

À Coordenação do curso PGPAT Fiocruz / UFBA.

À Capes pela bolsa de mestrado que ajudou na realização deste projeto.

À Fiocruz e ao CPqGM, pela infraestrutura física e pessoal que possibilitaram a execução dos experimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Leishmaniose Visceral	13
2.2 Manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina	16
2.3 O cão como reservatório e modelo de estudo da leishmaniose visceral	19
2.4 Baço	23
2.5 Infecções e alterações estruturais do baço	28
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVOS	33
4.1 Geral	33
4.2 Específicos	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Animais	34
5.2 ELISA	35
5.3 Cultura	35
5.4 LST	36
5.5 PCR quantitativo (Real Time PCR)	36
5.6 Exame clínico	39

5.7 Bioquímica e hematologia	40
5.8 Dosagem de proteína C reativa.....	41
5.9 Exame histológico	41
5.10 Análise e expressão dos resultados	42
6. RESULTADOS	43
6.1 ELISA e Cultura esplênica.....	44
6.2 PCR	47
6.3 LST	48
6.4 Estrutura esplênica	48
6.5 ELISA e estrutura esplênica	51
6.6 Cultura e estrutura esplênica.....	54
6.7 Carga parasitária	60
7. DISCUSSÃO	63
8. CONCLUSÕES	67
9. PERSPECTIVAS	68
10. REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Manifestações clínicas clássicas na leishmaniose visceral canina.. 18
- Figura 2.** Alterações morfológicas no baço de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*..... 42
- Figura 3.** “Score” atribuído à intensidade dos sinais os sinais clínicos em relação à positividade no ELISA e à organização da estrutura esplênica..... 53
- Figura 4.** Número de sinais clínicos atribuíveis à leishmaniose visceral canina em relação à positividade no ELISA e à organização da estrutura esplênica.. 54
- Figura 5.** “Score” atribuído à intensidade dos sinais os sinais clínicos em relação à positividade na cultura esplênica e à organização da estrutura esplênica..... 57
- Figura 6.** Número de sinais clínicos atribuíveis à leishmaniose visceral canina em relação à positividade na cultura esplênica e à organização da estrutura esplênica..... 58
- Figura 7.** Características bioquímicas e hematológicas em relação à positividade na cultura esplênica e à organização da estrutura esplênica..... 59
- Figura 8.** Distribuição da carga parasitária no baço em relação à positividade no teste ELISA..... 60
- Figura 9.** Distribuição da carga parasitária no baço em relação à positividade da cultura esplênica..... 61

Figura 10. Distribuição da carga parasitária no baço em relação à positividade no ELISA e à organização da estrutura esplênica..... 61

Figura 11. Distribuição da carga parasitária no baço em relação à positividade na cultura esplênica e à organização da estrutura esplênica..... 62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sequência dos primers utilizados no PCR quantitativo..... 38
- Tabela 2.** Parâmetros de ciclagem da reação de PCR quantitativo para Detecção de DNA de Leishmania e de rRNA 18s..... 38
- Tabela 3.** Características gerais da população de cães semi-domicilidados recolhidos nas ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010..... 43
- Tabela 4.** Distribuição das características e alterações observadas na população de cães semi-domicilidados recolhidos da as ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010, em relação à positividade no ELISA e na cultura esplênica..... 46
- Tabela 5.** Distribuição das frequências dos sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral em relação à positividade no PCR na população de cães semi-domicilidados recolhidos da as ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010..... 47
- Tabela 6.** Distribuição das frequências dos sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral em relação à organização da estrutura esplênica na população de cães semi-domicilidados recolhidos da as ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010..... 50
- Tabela 7.** Distribuição das características e alterações observadas na população de cães semi-domicilidados recolhidos da as ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010, em relação à positividade no teste ELISA juntamente com a organização da estrutura esplênica..... 52
- Tabela 8.** Distribuição das características e alterações observadas na população de cães semi-domicilidados recolhidos da as ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010, em relação à positividade na cultura esplênica juntamente com a organização da estrutura esplênica..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Nomenclatura sistematizada de moléculas (do inglês cluster differentiation)
CXCL	Ligantes de quimiocina com mais de dois resíduos de cisteína juntos
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)
ELISA	Ensaio imuno enzimático. (do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
HDL	Lipoproteínas de alta densidade (do inglês High Density Lipoproteins)
IFN γ	Interferon gama (Citocina)
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês Low Density Lipoproteins)
LST	Intradermorreação de Montenegro (do inglês Leishmanin Skin Test)
LT	Linfotoxina (Citocina)
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês Phosphate buffered saline)
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal (do inglês ribosomal Ribonucleic Acid)
RT - PCR	Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase
TGF β	Fator de transformação do crescimento β (do inglês Transforming growth factor β)
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1 (do inglês T helper-1)
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2 (do inglês T helper-2)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês Tumoral Necrosis Factor)
VG	Volume Globular

Lima, I. S. Desorganização da polpa branca esplênica está associada com a apresentação clínica mais grave da leishmaniose visceral em cães naturalmente infectados. Salvador, 2013. (Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

RESUMO

O baço é o maior órgão linfóide secundário em seres humanos e em cães. Em ambos, a ausência do baço está associada com um risco aumentado de ocorrência de infecções localizadas e disseminadas, incluindo sepses generalizadas. A leishmaniose visceral e outras infecções podem alterar a estrutura histológica do baço, o que leva a uma destruição dos microambientes da polpa branca. Trabalhos anteriores mostraram que a ruptura da estrutura de polpa branca é mais frequente em cães com marcadores laboratoriais de suscetibilidade à leishmaniose visceral, como a cultura esplênica positiva e LST negativo, do que nos animais em que estes marcadores de susceptibilidade estavam ausentes. Neste estudo, o nosso objetivo é examinar a relação entre a desorganização histológica da polpa branca esplênica e a gravidade da leishmaniose visceral. As amostras e os dados utilizados neste estudo foram coletados de 206 cães de rua provenientes de uma área endêmica para leishmaniose visceral, a cidade de Jequié (Bahia, Brasil). Os animais foram examinados clinicamente e foram realizados os testes ELISA e LST. Aspirados de baço foram coletados para a cultura, e fragmentos de baço foram coletados para estudos de biologia molecular e de estudos morfológicos. Os animais foram classificados de acordo com o grau de organização estrutural da polpa branca esplênica em grupos com baço (a), bem organizado, (b) ligeiramente desorganizado, (c) a moderadamente a extensivamente desorganizado. Em relação à positividade no ELISA juntamente com a desorganização do baço, conjuntivite ($P = 0,0116$), hiperproteinemia ($p = 0,021$) foram mais frequentes no grupo de animais com ELISA positivo e baço desorganizado, quando comparado com os outros grupos. Os animais polissintomáticos são mais frequentes no grupo com ELISA positivo e baço do tipo 3 ($p = 0,004$). Os scores clínicos atribuídos à intensidade da conjuntivite ($P < 0,05$), dermatite ($P < 0,05$) e linfadenopatia ($P < 0,01$), alopecia ($P < 0,01$), onicogribose ($P < 0,05$) foram mais elevados nos animais com ELISA positivo e baço desorganizado do que outros grupos, bem como o número de sinais clínicos atribuíveis à leishmaniose visceral canina ($p = 0,0014$). Em relação à análise da positividade na cultura esplênica juntamente com a desorganização do baço, a frequência de cães polissintomáticos foi maior em animais com baço ligeiramente desorganizado ($P < 0,05$) e baço desorganizado ($P < 0,005$), do que em animais com baço organizado. Alopecia ($P < 0,01$), conjuntivite ($P < 0,05$), desidratação ($P < 0,001$), dermatite ($P < 0,05$), onicogribose ($p < 0,01$), anemia ($P < 0,05$), úlcera ($P < 0,001$) e alto escore clínico ($P < 0,001$) foram mais frequentes em animais com cultura esplênica positiva e baço desorganizado, do que nos animais com cultura negativa e baço organizado. Em conclusão, os cães com desorganização do baço associada com leishmaniose visceral têm mais sinais clínicos e pior estado clínico do que os animais com leishmaniose visceral, mas sem desorganização do baço.

Palavras chave: leishmaniose visceral canina, baço, cão, manifestação clínica

Lima, I. S. Disruption of the splenic white pulp is associated with more severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs. Salvador, 2013. (Master thesis in Experimental Pathology) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

ABSTRACT

The spleen is the largest secondary lymphoid organ in human beings and in dogs. In both in human beings and in dogs, the absence of the spleen is associated with increased risk of localized and disseminated infection including overwhelm sepsis. Visceral leishmaniasis and other infections alter the histological structure of the spleen, leading to a disruption of the white pulp microenvironments. Previous works have shown that the disruption of the white pulp structure is more frequent in dogs with laboratorial markers of susceptibility to visceral leishmaniasis such as positive spleen culture and negative leishmanin skin test than in animals in which these susceptibility markers were absent. In this study, our goal is to examine the relationship between the histological disorganization of splenic white pulp and severity of visceral leishmaniasis. The samples and data used in this study were collected from 206 stray dogs from an endemic area for visceral leishmaniasis, the city of Jequié (Bahia, Brazil). The animals were examined clinically and ELISA and LST were performed. Splenic aspirates were collected for culture, and fragments of spleen were collected for molecular and morphological studies. The animals were ranked according to the degree of structural organization of splenic white pulp of the spleen in groups (a), well-organized, (b) slightly disordered, (c) moderately extensively disorganized. In relation to the positive in the ELISA with the disorganization of the spleen, conjunctivitis ($P = 0.0116$) hyperproteinemia ($p = 0.021$) were more frequent in the group of animals with positive ELISA and disorganized spleen when compared to the other groups. Polysymptomatic animals are more frequent in the group with positive ELISA and spleen type 3 ($p = 0.004$). Clinical scores attributed to the intensity of conjunctivitis ($P < 0.05$), dermatitis ($P < 0.05$) and lymphadenopathy ($P < 0.01$), alopecia ($P < 0.01$), onychogryphosis ($P < 0.05$) were higher in animals with positive ELISA and disorganized spleen than other groups, as well as the number of clinical signs attributable to canine visceral leishmaniasis ($p = 0.0014$). Regarding the analysis of positive spleen culture together with splenic disorganization, the frequency of polysymptomatic dogs was higher in animals with slightly disordered spleen ($P < 0.05$) and disorganized spleen ($P < 0.005$) than in animals with organized spleen. Alopecia ($P < 0.01$), conjunctivitis ($P < 0.05$), dehydration ($P < 0.001$), dermatitis ($P < 0.05$), onychogryphosis ($p < 0.01$), anemia ($P < 0.05$), ulcers ($P < 0.001$) and high clinical score ($P < 0.001$) were more frequent in animals with positive spleen culture and disorganized spleen than in animals with negative culture and organized spleen. In conclusion, dogs with disorganization of the spleen associated with visceral leishmaniasis have more clinical signs and worse clinical status than animals with visceral leishmaniasis, but without disruption of the spleen.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, spleen, dog, clinical presentation

1. INTRODUÇÃO

O baço é o maior órgão linfoide secundário do organismo em humanos e cães, sendo mais complexo do que qualquer outro tecido linfoide (REECE, 2006). É um órgão parenquimatoso, dividido em polpa branca e polpa vermelha. A polpa vermelha é formada por cordões esplênicos, separados por sinusóides, e constituídos por uma rede frouxa de células e fibras reticulares de colágeno do tipo III, que contém células como leucócitos, além de plaquetas e eritrócitos (JUNQUEIRA, 2004; MCGAVIN e ZACHARY, 2012; GUYTON e HALL, 2006). A polpa branca é um tecido linfoide organizado em bainhas, com compartimentos de linfócitos T e B, ao redor de ramificações de vasos arteriais, assemelhando-se à estrutura de um linfonodo (MEBIUS & KRAAL, 2005). A estrutura e fisiologia do baço fazem dele peça fundamental do sistema imunológico. A microarquitetura do baço facilita a comunicação eficiente entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T para a montagem de uma imunidade protetora contra patógenos (BENEDICT et al., 2006). O baço é também um dos principais locais para a iniciação de grande parte da resposta imune primária e para a ativação de linfócitos B com consequente produção de anticorpos (LEUNG et al., 1972). A manutenção da integridade estrutural do baço é fundamental para defesa contra microrganismos (PAULO et al., 2001). A ausência do baço está relacionada com um aumento no risco de surgimento de infecções, localizadas e disseminadas.

Infecções, como a leishmaniose visceral, infecção por *Plasmodium chaubadi* e algumas infecções virais causam alterações na estrutura esplênica, levando a uma desorganização do tecido linfoide, com desaparecimento das delimitações entre os compartimentos da polpa branca, e até mesmo entre a polpa branca e a polpa vermelha (DKHIL, 2009; ATO et al., 2002; SMELT et al., 1997, SANTANA et al, 2008). Nosso grupo demonstrou a ocorrência de desorganização do tecido linfoide, entre outras alterações como periesplenite, granulomas, e aumento da frequência de plasmócitos na polpa vermelha. Tais alterações esplênicas parecem estar relacionadas com a susceptibilidade dos cães para a leishmaniose visceral, indicada pela ocorrência de cultura

esplênica positiva e resultado negativo no LST (SANTANA et al., 2008). Nosso grupo também mostrou uma redução nas populações celulares do folículo linfóide e da zona marginal, com uma redução no número de células B e células dendríticas foliculares. O número de células B estava reduzido tanto nos folículos quanto nas zonas marginais, nos animais com tecido linfóide desorganizado. Além disso, também foi observada uma redução na expressão de CXCL13, uma quimiocina que atua na migração de células B para o folículo linfóide e na manutenção dessas células próximas às células dendríticas foliculares (SILVA et al, 2012). Estas mudanças no baço foram associadas com maior frequência de doença grave nos cães com tecido linfóide desorganizado, porém, o número de animais é limitado (SILVA et al, 2012).

No presente estudo, reunimos os dados clínicos e laboratoriais de um grande número de cães de uma área endêmica de leishmaniose visceral para estudar a relação entre a desorganização da polpa branca esplênica e a gravidade da doença nesses cães. Os dados apresentados são relevantes para a compreensão dos mecanismos das formas severas de leishmaniose visceral, e contribui para a definição de marcadores de gravidade para a doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é uma zoonose de grande importância em diversas regiões do mundo. Inicialmente, era caracterizada como doença de caráter eminentemente rural, porém, mais recentemente vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou um crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano (BRASIL, 2013a). Tem ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde também é denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neotropical. Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste (BRASIL, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que ocorrem 500.000 casos novos de LV anualmente, sendo que, 90% desses casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. Destaca-se que dos casos registrados na América Latina, 90% ocorrem no Brasil (BRASIL, 2013b).

No Brasil, a LV é considerada um grave problema de saúde pública, tendo em vista a prevalência, expansão geográfica e controle complexo, caro e laborioso e a letalidade de 6-12% associada à enfermidade humana (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2013a). O crescimento da LV no Brasil é expressivo, pois em 2011 houve 3.894 casos confirmados da doença no país, com 262 óbitos (BRASIL, 2013a), enquanto em 1990 o número era de apenas 1.944 (BRASIL, 2013b). É uma doença crônica, sistêmica, que quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (BRASIL, 2013a).

A LV é causada por um protozoário, parasita intracelular obrigatório, da família *Trypanosomatidae*, gênero e subgênero *Leishmania*. Nas Américas, bem como no Mediterrâneo, Oriente Médio, África Ocidental e Ásia Central, a doença é causada pela espécie *Leishmania infantum* (anteriormente conhecida como

Leishmania chagasi) enquanto na Índia e restante da África é causada pela *Leishmania donovani* (HARHAY et al, 2011). Estudos recentes de caracterização molecular mostraram que *L. chagasi* e *L. infantum* são geneticamente indistinguíveis, podendo ser citadas como sinônimos (MAURICIO, STOTHARD e MILES, 2000; KUHLS *et al.*, 2011). O gênero *Leishmania* inclui aproximadamente 30 protozoários, que parasitam tanto humanos quanto animais. Nem todas as espécies de *Leishmania* têm importância médica, sendo apenas 20 consideradas patogênicas para humanos e apenas 10 tendo sido isoladas em cães (SARIDOMICHELAKIS et al, 2009).

A *Leishmania* é um parasita bifásico que completa o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, o vetor flebótomo, que abriga a forma promastigota flagelada extracelular, e um mamífero, no qual a forma amastigota intracelular desenvolve. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania* (BRASIL, 2006). A *Leishmania* se multiplica no trato digestivo do flebotomíneo e torna-se infectante 8-20 dias depois (DESJEUX, 2004). A forma promastigota infectante, chamada promastigota metacíclica, é transmitida a um novo hospedeiro vertebrado no momento em que o flebótomo parasitado se alimenta de sangue de um vertebrado, quando as promastigotas migram do seu trato digestório através da sua proboscíde. Os flebotomíneos se alimentam do sangue de mamíferos. Em cães isso ocorre principalmente em áreas de pele com pouco pelo, como a cabeça, focinho, pavilhão auditivo e áreas inguinal e perianal (SOLANO-GALLEGO et al, 2009).

A transmissão pode ocorrer de maneira zoonótica ou antroponótica. Na forma zoonótica, os parasitas (*Leishmania chagasi* / *Leishmania infantum*) são transmitidos a partir de reservatórios silvestres e animais domésticos (pequenos roedores, cães) através da picada do flebotomíneo fêmea. Também pode ser de caráter antroponótico, quando o parasita (*Leishmania donovani*) é transmitido pelo inseto a partir de um hospedeiro humano infectado (HARHAY et al, 2011; WHO, 2013). No Brasil, sua transmissão é feita pela fêmea de insetos do gênero *Lutzomyia*. (DESEJEUX, 2004; UZAIR et al, 2004; BRASIL,

2006; BRASIL, 2009a; DANTAS-TORRES, 2009). Na Europa, Ásia e África, a transmissão é realizada por insetos do gênero *Phlebotomus*, variando de espécie entre as regiões (DESCOTEAUX & TURCO, 1999).

Os flebotomíneos são presentes principalmente em países tropicais, e são ativos durante os meses relativamente quentes do ano nos países de clima temperado. A atividade de flebotomíneos adultos é crepuscular e noturna, do início da primavera ao fim do outono na bacia do Mediterrâneo e durante todo o ano na América do Sul. Sua gama de atividade é entre 15 e 28 °C, e está sempre associada à alta umidade relativa e ausência de vento ou chuva. Flebotomíneos podem voar distâncias de 200 m a 2,5 km e podem entrar nas casas durante a noite devido ao seu fototropismo positivo (SOLANO-GALLEGO et al, 2009). No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira é considerada a principal espécie transmissora da *Leishmania (Leishmania) chagasi*, e é encontrada nas cinco regiões do país, mas a *L. cruzi* também foi incriminada como vetora em uma área específica do estado do Mato Grosso do Sul. São também conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (BRASIL, 2013a).

Em regiões urbanas o cão (*Canis familiaris*) é apontado como o principal reservatório da LV, devido à sua relação próxima com os humanos (DANTAS-TORRES, 2007), e a características como o fato de desenvolver um intenso parasitismo cutâneo, favorecendo a infecção de flebótomos (de QUEIROZ et al, 2011). Outro aspecto importante é o fato de que a maioria dos cães permanece assintomática por longos períodos de tempo, o que retarda o diagnóstico e favorece a manutenção do animal infectado na região e a transmissão da LV (ALVAR et al., 2004; BRASIL, 2006; DINIZ et al, 2008). Tem sido demonstrada uma correlação entre a distribuição espacial de cães positivos e a ocorrência de casos humanos de LV em diversas regiões, o que leva a crer que a infecção humana foi precedida pela infecção canina (DANTAS-TORRES, 2007; DINIZ et al, 2008, FRAGA et al, 2012). No ambiente silvestre, são apontados como reservatórios as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2006). Existem também relatos indicando roedores como reservatórios da LV em áreas rurais e periurbanas. Outros

animais podem compor o cenário epidemiológico da LV em áreas endêmicas, pois, mesmo com a retirada de todos os cães soropositivos, o ciclo de transmissão da doença ainda pode existir, embora o número de casos humanos tenha diminuído (SILVA, 2001).

2.2 Manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina

No que se refere à apresentação clínica da leishmaniose visceral canina, os animais podem apresentar desde nenhum sinal até múltiplos sinais clínicos, e esse polimorfismo reflete não só o estágio da evolução da doença, mas também as diferenças na susceptibilidade do hospedeiro, o estado do sistema imunológico, e terapias prévias. Em algumas regiões, a ocorrência de outras infecções, como erlichiose e babesiose também devem ser consideradas, pois tais infecções podem levar ao surgimento de sinais clínicos semelhantes (SARIDOMICHELAKIS et al, 2009, CIARAMELLA et al, 1997).

A leishmaniose canina é uma doença sistêmica que pode envolver qualquer órgão, tecido ou fluido biológico, e se manifesta por sinais clínicos inespecíficos. Os principais achados clínicos encontrados no exame físico em LV incluem febre, palidez de mucosa, hepatoesplenomegalia, lesões cutâneas, depressão, letargia, atrofia muscular, anorexia, sinais oculares (como ceratoconjuntivite e opacidade de córnea), alopecia, epistaxe, artropatias, ascite, diarreia, onicogribose, manifestações hemorrágicas, além de linfadenomegalia e perda de peso. Também são observados outros sinais como, lesões cutâneas perioculares, falência renal e claudicação (ETTINGER e FELDMAN, 1997; CIARAMELLA et al, 1997; SOLANO-GALLEGO et al, 2009; TROPIA DE ABREU et al, 2011; MENDONÇA, 1999; MARTINÉZ-SUBIELA et al, 2002; SOLANO-GALEGO et al, 2004; UZAIR et al, 2004; BARROUIN-MELO et al, 2006; BRASIL, 2006; REIS et al, 2006a, SANT'ANA et al, 2007, LIMA et al, 2010).

As alterações cutâneas mais comuns incluem dermatite esfoliativa não pruriginosa, com ou sem alopecia, que pode ser generalizada ou localizada na

face, orelhas e membros, dermatite ulcerativa sobre proeminências ósseas, junções mucocutâneas, patas, orelhas, dermatite nodular focal ou multifocal, dermatite proliferativa mucocutânea e dermatite papular. Manifestações cutâneas atípicas como despigmentação, paniculite, hiperqueratose digital e nasal, erupção pustular, doença semelhante à alopecia areata, doença semelhante ao pêfigo folheaceo e eritema multiforme são relativamente raras. Piodermite estafilocócica, superficial ou profunda, é uma complicação comum (ETTINGER e FELDMAN, 1997; CIARAMELLA et al, 1997; KOUTINAS et al, 1999; SANT'ANA et al, 2007; SOLANO-GALLEGO et al, 2009). Os achados laboratoriais mais bem descritos são anemia, leucopenia, caracterizada por linfopenia, eosinopenia e monocitopenia, trombocitopenia, neutrofilia, hiperproteinemia, principalmente devido à elevada produção de anticorpos, e hipoalbuminemia, devido às lesões renais e hepáticas (ETTINGER e FELDMAN, 1997; CIARAMELLA et al, 1997, REIS et al, 2006a; TROPIA DE ABREU et al, 2011).

As doenças canina e humana apresentam várias semelhanças em relação ao quadro clínico, com exceção do comprometimento cutâneo mais grave, observado na doença canina (MORENO E ALVAR, 2002). Em relação aos seres humanos, as principais manifestações clínicas incluem febre, palidez, anorexia, emagrecimento, astenia, hepatoesplenomegalia, distensão abdominal, por vezes com presença de dor, diarreia, manifestações hemorrágicas, edema, icterícia, tosse, dispneia, epistaxe, linfadenopatia (PASTORINO et al, 2002; QUEIROZ et al, 2004; UZAIR et al, 2004; REY et al, 2005; PEDROSA e ROCHA, 2004; GUERRA et al, 2004, BERMAN, 1997). Dentre as alterações laboratoriais estão anemia, trombocitopenia, leucopenia, neutropenia, aumento de enzimas hepáticas (TGO e TGP) (UZAIR et al, 2004; BERMAN, 1997).



Figura 1. Manifestações clínicas clássicas na leishmaniose visceral canina. **A:** alopecia no focinho; **B:** onicogribose; **C:** dermatite não pruriginosa esfoliativa generalizada; **D:** lesão ulcerada em orelha; **E:** ceratoconjuntivite; **F:** caquexia. Cães de uma área endêmica para Leishmaniose Visceral (Jequie-BA-Brasil). Fonte: Arquivo de fotos do Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção, FIOCRUZ- BA.

2.3 O cão como reservatório e modelo de estudo da leishmaniose visceral

O cão doméstico possui os atributos necessários para ser reservatório eficiente da *L. infantum*. Em razão da sua proximidade com os seres humanos, o cão tem sido apontado como o principal reservatório de *L. infantum* na china, bacia do Mediterrâneo e nas Américas (DANTAS-TORRES, 2007; DINIZ et al, 2008; FRAGA et al, 2012). Tem sido relatada a existência de diferenças entre raças, como os cães das raças Cocker e Boxer, que apresentam um maior risco de infecção quando comparados com animais de outras raças (FRANÇA-SILVA et al, 2003). Já os cães da raça Ibizan Hound são apontados como mais resistentes em relação às outras raças (SOLANO-GALLEGO et al, 2000). Além disso, cães com pêlos curtos estão mais predispostos à infecção do que aqueles com pêlos longos, provavelmente pelo fato de nos animais de pêlos curtos a pele estar mais exposta e ser mais fácil o acesso do flebótomo à pele do animal (DINIZ et al, 2008). Entretanto, de uma forma geral, os cães são suscetíveis à infecção por *L. infantum*, o que contribui para seu papel como reservatório do parasito (DANTAS-TORRES, 2007; DINIZ et al, 2008). Outro fato característico importante é o cão apresentar, na maioria das vezes, um intenso parasitismo cutâneo, o que aumenta a possibilidade de infecção do vetor (de QUEIROZ et al, 2011).

Além da grande importância do cão como reservatório, a doença canina também é tida como de grande valor para a compreensão da doença humana, uma vez que o quadro clínico apresentado na doença canina, como mencionado acima, apresenta grande similaridade com o quadro observado na doença humana, com exceção do comprometimento cutâneo observado na doença canina, que é mais exacerbado do que o observado na doença humana. Além disso, a evolução da história natural da doença canina apresenta grande similaridade com a doença humana, o que faz com que a LV canina seja um importante modelo de estudo para a LV humana (CIARAMELLA et al, 1997; MENDONÇA et al, 1999; GUERRA et al, 2009; TROPIA DE ABREU et al, 2011).

Portanto, é plausível concluir que o cão doméstico desempenha um papel importante na epidemiologia da leishmaniose visceral. Os programas de controle da leishmaniose visceral frequentemente incluem eliminação ou tratamento de cães infectados, tratamento de casos humanos, controle do vetor e eliminação de outros possíveis reservatórios. No Brasil, a ênfase do programa de controle é na vigilância sorológica de cães e humanos, e a eliminação de cães soropositivos (ASHFORD et al, 1998).

No Brasil, os Ministérios da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da portaria interministerial nº 1.426, de 2008, proíbem o tratamento da leishmaniose visceral em cães (BRASIL, 2008). Nos países onde o tratamento é permitido, as opções de tratamento para a leishmaniose estão limitadas ao uso de antimoniais pentavalentes como drogas de primeira linha e pentamidina, anfotericina B como fármacos de segunda linha. Mas, devido ao aumento da resistência a drogas de primeira linha e à toxicidade de fármacos de segunda linha, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a doença seria um importante avanço. A utilização de vacinas é vantajosa em relação à quimioterapia, pois elas induzem efeitos de longa duração e poderiam ser administradas tanto de maneira profilática como terapêutica. Além disso, a vacina não apresentaria o problema da resistência como no caso da quimioterapia (NAGILL e KAUR, 2011).

A resposta imune tipo Th1, é exibida por indivíduos que desenvolvem a forma assintomática da LV (PINELLI et al. 1994). Se após a infecção linfócitos T CD4+ do tipo Th1 são estimulados, ocorre a produção predominante de IFN- γ , com consequente ativação de macrófagos e destruição do parasita (MURRAY et al., 1983). Já os indivíduos que desenvolvem a doença tendem a apresentar uma resposta imune do tipo Th2 ou a predominância da atividade de citocinas produzidas por células T CD4+ Th2 (GHALIB et al., 1993). Neste tipo de resposta, ocorre uma predominância da produção de IL-10 e IL-4. A produção de IFN- γ é regulada por diversos fatores na leishmaniose visceral, dentre eles a IL-10, que possui um papel fundamental na supressão dessa citocina (BACELLAR et al., 2000). Contudo, existe um equilíbrio entre essas respostas,

como observado por Singh e colaboradores (2012), que mostraram que tanto pacientes com leishmaniose visceral ativa quanto pacientes clinicamente curados apresentavam níveis elevados de IFN- γ , porém apenas pacientes com doença ativa também produziram IL-10. Isso mostra a presença dos dois tipos de resposta (SINGH et al, 2012). Esses dados apontam a IL-10 como um possível alvo para a imunoterapia contra a LV, pois a sua inibição poderia levar a um predomínio de resposta imune do tipo TH1, o que favoreceria a eliminação do parasita.

Ao inibir a IL-10, o equilíbrio entre as citocinas efetoras e reguladoras pode ser deslocado para uma resposta do tipo TH1. O bloqueio de IL-10 pode aumentar o bloqueio da função de células apresentadoras de antígenos e, além disso, aumentar a capacidade do macrófago infectado de responder adequadamente a IFN- γ , promovendo assim a eliminação de parasita, tal como demonstrado *in vitro* (GAUTAM et al, 2011; KUMAR e NYLÉN, 2012). Isto pode reduzir a dose e/ou a duração do tratamento que os pacientes recebem. Outros alvos potenciais podem ser receptores expressos em Treg ou os seus ligantes correspondentes em células efetoras, tais como a PD-1, e seus ligantes PD1-L (B7-H1) ou CTLA-4 (EL-ON, 2009; KUMAR e NYLÉN, 2012). A supressão de outras citocinas, incluindo de IL-13, IL-4 e TGF- β , inibiu a replicação do parasita, mas apenas afetou parcialmente a morte do parasita sem a indução de um efeito sinérgico com antimoniais pentavalentes (MURRAY et al, 2005).

Outro aspecto importante a ser observado é a diversidade de possíveis apresentações que é observada na doença canina. Como já foi mencionado anteriormente, os cães infectados podem apresentar desde nenhum sinal clínico, sendo esses animais chamados de assintomáticos, até um elevado número de sinais, sendo considerados polissintomáticos. Devido a esse polimorfismo, tem sido buscada a identificação de possíveis marcadores de gravidade para a doença, a fim de definir o perfil dos animais resistentes e dos animais susceptíveis a leishmaniose visceral. Até o momento, alguns parâmetros têm sido utilizados como marcadores de susceptibilidade e resistência, como a presença de parasitas em linfonodos e outros órgãos, como o baço, determinada através de cultura. A identificação do parasito em

cultura de tecidos do hospedeiro indica uma incapacidade deste de controlar a proliferação da *Leishmania* no organismo, e conseqüentemente, de controlar a infecção (PINELLI et al., 1994; PARANHOS-SILVA et al., 2003, REIS et al, 2006b).

Um importante marcador de resistência ou susceptibilidade a leishmaniose visceral é o resultado no teste cutâneo da leishmanina (LST). O resultado positivo no LST indica que o animal produz uma resposta celular quando em contato com o antígeno da *Leishmania*, e tendo em vista que a imunidade ao parasita é mediada por células T, uma resposta celular positiva pode indicar um perfil de resistência à infecção (PINELLI et al., 1994; SOLANO-GALLEGO et al, 2000). A resposta linfoproliferativa *in vitro* também é um importante marcador, bem como o perfil de citocinas produzidas pelos animais durante a infecção (PINELLI et al., 1994). A presença de resposta linfoproliferativa e a produção de citocinas como IFN- γ indica um perfil de resistência à infecção (PINELLI et al., 1994; PARANHOS-SILVA et al., 2003; MURRAY et al, 1983).

A presença de sinais clínicos também é um marcador importante. Animais com perfil de resistência à infecção tendem a permanecer assintomáticos por longos períodos, podendo nunca vir a apresentar sinais de doença, ao passo que animais susceptíveis apresentam uma série de sinais clínicos. Contudo, a grande variedade e inespecificidade dos sinais clínicos atribuídos à LV dificulta a avaliação (PINELLI et al., 1994; PARANHOS-SILVA et al., 2003; SOLANO-GALLEGO et al, 2000).

Outro aspecto a ser avaliado é a produção de anticorpos específicos. Foi demonstrado que animais assintomáticos produzem IgG1 em maiores quantidades, enquanto que animais sintomáticos produzem mais IgA, IgE, e IgG2. Também foi observado que animais com maiores níveis de IgG1 apresentam menor carga parasitária na medula enquanto que animais com maiores níveis de IgA, IgM e IgG2 apresentam maior carga parasitária em órgãos como pele, medula óssea, linfonodo e baço (REIS et al, 2006b).

Nosso grupo demonstrou que existe uma associação entre a presença de marcadores de gravidade e a desestruturação do tecido linfóide esplênico

observada na LV. Animais com parasitismo esplênico identificado em cultura e resultado negativo no LST apresentaram mais frequentemente desestruturação do tecido linfoide esplênico do que aqueles animais que não apresentavam parasitismo esplênico e tiveram resultado positivo no LST (SANTANA et al, 2008; SILVA et al, 2012). Esses achados, juntamente com o fato de o baço ser um órgão altamente parasitado nos animais com perfil de susceptibilidade para a LV (REIS et al, 2006b), mostram que o baço é um órgão de grande importância no contexto da LV.

2.4 Baço

O baço é o maior órgão linfoide secundário do organismo canino. É mais complexo do que qualquer outro tecido linfoide (REECE, 2006). O baço do cão é um órgão alongado, aproximadamente em forma de haltere (DYCE et al., 2004). Está localizado no quadrante cranial esquerdo do abdômen, numa orientação dorsoventral. Pesa aproximadamente 50 gramas em um cão de porte médio (ETTINGER e FELDMAN, 1997), mas seu tamanho e peso podem variar amplamente devido a sua função como reservatório de sangue (DYCE et al., 2004). Nos seres humanos, o baço se encontra em posição intraperitoneal. Seu eixo longitudinal se projeta sobre o trajeto da 10ª costela. Um baço de tamanho normal, portanto, não é palpável sob o arco costal. Devido à grande superfície de contato com o diafragma, a posição do baço é altamente dependente do momento da respiração. O baço fica localizado no chamado nicho esplênico, delimitado inferiormente pelo ligamento frenocólico, entre a flexura esquerda do colo e o diafragma. O baço pesa 150 gramas e tem 11 cm de comprimento, 7 cm de largura e 4 cm de espessura (SOBOTTA, 2013).

É um órgão parenquimatoso, que diferente de outros órgãos parenquimatosos, não possui córtex e medula, mas é dividido em polpa branca e polpa vermelha. Possui também uma cápsula e trabéculas. A cápsula de tecido conjuntivo denso emite trabéculas, que dividem o parênquima, ou polpa esplênica, em

compartimentos incompletos, e fornece sustentação para os elementos do parênquima. A superfície medial do baço apresenta um hilo, no nível do qual a cápsula mostra um maior número de trabéculas, pelas quais penetram os vasos. A estrutura do baço humano é semelhante à observada no baço canino, com polpa branca, polpa vermelha e zona marginal, e componentes celulares e vasculares semelhantes (JUNQUEIRA, 2004; MCGAVIN e ZACHARY, 2012; SOBOTTA, 2013; GUYTON e HALL, 2006).

A polpa branca é organizada em bainhas linfoides, com compartimentos de células T e células B, ao redor das ramificações de vasos arteriais, assemelhando-se à estrutura de um linfonodo. A organização correta e a manutenção da polpa branca são controladas por quimiocinas específicas, que atraem células T e B para os seus respectivos domínios, estabelecendo assim zonas específicas dentro da polpa branca (MEBIUS & KRAAL, 2005). O espessamento dessas bainhas periarteriais forma os nódulos linfoides. Os nódulos linfoides podem apresentar centros germinativos, indicativos de estímulo antigênico (GARTNER & HIATT, 2007). No tecido linfoide das bainhas periarteriolares há predominância de linfócitos T, enquanto que nos nódulos linfáticos, há predominância de linfócitos B (JUNQUEIRA, 2004, MCGAVIN e ZACHARY, 2012; GUYTON e HALL, 2006).

A polpa vermelha é formada por cordões esplênicos, separados por sinusóides. Os cordões esplênicos, também chamados de cordões de Billroth, são contínuos e de espessura variável, conforme o estado local de distensão de sinusóides. São constituídos por uma rede frouxa de células reticulares e fibras reticulares de colágeno do tipo III, que contém células como macrófagos, linfócitos T e B, plasmócitos, monócitos leucócitos granulócitos, além de plaquetas e eritrócitos. (JUNQUEIRA, 2004; MCGAVIN e ZACHARY, 2012; GUYTON e HALL, 2006).

Entre a polpa branca e a polpa vermelha existe uma zona linfoide mal delimitada, chamada de zona marginal. Em cães e gatos, ela é pouco desenvolvida, enquanto que em outras espécies está povoada por macrófagos, plasmócitos, linfócitos e células dendríticas interdigitantes (APCs). A zona

marginal recebe sangue das artérias, de modo que, nessa área, ocorre filtração do sangue e fagocitose (ETTINGER e FELDMAN, 1997; JUNQUEIRA, 2004; GARTNER & HIATT, 2007).

Várias funções de extrema importância no organismo são desempenhadas pelo baço. Nos seres humanos, o baço desempenha funções semelhantes às observadas nos cães, como hemocaterese e em menor extensão o armazenamento de sangue (GUYTON e HALL, 2006). O baço é um dos principais órgãos hematopoiéticos durante o desenvolvimento fetal. Esta atividade diminui com o nascimento, e baços de caninos adultos normais não possuem atividade hematopoiética. Contudo, a atividade hematopoiética pode ser reassumida sob determinadas condições patológicas, como leucemia, linfoma, hipoplasia de medula óssea e mielofibrose, e é conhecida como hematopoiese extramedular, que pode resultar em esplenomegalia (ETTINGER e FELDMAN, 1997; REECE, 2006).

É um dos principais locais para a iniciação de grande parte da resposta imune primária e para a ativação de linfócitos B com consequente produção de anticorpos (LEUNG et al., 1972). É também o maior responsável pela produção de tuftsina, uma gamaglobulina que exerce importante papel estimulador da atividade dos neutrófilos. Além disso, importantes opsoninas são sintetizadas no baço e a ausência desse órgão diminui a opsonização, dificultando a fagocitose (PAULO et al., 2001).

Como um importante reservatório de sangue, o baço é requisitado quando o organismo tem maior necessidade de oxigênio nos tecidos, como em hemorragias, intoxicação por monóxido de carbono, durante a administração de determinados anestésicos (REECE, 2006). Em caninos e felinos, o baço pode armazenar entre 10 e 20% da volemia (ETTINGER e FELDMAN, 1997). Em momentos de excitação, ocorre a liberação de catecolaminas, o que resulta em contração esplênica. Dessa forma, observa-se um aumento nos valores de contagem eritrocitária, VG e hemoglobina, devido à liberação do sangue estocado no baço. Tais valores podem ser semelhantes aos observados durante processos de hemoconcentração (REECE, 2006). Nos humanos, o

baço também exerce a função de armazenamento de eritrócitos. Esses eritrócitos podem ser lançados na circulação geral, quando o sistema nervoso simpático é excitado, o que provoca a contração do baço e de seus vasos. Até 50 mL de eritrócitos concentrados podem ser liberados na circulação, aumentando em 1 a 2% o hematócrito (GUYTON e HALL, 2006).

O baço é também responsável pela destruição de eritrócitos em humanos e cães. O fenômeno de remoção de eritrócitos em via de degeneração é chamado de hemocaterese, e ocorre também, em intensidade muito menor, na medula óssea (JUNQUEIRA, 2004). Os macrófagos dos cordões esplênicos fagocitam hemácias ou restos de hemácias, que são digeridos nos lisossomos dos macrófagos, e sua hemoglobina é degradada em diversos fragmentos, dando origem à bilirrubina, que é devolvida ao sangue, capturada pelas células hepáticas, e excretada como constituinte da bile (JUNQUEIRA, 2004). Como resultado do desdobramento da hemoglobina, ocorre ainda a obtenção de ferro, que pode ser armazenado nos macrófagos como ferritina, ou passar para o sangue, onde se combina com a transferrina. O complexo ferro-transferrina é captado por células que possuem receptores de membrana para transferrina, como eritroblastos, sendo reutilizado para a síntese de hemoglobina (JUNQUEIRA, 2004; MEBIUS & KRAAL, 2005; GUYTON e HALL, 2006).

Levando em consideração as características e funções do baço discutidas anteriormente, torna-se evidente que a redução, ou mesmo completa parada da atividade esplênica pode levar a uma série de doenças em diferentes sistemas. A hiposplenia funcional está associada a uma ampla gama de doenças, incluindo várias doenças imunológicas e hematológicas. A presença de corpúsculos de Howell-Jolly em eritrócitos do sangue periférico é uma pista importante para o diagnóstico de asplenia ou hiposplenia funcional. Corpúsculos de Howell-Jolly são restos nucleares no interior de eritrócitos. Eritrócitos contendo esses fragmentos nucleares são normalmente removidos pelo baço. Podem não aparecer na hiposplenia leve (MELLES et al., 2004; DE PORTO et al., 2010, CAMERON et al, 2011), mas a sua presença é um indicativo de redução significativa da atividade esplênica.

A estrutura e fisiologia do baço fazem dele peça fundamental do sistema imunológico. A microarquitetura do baço facilita a comunicação eficiente entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T para a montagem de uma imunidade protetora contra patógenos (BENEDICT et al., 2006). A manutenção da integridade estrutural do baço é fundamental para defesa contra microorganismos (PAULO et al., 2001).

Em seres humanos, a principal patologia relacionada com a redução da atividade esplênica (hiposplenia) ou sua completa ausência (asplenia) é a sepse. Estudos mostram que tanto a hiposplenia como a asplenia aumentam consideravelmente a susceptibilidade de humanos a infecções de diversas naturezas (MELLES et al., 2004; CAMERON et al, 2011). Os principais patógenos envolvidos na sepse em humanos são *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Salmonella sp*. Outros menos frequentes são *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp*, *Bacteroides sp*, *Plesiomonas shigelloides*, *Eubacterium plautti* e *Pseudomonas pseudomallei*. Além das bactérias, pacientes com hiposplenia ou asplenia também aparentam ser mais susceptíveis a infecções por protozoários, como *Babesia microti* e *Babesia bovis* (MELLES et al., 2004; CAMERON et al, 2011). A sepse é uma complicação rara em cães e gatos (BICHARD e SHERDING, 2008; BOJRAB, 1998; FOSSUM, 2002). No entanto, como o baço desempenha importante papel na remoção de eritrócitos infectados por bactérias e hemoparasitas, acredita-se que os cães e gatos esplenectomizados sejam mais suscetíveis a infecções por hemoparasitas e infecções riquetsianas (BOJRAB, 1998; SLATTER, 2007). Foram relatadas infecções por *Babesia canis vogeli* (SOLANO-GALLEGO et al, 2008) e *Mycoplasma haemocanis* (KEMMING et al, 2004) em cães esplenectomizados. Em infecção experimental com *Trypanosoma brucei brucei*, foram observadas uma maior gravidade do quadro febril e uma maior carga parasitária nos cães esplenectomizados em relação ao grupo controle não esplenectomizado (EGBE-NWIYI e ANTIA, 1993).

Em cães, uma consequência do fim da atividade esplênica é a redução do hematócrito e aumento da contagem de reticulócitos. Reticulócitos são células eritróides que possuem RNA residual e são liberadas na medula óssea em resposta à hipóxia tecidual. Após a sua liberação pela medula, elas ficam retidas no baço, onde se tornam eritrócitos maduros (LOPES et al., 2006). Comprometimento da função esplênica pode resultar em redução na maturação de eritrócitos e consequente aumento na contagem de reticulócitos.

Há também a ocorrência de aumento dos lipídios plasmáticos em cães que passaram por esplenectomia total. Isso está relacionado com a atuação do baço na regulação lipídica, através do sequestro de lipídios no interior de macrófagos. Estudo realizado por Paulo e colaboradores (2001) mostrou que a ausência do baço implica em aumento do colesterol total em cães, enquanto que nos animais que passaram por hemiesplenectomia ou esplenectomia subtotal não houve aumento significativo. Nesse estudo, foi observado aumento significativo dos níveis de HDL e LDL. Considerando-se o LDL uma fração aterogênica, é de se supor que a esplenectomia total pode predispor à aterogênese, levando a doenças como infarto do miocárdio (PAULO et al., 2001).

2.5 Infecções e alterações estruturais do baço

A esquistossomose humana cursa com esplenomegalia congestiva, espessamento capsular, hiperplasia de células mononucleares, e presença de focos de plasmócitos com produção de gamaglobulinas (ANDRADE et al., 1965; ANDRADE et al., 1983). Estudos em camundongos mostram que a infecção por *Plasmodium chabadi* leva a esplenomegalia e desorganização do parênquima esplênico, com perda da delimitação entre polpa branca e polpa vermelha, causada pela hiperplasia do tecido linfoide, além de vacuolização de células esplênicas e um grande ocorrência de apoptose (DKHIL, 2009). Alterações semelhantes foram observadas em baços de camundongos

infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (CARVALHO et. al, 2007). Em um estudo onde foi feita a infecção experimental de cães com *Toxoplasma gondii*, foi observada a ocorrência de esplenomegalia com hiperplasia da polpa branca, além de congestão (ABREU et al., 2001).

Um estudo sobre erlichiose monocítica experimental em cães demonstrou esplenomegalia com hiperplasia da polpa branca, expansão das bainhas periarteriolares, espessamento de cordões esplênicos, bem como aumento no número de células produtoras de IgG nos cordões medulares e zona marginal, além de uma redução no número de células CD8+ nos cordões esplênicos (DE CASTRO et al., 2004).

O baço também apresenta alterações em indivíduos acometidos pelas principais viroses caninas. Oliveira e colaboradores em 2009 observaram a ocorrência de esplenomegalia, com hiperplasia de folículos linfoides, focos de hemorragia e congestão no parênquima esplênico de cães com parvovirose (OLIVEIRA et al., 2009a). Em animais infectados por herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1) foi possível observar esplenomegalia moderada a acentuada, necrose linfoide, hemorragia e congestão no parênquima esplênico (OLIVEIRA et al., 2009b). Sonne (2009) relatou depleção linfoide, necrose centro folicular e infiltrado histiocitário na polpa esplênica de cães com cinomose (SONNE et al., 2009).

Foi observado que durante o curso da leishmaniose visceral, a estrutura do baço é afetada, em especial, o tecido linfoide. A microarquitetura, tanto da zona marginal quanto dos folículos linfoides são comprometidas. Observou-se também que há comprometimento da capacidade de células dendríticas de migrar da zona marginal para bainha linfoide periarteriolar, em camundongos com infecção crônica por *L. donovani* (ATO et al., 2002). Smelt e colaboradores demonstraram a ocorrência de destruição das células dendríticas foliculares e uma perda concomitante de centro germinativo associados com a leishmaniose visceral crônica em camundongos BALB/c, vistos quatro semanas após a infecção. A perda das células dendríticas foliculares está associada com a infiltração de macrófagos intensamente parasitados no centro germinativo, e a

redução da carga parasitária através da quimioterapia foi capaz de retardar o processo de destruição das células dendríticas foliculares (SMELT et al., 1997).

Em cães com LV, são observadas alterações macroscópicas, como esplenomegalia e presença de espessamento capsular com reação inflamatória difusa (TAFURI et al., 1996; TAFURI et al., 2001). Além das alterações macroscópicas, são observadas também alterações como aumento de plasmócitos na polpa vermelha esplênica e depósitos de substâncias amiloides em polpa branca e vermelha (CORBEIL et al., 1976), hiperplasia de folículos linfóides (TRYPHONAS et al., 1977), e atrofia folicular (TAFURI et al., 1996). Também foi observado que cães com elevado parasitismo esplênico apresentam uma diminuição significativa no número absoluto de linfócitos T CD5+, em comparação com os cães com médio parasitismo esplênico, além de uma diminuição do número absoluto de monócitos circulantes (GUERRA et al., 2009).

Com relação à produção de citocinas no baço durante a LV, um estudo realizado avaliando os níveis de citocinas no baço de cães infectados, utilizando RT-PCR mostrou aumento da expressão de IL-10 e IFN- γ em associação com aumento da carga parasitaria dos animais e a progressão da doença (LAGE et al., 2007). O aumento de expressão de IFN- γ foi visto em cães com LV, sugerindo um predomínio de resposta imune do tipo Th1 durante a leishmaniose visceral (STRAUSSAYALI et al., 2007). Um trabalho realizado por Silva e colaboradores em 2012, não encontrou diferença na expressão de CCL19, CCL21, IFN- γ , IL-10, LT α , LT β , TGF- β e TNF entre os animais infectados por *Leishmania* e os animais controle não infectados.

Nosso grupo demonstrou a ocorrência de desorganização do tecido linfóide, maior ocorrência de periesplenite, existência de granulomas, aumento da frequência de plasmócitos na polpa vermelha, presença de amastigotas de *Leishmania* em área subcapsular e polpa vermelha. Observou-se também uma redução na quantidade e tamanho dos folículos linfóides, além de uma redução de centros germinativos e zona marginal, em baços de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*. Tais alterações esplênicas parecem estar

relacionadas com a susceptibilidade dos cães para a leishmaniose visceral (SANTANA et al., 2008).

Mais recentemente, nosso grupo mostrou uma redução dos folículos linfoides e das zonas marginais em cães com tecido linfoide esplênico desorganizado, além de os folículos linfoides apresentarem menores números de células T e células dendríticas S100 +. O número de células B estava reduzido tanto nos folículos quanto nas zonas marginais, nos animais com tecido linfoide desorganizado, o que pode ser explicado pela redução da expressão de CXCL13, que também foi observada, pois CXCL13 atua na migração de células B para o folículo linfoide e na manutenção dessas células próximas às células dendríticas foliculares (SILVA et al, 2012). Estas mudanças no baço foram associadas com maior frequência de doença grave nos cães com tecido linfoide desorganizado, porém, o número de animais é limitado (SILVA et al, 2012).

No presente estudo, reunimos os dados clínicos e laboratoriais de um grande número de cães de uma área endêmica de leishmaniose visceral para estudar a relação entre a desorganização da polpa branca esplênica e a gravidade da doença nesses cães. Os dados apresentados são relevantes para a compreensão dos mecanismos das formas severas de leishmaniose visceral, e contribui para a definição de marcadores de gravidade para a doença. A hipótese do presente trabalho é que a desorganização do tecido linfoide esplênico está associada a maior gravidade da leishmaniose visceral em cães.

3. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é um grave problema de saúde pública no Brasil (BRASIL, 2006). Uma série de evidências suporta a ideia de que o cão é o principal reservatório urbano da *Leishmania infantum*, o principal agente causal das leishmanioses viscerais canina e humana. (BRASIL, 2006), sendo esse animal também susceptível ao desenvolvimento de formas letais da enfermidade (SILVA, 2007). Adicionalmente, vários aspectos da LV humana são observados na doença canina (MORENO & ALVAR, 2002; DESJEUX, 2004), tornando o cão um modelo animal adequado para estudo da leishmaniose visceral em humanos.

O baço é um importante órgão linfóide secundário, envolvido com a vigilância imunológica a antígenos circulantes (MEBIUS & KRAAL, 2005). Hiposplenia e asplenia estão associadas a uma maior susceptibilidade a disseminação de infecções por bactérias encapsuladas (HANSEN & SINGER, 2001). Em um trabalho prévio, observou-se a ocorrência de desorganização do tecido linfóide esplênico, além de outras alterações como periesplenite, granulomas, aumento da frequência de plasmócitos na polpa vermelha, redução na quantidade e tamanho dos folículos linfóides, além de uma redução de centros germinativos e zona marginal, em baços de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*. Tais alterações esplênicas parecem estar relacionadas com a susceptibilidade dos cães para a leishmaniose visceral, observada pela presença de parasitas no baço detectado por cultura esplênica e ausência de resposta celular, com resultado negativo no LST (SANTANA et al., 2008). Em estudo mais recente, observamos redução dos folículos linfóides e das zonas marginais em cães com tecido linfóide esplênico desorganizado, além de uma redução da expressão de CXCL13 no baço, uma quimiocina que atua na migração de células B para o folículo linfóide e na manutenção dessas células próximas às células dendríticas foliculares (SILVA et al, 2012). Estas mudanças no baço foram associadas com maior frequência de doença grave nos cães com tecido linfóide desorganizado, porém, o número de animais é limitado (SILVA et al, 2012).

Mediante esses achados, buscamos estudar a relação entre a desorganização da polpa branca esplênica e a gravidade da doença em um grande número de cães de uma área endêmica, para compreender os mecanismos das formas severas de leishmaniose visceral, e contribuir para a definição de marcadores de gravidade para a doença.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Relacionar o *status* clínico de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados com a desestruturação arquitetural do baço.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar a frequência de sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral em cães de uma área endêmica para a doença.
2. Determinar a gravidade da apresentação clínica da leishmaniose visceral nesses cães.
3. Determinar a frequência de desorganização da polpa branca esplênica em animais de uma área endêmica para leishmaniose visceral.
4. Avaliar a correlação entre presença de formas graves da leishmaniose visceral e a desorganização da polpa branca esplênica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Este é um estudo retrospectivo baseado material histológico e registros experimentais arquivados no Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ (Bahia, Brasil). Foram utilizados cães de rua capturados em colaboração com o Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva (PIEJ) e com a Secretaria de Saúde de Jequié, Bahia. Foram capturados um total de 207 cães, nos anos de 2004, 2006, 2008 e 2010. Os animais foram identificados, examinados clinicamente por pelo menos dois veterinários e foi realizada a coleta de sangue para sorologia. Foi realizado o teste cutâneo da leishmanina (LST) em 146 dos 207 animais. Os cães que obtiveram resultado positivo no exame sorológico e os que não foram reclamados por proprietários foram mantidos no canil municipal por 48 horas, com livre acesso a ração e água. Os cães foram, então, sedados com acepromazina (0,1 mg/kg IV, Acepram% 1, Vetnil Brasil) e tiopental sódico (15 mg/kg IV, Thiopentax 1g Cristália, Brasil) e sacrificados usando uma solução supersaturada de cloreto de potássio (2 mL/kg). Foi realizada punção esplênica para coleta de material para cultura de *Leishmania*. Os cães foram submetidos à necropsia para coleta de espécimes de baço para exame histológico e quantificação de carga parasitária por real time PCR. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da FIOCRUZ para manipulação e experimentação com animais (http://www.castelo.fiocruz.br/vpplr/comissoes_camaras-tecnicas/Manual_procedimentos.pdf) e a lei sobre experimentação animal [LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm), (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm). O estudo tem aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do CPqGM-FIOCRUZ (CEUA, parecer nº 015/2009).

5.2 ELISA

Placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços (Cliniplate-Labsystem) foram revestidas com 100 µl de antígeno de *L. chagasi* (15 mg / ml) em tampão carbonato (0,06 M, pH 9,6). A concentração ótima de cada antígeno para a sensibilização da placa foi determinada em ensaios preliminares usando soro de animais infectados experimentalmente com as diferentes espécies de *Leishmania*. Reações não específicas foram bloqueadas com uma solução de PBS contendo 10% (w/v) de leite desnatado em pó. Após lavagem com PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBS-Tween), as amostras de soro, diluído a 1:400 e 1:1000 em tampão de ELISA [PBS contendo 10% (w/v) de leite desnatado em pó e 0,05 % (v/v) de Tween-20] foram adicionados a cada poço. Conjugado de anti IgG canino e peroxidase (Bethyl Laboratories) foi utilizado a uma diluição de 1:1000 (PARANHOS-SILVA et al., 2003). As reações foram desenvolvidas tal como descrito anteriormente (SANTOS et al., 1996).

5.3 Cultura

A cultura foi realizada por um período de 4 semanas. O aspirado esplênico foi mantido em meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) bifásico a 23 °C, suplementado com SFB a 20% (soro fetal de bovino - Gibco BRL, Nova Iorque, EUA) e 100µg de gentamicina para evitar a contaminação (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Para a identificação do parasita, as observações microscópicas foram realizadas em intervalos semanais para não menos do que 4 semanas (BARROUIN-MELO et al, 2004). Cada cultura esplênica foi preparada separadamente e individualmente, com identificação e duplo controle. Não foi realizado repique das culturas.

5.4 LST

Antígeno bruto de *L. chagasi* foi diluído em solução salina a uma concentração final de 2,5 mg de proteína por mL. Cada animal foi injetado por via intradérmica com 100 µL de volumes da solução de antígeno na pele abdominal (BALEIRO et al., 2006). Como controle, 100 µL de diluente (solução salina) foi injetado em um local diferente da pele abdominal. Quarenta e oito horas após as injeções, os tamanhos de endurecimento foram medidos por observadores sem conhecimento prévio do local das injeções. De modo a reduzir a variação experimental, ambos os testes e as suas leituras foram sempre realizadas pelos mesmos dois autores. As leituras foram auxiliadas pelo uso de uma caneta esferográfica. Uma fita adesiva transparente, com o desenho da área medida foi sempre colhida e preservada no livro experimental, para confirmação eventual, se necessário. Os resultados são expressos como a média dos dois eixos perpendiculares maiores da área endurecimento. As reações da pele com o tamanho da endureção igual ou superior a 5 mm foram consideradas positivas.

5.5 PCR quantitativo (Real time PCR)

Os fragmentos de baço foram obtidos durante a necropsia. As amostras foram coletadas utilizando agulhas ou lâminas de bisturi estéreis, e foram armazenados em criotubos livres de DNAase e RNAase, em nitrogênio líquido, até a extração do DNA. O DNA de cada amostra foi extraído utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Um total de 10mg de baço foi tratado segundo o protocolo da Qiagen para tecido animal. Uma vez extraído, a qualidade e a concentração de cada amostra de DNA foi determinada utilizando um espectrofotômetro digital (NanoDrop ® ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, EUA). As amostras de DNA foram então ajustadas a uma

concentração de 30 ng/ μ l, aliquotadas e armazenadas a -20 ° C até a realização do PCR.

O PCR quantitativo foi utilizado para determinar os valores de DNA parasitário em amostras de baço de cães. Os ensaios de PCR foram realizados utilizando um processo de amplificação previamente descrito por Francino e colaboradores, 2006. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ l, contendo 5 μ l de amostra de DNA diluído 30 ng/mL em água deionizada, e 20 μ l de mistura para PCR, contendo 12,5 μ l de Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), primer forward (Leish-1) e primer reverse (Leish-2), ambos com uma concentração final de 900nM, e uma sonda fluorogênica (Tabela 1), que foi sintetizada utilizando uma molécula repórter ligada a FAM na extremidade 5', bem como um MGB-QNQ quencher ligado à extremidade 3' (Perkin-Elmer Applied Biosystems), a uma concentração final de 200 nM. A quantificação do DNA de *Leishmania* foi realizada utilizando um método absoluto com base na comparação dos valores de ciclo limiar (CT) com os valores de uma curva padrão construída a partir de 10 diluições em série de DNA de *L. infantum*, extraído a partir de culturas de parasitas (estirpe MHOM / BR / 2000/MER2), variando de 10⁵ a 10⁻¹ parasitas, com cada diluição feita em triplicata em cada placa. A amplificação foi então realizada em triplicata para cada amostra, bem como um controle negativo, utilizando o sistema de detecção de sequência ABI Prism 5900 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Os parâmetros de ciclagem estão descritos na Tabela 2. A fim de minimizar as variações entre as placas, os valores a partir de cada placa foram normalizados utilizando uma linha de limite comum (0,102029). Em seguida, um valor de ciclo limiar (Ct) foi calculado para cada amostra por meio da determinação do ponto em que a fluorescência gerada dentro de uma dada reação excedeu a linha de limite. Cada amostra foi considerada positiva ou negativa com base no Ct, de acordo com o valor de cut-off que foi determinado usando um Receiver Operator Characteristic-curva (ROC). As amostras que apresentaram um Ct menor do que o Ct de corte foram consideradas positivas.

A amplificação do gene housekeeping canino (18S rRNA) foi utilizada com a intenção de normalizar a concentração de DNA de cada amostra, bem como para assegurar que os resultados negativos não estariam relacionados com

problemas de amostragem, como a degradação do DNA, baixas quantidade de DNA, e a presença de inibidores do PCR na amostra. Para amplificar o gene de rRNA 18S como uma referência interna de DNA genômico canino, reagentes TaqMan assay (Perkin-Elmer Applied Biosystems) foram utilizados. Os primers têm como alvo RNA 18S de mamíferos, e não amplificam DNA genômico de *Leishmania*. As reações foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo 5µl de amostra de DNA diluído 30ng/mL em água deionizada, e 20 µL de mistura para PCR, o qual consistia de 12,5µl de Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems), 1,25 µL de 18S GeneEx Assay (Perkin-Elmer Applied Biosystems) a uma concentração de 20 vezes, e foi adicionada água deionizada até um volume final de 25 µl. As curvas padrão foram preparadas variando de 450ng a 18,75ng, sendo cada diluição feita em triplicata em cada placa. A reação de amplificação também foi realizada em triplicata para cada amostra, utilizando o sistema de detecção de sequência ABI Prism 5900 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Os parâmetros de ciclagem foram os mesmos utilizados na detecção e quantificação de DNA de *Leishmania*, e estão descritos na Tabela 2. Para cada amostra, a quantidade de genes-alvo foi determinada comparando os valores de Ct com a curva padrão apropriada. Carga parasitária foi expressa como o número de parasitas por cada 100mg de rRNA 18S housekeeping no tecido do hospedeiro.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados no PCR quantitativo.

Primer	Sequência
Primer forward (Leish-1)	5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3'
Primer reverse (Leish-2)	5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'
Sonda	5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT -3'

Tabela 2. Parâmetros de ciclagem da reação de PCR quantitativo para detecção de DNA de Leishmania e de rRNA 18s.

Etapa	Número de ciclos	Temperatura e tempo
1	1	50°C, durante 2 minutos
2	1	95°C, durante 10 minutos
3	40	95°C, durante 15 segundos 60°C, durante 1 minuto

5.6 Exame clínico

Após a captura, os cães passaram por um exame clínico realizado por pelos menos dois veterinários, conforme um formulário padrão. Nesse exame foram avaliados parâmetros como idade, sexo, porte, e os seguintes sinais:

Emagrecimento: magros, animais com costelas e pelve evidente; caquéticos, animais com costelas e pelve evidente e atrofia muscular na região temporal e escapular.

Anemia: pálidos (rosa claro) membranas mucosas pálidas nos olhos e boca.

Alopecia: regiões sem pelos em áreas diferentes da pele.

Conjuntivite: inflamação da conjuntiva representada por vermelhidão ou pus.

Onicogribose: aumento (> 1 cm) das unhas em todos os membros.

Linfadenopatia: linfonodos maiores do que o esperado para o tamanho do animal, como se segue: cães com peso inferior a 5 kg e com linfonodos maiores do que 2 cm (eixo maior); cães com 5-10 kg e com linfonodo maior do que 3,5 cm, e cães com mais de 10 kg e com linfonodo maior que 4 cm.

Esplenomegalia: animais com baço palpável além da última costela.

Apatia: animal fraco, parado, sem ação quando contido, deitado.

Úlcera: lesões da pele com perda da camada epitelial, com a superfície granular e arestas levantadas.

Desidratação: redução do turgor cutâneo, visualizado através da redução da elasticidade da pele.

Erosão: perda de toda ou parte da espessura da epiderme.

Sistema reprodutor: alterações inflamatórias dos órgãos pertencentes ao sistema reprodutor.

Sistema respiratório: alterações inflamatórias dos órgãos pertencentes ao sistema respiratório.

Sistema digestório: alterações inflamatórias dos órgãos pertencentes ao sistema digestório, diarreia.

Sistema locomotor: alterações inflamatórias dos órgãos pertencentes ao sistema locomotor.

Os dados foram registrados em uma ficha de avaliação clínica. Amostras de sangue total e soro foram coletadas para a realização de exames laboratoriais. Os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram, juntamente com as informações contidas nas fichas clínicas, utilizados na construção de um banco de dados contendo as informações clínicas de todos os animais utilizados no estudo.

Os animais foram classificados quanto ao estado clínico levando em consideração os seguintes sinais clínicos: emagrecimento, anemia, linfadenopatia, esplenomegalia, alopecia, dermatite e onicogribose. Foram considerados assintomáticos os animais que não apresentaram nenhum dos sinais clínicos acima descritos. Os animais que apresentaram entre 1 e 3 sinais clínicos foram classificados como oligossintomáticos, e os animais que apresentaram acima de 3 sinais clínicos foram considerados polissintomáticos.

Os sinais emagrecimento, anemia, linfadenopatia, esplenomegalia, alopecia, dermatite e onicogribose também foram avaliados quanto à sua intensidade, sendo classificados como 0 quando ausente, 1 quando discreto, 2 quando moderado e 3 quando intenso.

5.7 Bioquímica e hematologia

Os exames laboratoriais relevantes para o nosso estudo foram: hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem global e diferencial de células vermelhas e leucócitos, dosagem de proteínas séricas totais e frações, ureia, creatinina, TGO, TGP, colesterol, HDL.

Amostras de sangue dos cães foram colhidas da veia cefálica sob contenção manual para análises hematológicas e bioquímicas séricas. As amostras para o exame foram imediatamente preservadas em tubos EDTA-2Na (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) e tubos de coleta de sangue (BD Vacutainer®; Becton, Dickinson and Co.), e examinadas no mesmo dia. Contagens de glóbulos vermelhos e glóbulos brancos foram realizadas usando um contador de células automatizado (Pentra contador 80, ABX Diagnostics, Montpellier, France). Tubos de microhematócrito contendo as amostras foram centrifugados a 12.000 rpm durante 5 min, e o hematócrito foi avaliado. Hemograma foi determinado por contagem de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e basófilos em esfregaços de sangue. O soro obtido após a centrifugação das amostras contidas nos tubos de coleta de sangue foi utilizado para determinar os seguintes valores bioquímicos séricos: proteínas totais, a albumina, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), bilirrubina total, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, colesterol total, e HDL, utilizando um método colorimétrico enzimático com um auto-analisador A15 (BioSystems, Barcelona, Espanha).

5.8 Dosagem de proteína C reativa

A concentração de proteína C reativa foi determinada pelo método ELISA, “sandwich”, utilizando o teste comercial “Phase TM Range Canine C-Reactive Protein Assay” (Tridelta Development Limited, Irlanda). A absorbância final das amostras foi medida em um leitor de micro placa a 450 nm.

5.9 Exame histológico

As secções de baço foram fixadas em formalina ácida. As secções foram incluídas em parafina, cortadas com a espessura de 4,0 µm e submetidas a coloração pela hematoxilina-eosina (H-E), para análise sob microscopia óptica convencional. Como parâmetros de análise utilizamos a presença e intensidade das alterações estruturais do tecido linfoide. Para isso, as amostras foram examinadas por dois patologistas (LARF e WLCS) e classificadas em três grupos de acordo com o grau de organização estrutural da polpa branca esplênica usando critérios previamente descritos por Santana e colaboradores (2008). Resumidamente: (a) bem organizado, com bainha periarteriolar de linfócitos distinta, centro germinativo, zona do manto e zona marginal, (b) levemente desorganizado, com mudanças hiperplásicas ou hipoplásicas levando a uma perda de definição dos limites entre as regiões da polpa branca, (c) moderadamente a extensivamente desorganizado, quando a polpa branca era evidente, mas as suas regiões eram pobremente individualizadas ou indistintas, ou quando a estrutura folicular mal era distinta da polpa vermelha e das áreas de células T. A última categoria foi frequentemente associada à atrofia linfoide. A Figura 2 mostra aspectos histológicos representativos dessas duas categorias de animais.

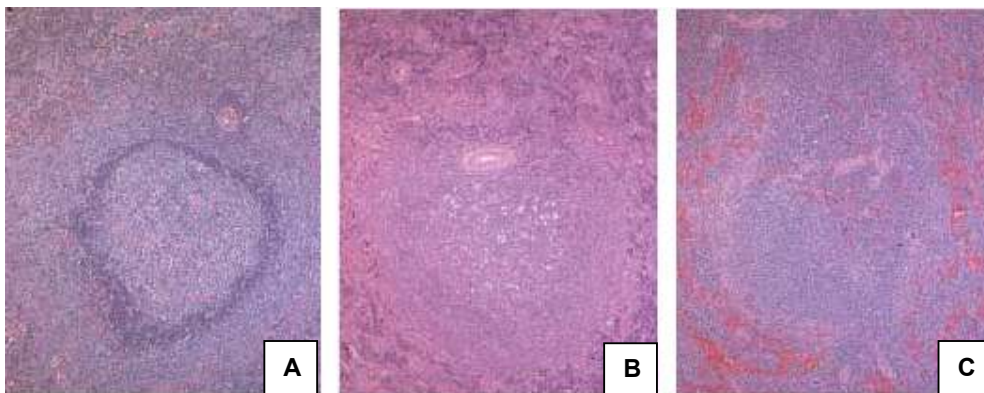


Figura 2: Alterações morfológicas no baço de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. (A) tecido linfoide bem organizado, (B) tecido linfoide levemente desorganizado, (C) tecido linfoide moderadamente a extensivamente desorganizado. Fonte: Santana e colaboradores, 2008.

5.10 Análise e expressão dos resultados

Os dados foram analisados utilizando os programas STATA Statistics/Data Analysis 11.0, GraphPad Prism 5.02 e Excel. Os resultados são expressos em valores absolutos ou relativos, em Tabelas associadas a gráficos. A significância estatística das diferenças observadas entre os grupos de cães foi determinada através de testes como o teste exato de Fisher ou Qui-quadrado para variáveis categóricas ou ordinais e o teste de Kruskal-Wallis, para as variáveis contínuas. O valor crítico para significância dos resultados foi estabelecido para $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

Foram realizados ELISA e cultura esplênica no material coletado de todos os 207 animais utilizados neste estudo, além de LST em 146 animais e PCR em 190 animais. As características gerais da amostra estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Características gerais da população de cães semi-domiciliados recolhidos nas ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010.

Parâmetro	N	(%)
N	207	(100)
Sexo		
Macho	117	(57)
Fêmea	90	(43)
Porte		
Pequeno	45/205	(22)
Médio	123/205	(60)
Grande	37/205	(18)
Idade estimada		
0 a 2 anos	28/155	(18)
3 a 5 anos	103/155	(66)
Acima de 6 anos	24/155	(16)
ELISA		
+	162	(78)
.	37	(18)
Grey Zone	8	(4)
Cultura		
+	82	(40)
-	125	(60)
LST		
+	17/146	(12)
-	129/146	(88)
PCR		
+	167/190	(88)
-	23/190	(12)

Qualquer um dos testes		
+	198	(96)
-	9	(4)
Classificação Clínica		
Assintomático	22	(11)
Oligossintomático	114	(55)
Polissintomático	71	(34)

6.1 ELISA e cultura esplênica

Ao realizar a análise dos dados tendo como parâmetro a positividade no teste ELISA, é possível observar um predomínio de animais de porte médio ($p=0,045$, teste Qui-quadrado). As demais características não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

Com relação aos sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral, conjuntivite se mostrou mais frequente nos animais com resultado positivo no teste ELISA ($p=0,035$, teste exato de Fisher), como mostrado na tabela 4. Embora alguns sinais como emagrecimento, anemia, linfadenopatia, esplenomegalia e onicogrifose se mostrem mais frequentes no grupo de animais com ELISA positivo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos positivo e negativo. Os parâmetros alterações nos sistemas reprodutor, digestório, respiratório e locomotor, bem como a presença de bolhas, pápulas, pústulas, úlceras, erosões e abscessos, não apresentaram diferenças entre os animais com ELISA positivo e negativo. Nas análises laboratoriais, destaca-se a dosagem sérica de proteínas totais, onde é possível observar uma maior frequência de hiperproteïnemia nos animais com ELISA positivo ($p=0,243$, teste exato de Fisher). O grupo de animais com ELISA positivo também apresentou uma maior frequência de hiperglobulinemia ($p=0,037$, teste exato de Fisher). Os resultados da análise laboratorial estão descritos na Tabela 4. No que se refere à classificação clínica dos animais

estudados, o resultado da análise está descrito na Tabela 3. É possível observar que o grupo de animais com ELISA negativo apresenta uma maior frequência de animais classificados como oligossintomáticos. Já o grupo de animais com ELISA positivo apresenta uma maior frequência de animais classificados como oligossintomáticos e polissintomáticos ($p=0,031$, teste exato de Fisher).

Ao realizar a análise dos dados em relação à positividade na cultura esplênica, nota-se um predomínio de animais com resultado positivo no PCR no grupo de animais com cultura esplênica positiva ($p= 0,006$, teste exato de Fisher). As demais características não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

A distribuição das frequências dos diferentes sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral está descrita na tabela 4. Há uma maior frequência de emagrecimento ($p= 0,001$), desidratação ($p= 0,019$), esplenomegalia ($p= 0,012$) e alopecia ($p= 0,0027$) no grupo de animais com cultura esplênica positiva (teste exato de Fisher). Os animais com cultura esplênica positiva apresentaram uma maior frequência de alterações no sistema reprodutor ($p= 0,041$, teste exato de Fisher), como descrito na Tabela 4. O mesmo grupo também teve uma maior frequência de presença de úlceras ($p= 0,017$, teste exato de Fisher) e erosões na pele ($p= 0,001$, teste exato de Fisher).

Os resultados das análises laboratoriais estão descritos na tabela 4. O grupo de animais com cultura positiva apresentou uma maior frequência de redução na contagem de hemácias ($p= 0,038$, teste exato de Fisher), além de maior frequência de leucocitose ($p= 0,0329$, teste exato de Fisher). O mesmo grupo obteve também maior frequência de hipoalbuminemia ($p= 0,0189$, teste exato de Fisher) e aumento de TGP ($p= 0,040$, teste exato de Fisher). Em relação à classificação clínica dos animais, é possível observar na tabela 4 que os animais classificados como assintomáticos e oligossintomáticos foram mais frequentes no grupo de animais com cultura esplênica negativa. Os animais classificados como polissintomáticos foram mais frequentes no grupo de animais com cultura esplênica positiva ($p= 0,004$, teste exato de Fisher).

Tabela 4. Distribuição das características e alterações observadas na população de cães semi-domiciliados recolhidos das ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010, em relação à positividade no ELISA e na cultura esplênica.

	ELISA		Cultura	
	+ (%)	- (%)	+ (%)	- (%)
Porte				
Pequeno	29 (18) ^a	13 (36)	23 (16)	23 (19)
Médio	100 (62)	19 (53)	80 (64)	80 (64)
Grande	32 (20)	4 (11)	21 (17)	21 (17)
Sinais Clínicos				
Emagrecimento	72 (44)	15 (40)	48 (59) ^b	42 (34)
Desidratação	29 (33)	7 (35)	19 (49) ^a	20 (27)
Esplenomegalia	67 (63)	9 (45)	38 (73) ^a	41 (51)
Alopecia	67 (41)	17 (46)	45 (55) ^b	42 (34)
Conjuntivite	37 (44) ^a	3 (16)	25 (50)	18 (31)
Úlcera	17 (19)	2 (10)	11 (28) ^a	8 (11)
Erosão	29 (33)	6 (30)	23 (59) ^c	15 (20)
Sistema reprodutor	21 (24)	2 (10)	13 (32) ^a	12 (16)
Análise Laboratorial				
Eritropenia	28 (65)	6 (60)	15 (83) ^a	22 (55)
Leucocitose	14 (33)	4 (40)	10 (56) ^a	9 (22)
Hipoalbuminemia	42 (48)	5 (25)	23 (60) ^a	26 (35)
TGP (Aumento)	1 (2)	1 (9)	2 (10) ^a	0 (0)
Hiperproteinemia	69 (78) ^a	9 (45)	29 (74)	54 (72)
Hiperglobulinemia	44 (100) ^a	9 (82)	19 (100)	39 (95)
Classificação clínica				
Assintomáticos	12 (7,4) ^a	8 (21,6)	3 (34) ^b	19 (15)
Oligossintomáticos	91 (56,2)	19 (51,4)	42 (51)	72 (58)
Polissintomáticos	59 (36,4)	10 (27)	37 (45)	34 (27)

a: p< 0,05; b: p<0,01; c: p< 0,001

6.2 PCR

Nos resultados das análises em relação à positividade no teste PCR não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos positivo e negativo em nenhum dos parâmetros testados com relação às características gerais da amostra.

No que se refere aos sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral, a onicogribose se mostrou mais frequente no grupo de animais com resultado positivo no PCR em comparação ao grupo de animais negativos no PCR ($p=0,029$, teste exato de Fisher), como mostrado na tabela 5. Os demais sinais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A ocorrência de erosão cutânea foi mais frequente no grupo de animais positivos no PCR, contra o grupo de animais negativos ($p=0,021$, teste exato de Fisher).

Tabela 5. Distribuição das frequências dos sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral em relação à positividade no PCR na população de cães semi-domiciliados recolhidos das ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010.

Parâmetro	PCR	
	+ (%)	- (%)
Onicogribose	44 (27) ^a	1 (5)
Erosão	31 (37) ^a	1 (7)

a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$

Com relação às demais análises realizadas levando em consideração o resultado no PCR, não foi observada diferença entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados.

6.3 LST

Em relação às análises realizadas tendo como parâmetro a positividade no LST, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos positivo e negativo em nenhum dos parâmetros testados. Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos demais parâmetros analisados.

Embora quase todos os animais (96%) tenham evidência de infecção por *Leishmania* em pelo menos um dos testes, alguns testes, como PCR e LST podem não refletir a infecção ativa, e LST pode até refletir algum grau de proteção contra a leishmaniose visceral. Por outro lado, a sorologia positiva e cultura esplênica positiva são ambos indicativos de infecção ativa. Por isso, decidimos comparar a associação de desorganização polpa branca entre cães com ELISA e cultura esplênica, positivos e negativos.

6.4 Estrutura esplênica

No que se refere aos resultados da análise em relação à organização da polpa branca esplênica, destaca-se a maior frequência de animais de porte médio ($p=0,027$, teste Qui-quadrado) entre os diferentes grupos (organizado: tipo 1; moderadamente organizado: tipo 2; desorganizado: tipo 3), como mostrado na Tabela 6.

Os resultados da análise dos sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral estão descritos na Tabela 6. A anemia foi mais frequente nos animais de baço desorganizado, com diferença entre os grupos 1 e 3 ($p=0,0098$, teste exato de Fisher) e entre os grupos 2 e 3 ($p=0,0486$, teste exato de Fisher). A linfadenopatia teve maior frequência no grupo 3, com diferença entre os grupos 1 e 3 ($p=0,0027$, teste exato de Fisher). O mesmo resultado é observado no sinal alopecia ($p=0,0092$, teste exato de Fisher) como observado na Tabela 6.

A onicogrifose se mostrou mais frequente no grupo de animais de baço desorganizado, sendo essa diferença entre os grupos 1 e 2 ($p=0,033$, teste exato de Fisher) e entre os grupos 1 e 3 ($p=0,02$, teste exato de Fisher). A dermatite obteve resultado semelhante ao da onicogrifose, com diferença entre os grupos 1 e 2 ($p=0,0252$, teste exato de Fisher) e entre os grupos 1 e 3 ($p=0,0428$, teste exato de Fisher) como mostrado na Tabela 6.

Em relação à presença de alterações nos sistemas reprodutor, digestório, respiratório e locomotor, não foi observada diferença entre os grupos. O mesmo ocorre em relação à presença de alterações cutâneas e aos parâmetros observados no hemograma. Nos resultados das dosagens bioquímicas destaca-se a ocorrência de hiperproteinemia, que foi mais frequente nos animais de baço moderadamente organizado (tipo 2), com diferença entre os grupos 1 e 2 ($p=0,035$, teste exato de Fisher) e entre os grupos 1 e 3 ($p=0,033$, teste exato de Fisher), como mostrado na tabela 6.

Em relação à classificação clínica dos animais, é possível observar na Tabela 6 que os animais classificados como assintomáticos e oligossintomáticos foram mais frequentes no grupo de animais com baço organizado (tipo 1). Os animais classificados como polissintomáticos foram mais frequentes no grupo de animais com baço desorganizado (tipo 3), com diferença entre os grupos 1 e 2 ($p= 0,0074$, teste exato de Fisher) e entre os grupos 1 e 3 ($p= 0,001$, teste exato de Fisher).

Tabela 6. Distribuição das frequências dos sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral em relação à organização da estrutura esplênica na população de cães semi-domiciliados recolhidos das ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010.

	Baço					
	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Porte						
Pequeno	7	(12)	22	(22)	16	(34) ^a
Médio	42	(74)	60	(60)	20	(43)
Grande	8	(14)	18	(18)	11	(23)
Sinais Clínicos						
Anemia	11	(31)	31	(43)	24	(63) ^{b, c}
Linfadenopatia	25	(46)	60	(59)	36	(75) ^d
Alopecia	16	(28)	44	(44)	26	(54) ^e
Onicogrifose	8	(14)	29	(29)	16	(34) ^{f, g}
Dermatite	7	(26)	24	(56)	13	(56) ^{h, i}
Análise Laboratorial						
Hiperproteinemia	17	(57)	45	(78)	20	(80) ^{l, m}
Classificação clínica						
Assintomáticos	10	(17)	11	(11)	1	(2) ^{j, k}
Oligossintomáticos	38	(67)	50	(50)	26	(54)
Polissintomáticos	9	(16)	40	(40)	21	(44)

a: Diferença entre todos os grupos, $p=0,027$; b: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 3, $p=0,0098$; c: Diferença entre os animais de baço tipo 2 e de baço do tipo 3, $p=0,0486$; d: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 3, $p=0,0027$. e: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 3, $p=0,0092$; f: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 2, $p=0,0331$; g: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 3, $p=0,02$; h: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 2, $p=0,0252$; i: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 3, $p=0,0428$. j: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 2, $p=0,0074$. k: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 3, $p=0,001$. l: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 2, $p=0,035$. m: Diferença entre os animais de baço tipo 1 e de baço do tipo 3, $p=0,033$.

6.5 ELISA e estrutura esplênica

Os resultados referentes à análise da amostra em relação à positividade no teste ELISA e à organização da estrutura esplênica estão descritas na Tabela 7. É possível observar um predomínio de animais de porte médio, sendo essa diferença entre os três grupos de animais positivos no ELISA com os baços tipo 1 e 3 ($p= 0,0229$, teste Qui-quadrado). As demais características não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. A distribuição das frequências dos diferentes sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral está descrita na Tabela 7. A conjuntivite se mostrou mais frequente nos grupos positivos e nos grupos com baço desorganizado (diferença entre os animais com ELISA positivo e baços dos tipos 1, 2 e 3. $P= 0,0116$, teste Qui-quadrado).

A análise a frequência de hiperproteinemia revelou uma diferença entre os grupos com ELISA positivo e baços dos tipos 1, 2 e 3 ($p= 0,021$, teste exato de Fisher), como mostrado na Tabela 7. Os resultados da análise das diferentes classes clínicas em relação ao teste ELISA juntamente com a estrutura esplênica estão descritos na tabela 7. Há uma maior frequência de animais assintomáticos nos grupos de animais com ELISA negativo e baços dos tipos 1 e 3. Os animais oligossintomáticos são mais frequentes no grupos de animais com ELISA positivo e baço tipo 1. Os animais polissintomáticos são mais frequentes nos animais com ELISA positivo e baço do tipo 3. Há uma diferença entre os grupos com ELISA positivo e baços tipo 1 e 3 ($p= 0,004$, teste Qui-quadrado).

Tabela 7. Distribuição das características e alterações observadas na população de cães semi-domiciliados recolhidos das ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010, em relação à positividade no teste ELISA juntamente com a organização da estrutura esplênica.

Parâmetro	ELISA Negativo		ELISA Positivo		P
	Baço tipo 1	Baço tipo 3	Baço tipo 1	Baço tipo 3	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Porte					
Pequeno	3 (33)	3 (43)	3 (6)	12 (32)	
Médio	6 (67)	1 (14)	36 (78)	18 (47)	0,0229 ^a
Grande	0 (0)	3 (43)	7 (15)	8 (21)	
Sinais Clínicos					
Conjuntivite	0 (0)	2 (29)	8 (35)	16 (70)	0,0116 ^a
Análise laboratorial					
Hiperproteinemia	2 (40)	3 (100)	15 (62)	16 (76)	0,021 ^a
Classificação clínica					
Assintomático	3 (33)	1 (12)	5 (11)	0 (0)	
Oligossintomático	4 (44)	4 (50)	34 (74)	21 (55)	0,004 ^a
Polissintomático	2 (22)	3 (38)	7 (15)	17 (45)	

a: Diferença entre os animais com ELISA positivo e baços dos tipos 1, 2 e 3.

Os scores clínicos atribuídos à intensidade da conjuntivite ($P < 0,05$), dermatite ($P < 0,05$) e linfadenopatia ($P < 0,01$) foram mais elevados nos animais com ELISA positivo e baço desorganizado do que nos animais com ELISA e negativo baço normal (teste de Kruskal-Wallis). Além disso, os scores clínicos para a alopecia ($P < 0,01$), conjuntivite ($P < 0,05$) e onicogrifose ($P < 0,05$) foram mais elevados nos animais com ELISA positivo e baço desorganizado do que nos animais com ELISA positivo e baço organizado (teste de Kruskal-Wallis, figura 3).

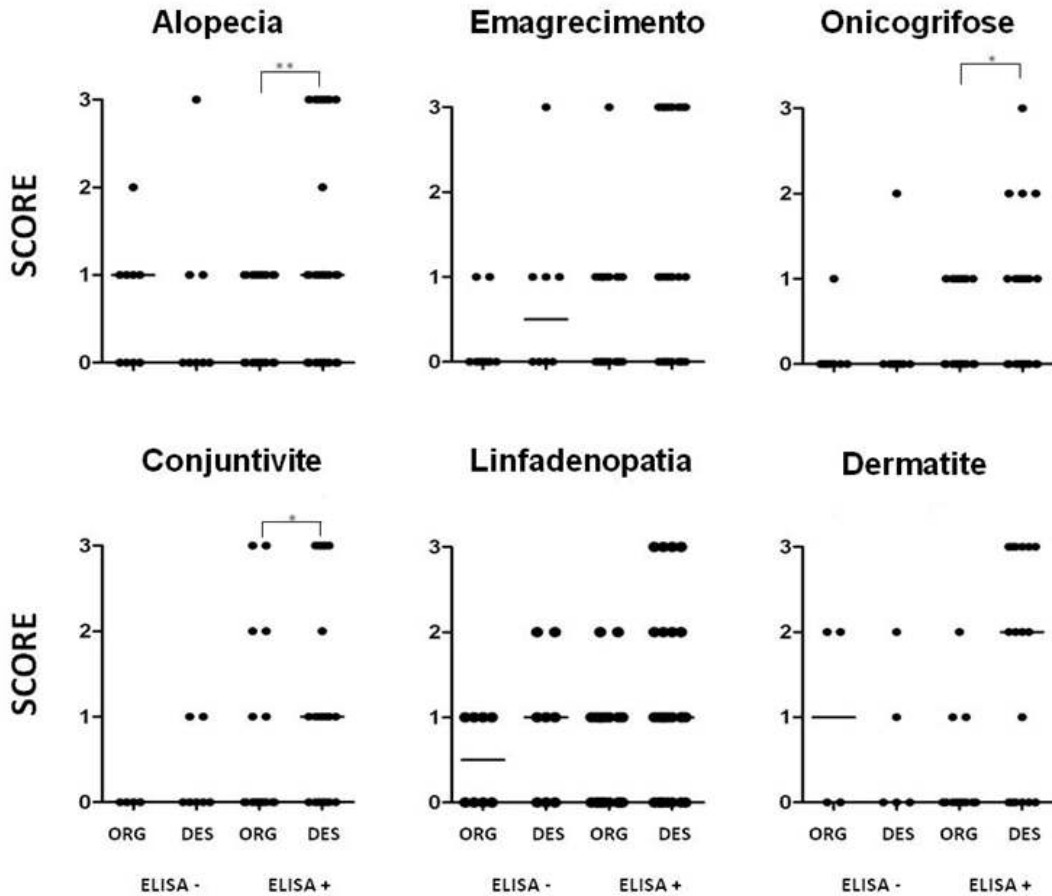


Figura 3. “Score” atribuído à intensidade dos sinais os sinais clínicos em relação à positividade no ELISA e à organização da estrutura esplênica.

O número de sinais clínicos atribuíveis à leishmaniose visceral canina foi maior nos animais com ELISA positivo e baço desorganizado em relação aos animais com ELISA negativo e baço normal (teste Kruskal-Wallis, $p= 0,0016$, figura 4).

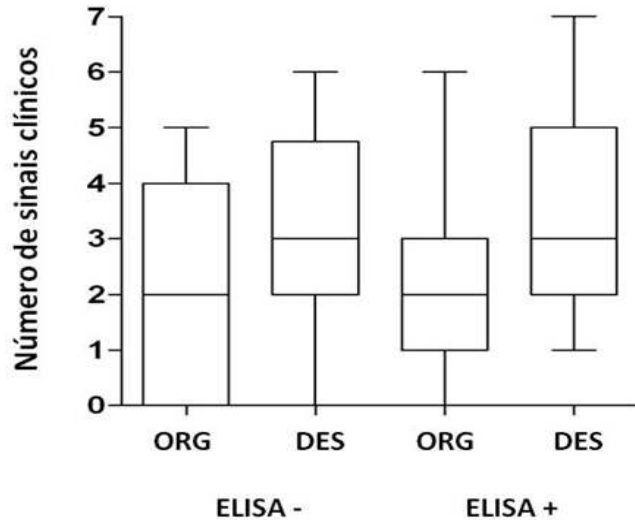


Figura 4. Número de sinais clínicos atribuíveis à leishmaniose visceral canina em relação à positividade no ELISA e à organização da estrutura esplênica

6.6 Cultura e estrutura esplênica

As características gerais da amostra em relação à positividade na cultura esplênica e à organização da estrutura esplênica estão descritas na Tabela 8. É possível observar um predomínio de animais de porte médio, sendo essa diferença entre os três grupos de animais positivos no ELISA com os três diferentes tipos de baço ($p= 0,0484$, teste Qui-quadrado). As demais características não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

A distribuição das frequências dos diferentes sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral está descrita na Tabela 8. O emagrecimento foi mais frequente nos animais com cultura esplênica positiva e baço do tipo 1 em relação aos animais com cultura esplênica negativa e baço do tipo 1 ($p= 0,0078$, teste exato de Fisher) e nos animais com cultura esplênica positiva e baço do tipo 3 em relação aos animais com cultura esplênica negativa e baço do tipo 3 ($p= 0,0084$, teste exato de Fisher). A anemia foi mais frequente nos animais com cultura esplênica positiva e baço tipo 3, com diferença entre os

animais com cultura esplênica positiva e baços dos tipo 1 e 3 ($p= 0,0081$, teste Qui-quadrado). A alopecia foi mais frequente nos animais com cultura esplênica positiva e baço do tipo 3, com diferença em relação aos animais com cultura esplênica negativa e baço do tipo 3 ($p= 0,0005$, teste exato de Fisher) e entre os animais com cultura esplênica positiva e baços dos tipo 1 e 3 ($p= 0,003$, teste Qui-quadrado). O mesmo foi observado com relação à onicogribose, que foi mais frequente nos animais de cultura esplênica positiva com baço tipo 3, com diferença em relação aos animais com cultura esplênica negativa e baço do tipo 3 ($p= 0,0123$, teste exato de Fisher) e entre os animais com cultura esplênica positiva e baços dos tipo 1 e 3 ($p= 0,005$, teste Qui-quadrado). A desidratação foi mais frequente nos animais com cultura esplênica positiva e baço do tipo 3, com diferença em relação aos animais com cultura esplênica negativa e baço do tipo 3 ($p= 0,0168$, teste exato de Fisher). A conjuntivite foi mais frequente nos animais com cultura esplênica positiva e baço do tipo 3, com diferença em relação aos animais com cultura esplênica negativa e baço do tipo 1 ($p= 0,0381$, teste exato de Fisher). O mesmo foi observado com relação à dermatite ($p= 0,0266$, teste exato de Fisher) e à presença de úlceras ($p= 0,0195$, teste exato de Fisher). Em relação às alterações nos sistemas reprodutor, digestório, respiratório e locomotor, não houve diferença na frequência das alterações entre os diferentes grupos.

Os resultados da análise das diferentes classes clínicas em relação à cultura esplênica juntamente com a estrutura esplênica estão descritos na tabela 8. Há uma maior frequência de animais assintomáticos nos grupos de animais com cultura negativa e baços dos tipos 1 e 3. Os animais oligossintomáticos são mais frequentes no grupos de animais com cultura positiva e baço tipo 1. Os animais polissintomáticos são mais frequentes nos animais com cultura positiva e baço do tipo 3. Há uma diferença entre os animais assintomáticos com cultura esplênica negativa com baço tipo 1 e cultura esplênica positiva com baço tipo 1 ($p=0,0001$, teste exato de Fisher) e entre os grupos com cultura negativa e baços tipo 1 e 3 ($p= 0,0002$, teste Qui-quadrado).

Tabela 8. Distribuição das características e alterações observadas na população de cães semi-domiciliados recolhidos das ruas de Jequié (BA) no período entre 2004 e 2010, em relação à positividade na cultura esplênica juntamente com a organização da estrutura esplênica.

Parâmetro	Cultura Negativa		Cultura Positiva		P
	Baço tipo 1		Baço tipo 3		
	N	(%)	N	(%)	
Porte					0,0484 ^a
Pequeno	4	(11)	6	(24)	
Médio	29	(78)	11	(44)	
Grande	4	(11)	8	(32)	
Sinais Clínicos					
Emagrecimento	8	(22)	8	(31)	0,0078 ^b ; 0,0084 ^c
Anemia	9	(39)	10	(53)	0,0081 ^d
Alopecia	10	(27)	8	(31)	0,0005 ^c ; 0,003 ^d
Onicogribose	6	(16)	4	(16)	0,0123 ^c ; 0,005 ^d
Conjuntivite	5	(29)	7	(47)	0,0381 ^f
Dermatite	3	(19)	5	(50)	0,0266 ^f
Desidratação	3	(14)	4	(25)	0,0168 ^c
Úlcera	1	(5)	3	(19)	0,0195 ^f
Classificação clínica					0,0001 ^b
Assintomáticos	9	(53)	1	(4)	0,0002 ^e
Oligossintomático	2	(12)	18	(69)	
Polissintomáticos	6	(35)	7	(27)	

a: Diferença entre todos os grupos. b: Diferença entre cultura negativa com baço 1 e cultura positiva com baço 1. c: Diferença entre cultura negativa com baço 3 e cultura positiva com baço 3. d: Diferença entre os animais com cultura positiva e baços dos tipos 1, 2 e 3. e: Diferença entre os animais com cultura negativa e baços dos tipos 1, 2 e 3. f: Diferença entre cultura negativa com baço 1 e cultura positiva com baço 3.

Além disso, foram atribuídos scores para a intensidade dos sinais os sinais clínicos. Os scores dos sinais alopecia ($P < 0,005$), conjuntivite ($P < 0,05$), dermatite ($P < 0,05$), caquexia ($P < 0,005$), linfadenopatia ($P < 0,05$) e onicogribose ($P < 0,01$) foram mais elevados nos animais com cultura positiva e baço desorganizado do que nos animais com cultura negativa e do baço organizado (teste de Kruskal-Wallis, Figura 5). Os escores clínicos de alopecia

O número de sinais clínicos atribuíveis à leishmaniose visceral canina foi maior nos animais com cultura positiva e baço desorganizado que nos animais dos restantes grupos (teste Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$, Figura 6).

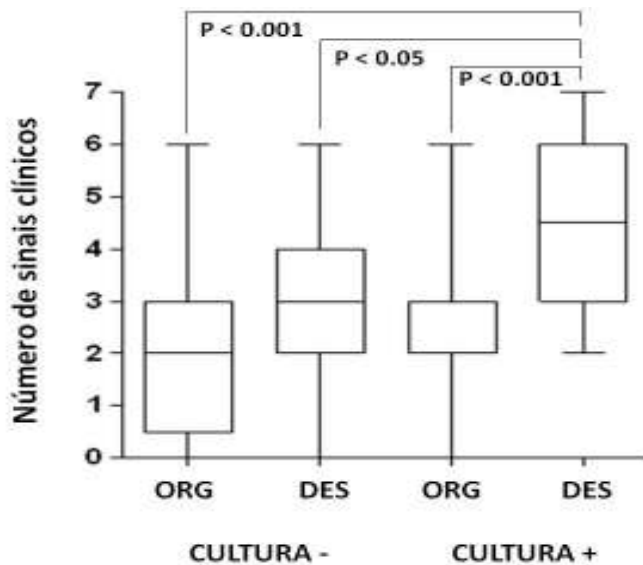


Figura 6. Número de sinais clínicos atribuíveis à leishmaniose visceral canina em relação à positividade na cultura esplênica e à organização da estrutura esplênica.

Entre as análises bioquímicas realizadas apenas os níveis de albumina e creatinina estavam abaixo do normal em uma proporção maior de animais com cultura positiva e baço desorganizado (8/8 animais) do que no grupo de animais com cultura negativa do baço organizado (6/21 animais, o teste exato de Fisher, $P < 0,01$). Entre os parâmetros hematológicos, apenas as contagens de neutrófilos foram acima dos valores normais em uma proporção maior de animais com cultura positiva e baço desorganizado (3/5 animais) do que no grupo de animais com cultura negativa e baço organizado (0 / 9 animais, o teste exato de Fisher, $P = 0,03$). Foram observados valores de proteína C reativa mais elevados nos animais com cultura positiva e baço desorganizado do que no grupo de animais com cultura negativa e baço organizado ($p < 0,001$, teste de exato de Fisher), como observado na Figura 7.

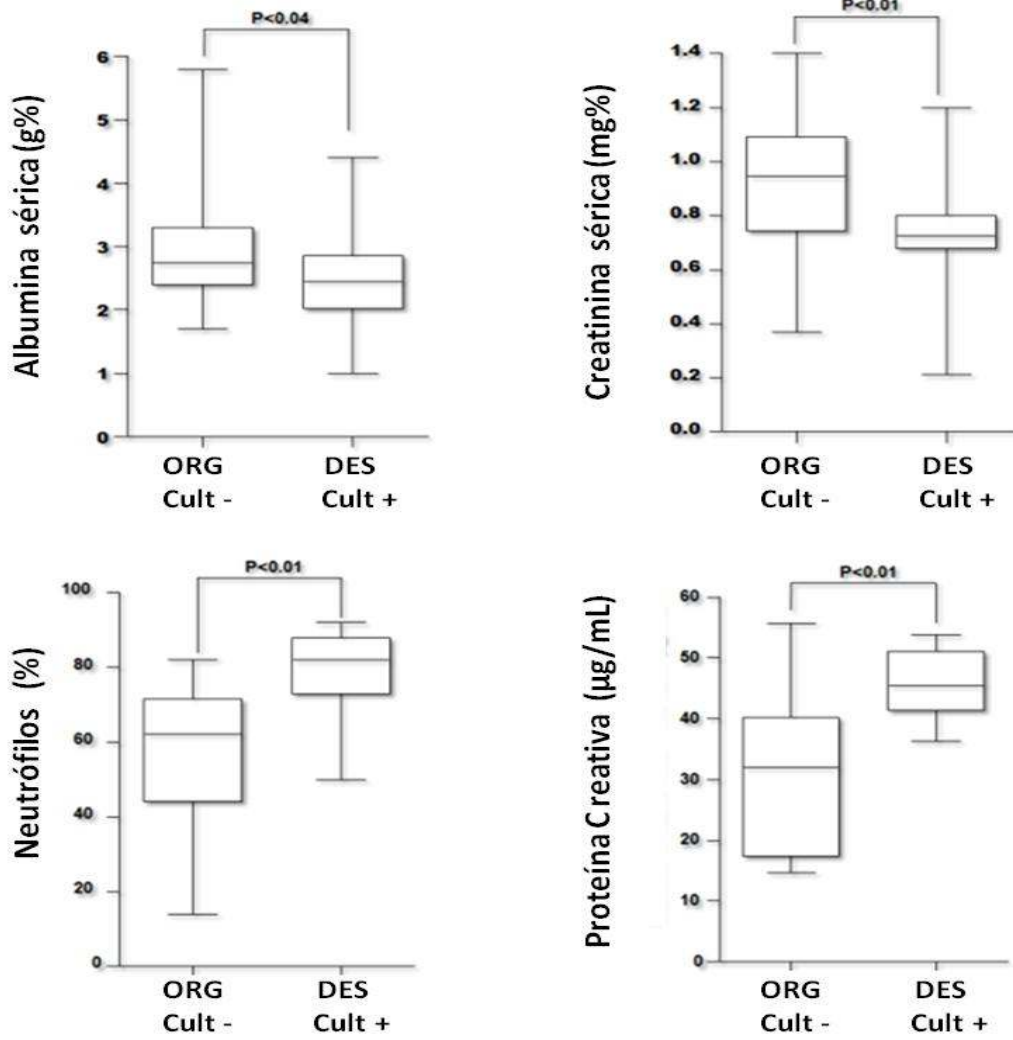


Figura 7. Características bioquímicas e hematológicas em relação à positividade na cultura esplênica e à organização da estrutura esplênica.

6.7 Carga parasitária

Ao realizar a análise da carga parasitária do baço dos animais tendo como parâmetro a positividade no teste ELISA, é possível observar que os animais com resultado positivo no teste ELISA apresentaram maiores cargas parasitárias em relação aos animais com resultado negativo, como mostrado na Figura 8 ($P < 0,01$, teste de Mann Whitney).

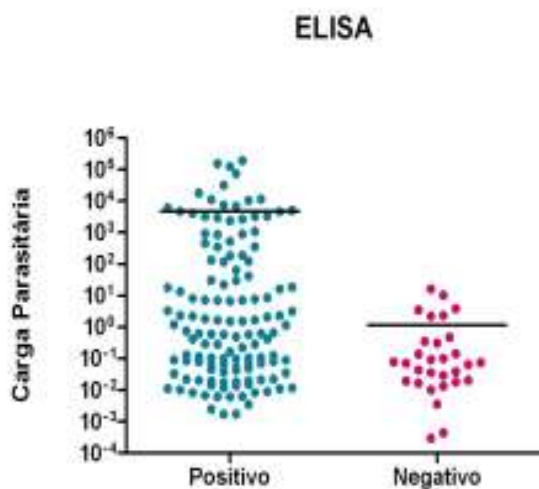


Figura 8. Distribuição da carga parasitária no baço em relação à positividade no teste ELISA.

Em relação à carga parasitária do baço dos animais tendo como parâmetro a positividade na cultura esplênica, os animais com resultado positivo na cultura apresentam maiores cargas parasitárias quando comparados com os animais com resultado negativo, como mostrado na figura 9 ($P < 0,0001$, teste de Mann Whitney).

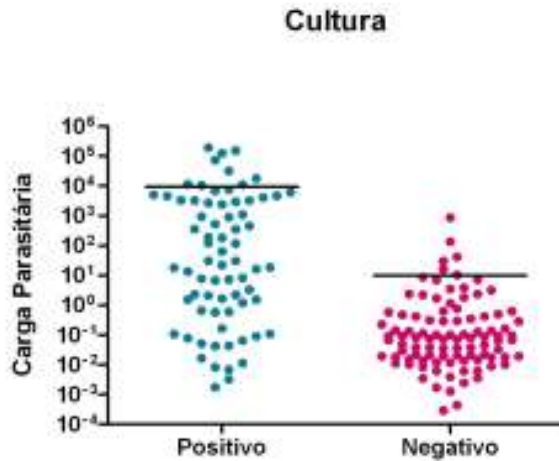


Figura 9. Distribuição da carga parasitária no baço em relação à positividade da cultura esplênica.

As análises da carga parasitária tendo como parâmetro a positividade no LST e a organização da estrutura esplênica não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Já a análise em relação à positividade no ELISA e à organização da estrutura esplênica mostrou que os animais com ELISA positivo e baço organizado apresentam maiores cargas parasitárias quando comparados com os animais com ELISA negativo e baço organizado, como é possível observar na figura 10 ($P < 0,05$, teste de Mann Whitney).

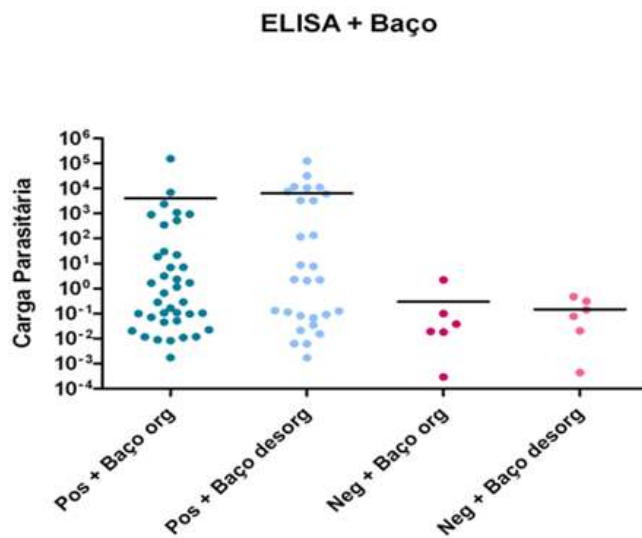


Figura 10. Distribuição da carga parasitária no baço em relação à positividade no ELISA e à organização da estrutura esplênica.

A análise em relação à positividade na cultura esplênica e à organização da estrutura esplênica mostrou que os animais com cultura esplênica positiva e os animais com baço desorganizado apresentavam maiores cargas parasitárias que os animais negativos e animais com baço organizado, com diferenças entre as cargas parasitárias dos grupos positivos e negativos com baço organizado ($P < 0,01$, teste de Mann Whitney), entre os grupos positivos e negativos com baço desorganizado ($P < 0,0001$, teste Mann Whitney), entre os grupos positivo com baço organizado e negativo com baço desorganizado ($P < 0,001$, teste Mann Whitney), e entre os grupos positivo com baço desorganizado e negativo com baço organizado ($P < 0,0001$, teste Mann Whitney), como mostrado na figura 11.

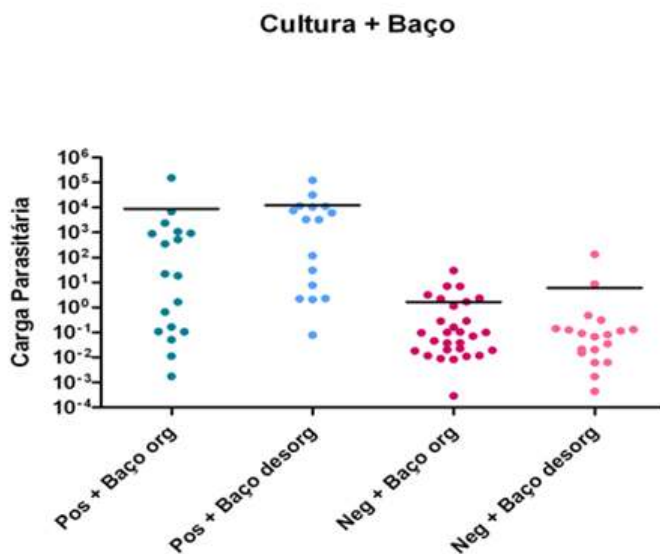


Figura 11. Distribuição da carga parasitária no baço em relação à positividade na cultura esplênica e à organização da estrutura esplênica.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos que animais com desorganização da polpa branca esplênica associada à leishmaniose visceral apresentam maior número de sinais clínicos, como conjuntivite, emagrecimento, anemia, alopecia, onicogribose, dermatite, presença de úlcera na pele, além de hiperproteïnemia, hipoalbuminemia, níveis mais baixos de creatinina sérica, aumento no número de neutrófilos e níveis mais elevados de proteína C reativa. Além disso, Esses animais apresentam maior número e intensidade dos sinais clínicos, sendo assim mais frequentemente polissintomáticos. Esses dados sugerem que os animais com desorganização da polpa branca esplênica associada à leishmaniose visceral apresentam uma forma mais grave da doença, com pior estado nutricional e estado inflamatório sistêmico.

Adicionalmente, confirmamos a associação entre positividade no ELISA e ocorrência de conjuntivite, hiperproteïnemia e hiperglobulinemia, além da associação entre positividade na cultura esplênica e emagrecimento, esplenomegalia, alopecia e presença de úlceras na pele, descritas anteriormente por outros trabalhos (MENDONÇA et al, 1999; KOUTINAS et al, 1999; SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al 1997 ALMEIDA et al, 2005). Confirmamos também a associação entre positividade no PCR e maior frequência de onicogribose e erosão cutânea, observada anteriormente (MENDONÇA et al, 1999; KOUTINAS et al, 1999; SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al 1997; ALMEIDA et al, 2005; KEENAN et al, 1984; BARROUIN-MELO et al, 2006; RAMOS et al, 2012).

Para definir a classificação clínica dos animais, utilizamos como critério a presença dos sinais clínicos considerados indicativos de leishmaniose visceral, como emagrecimento, alopecia, onicogribose, conjuntivite, anemia, linfadenopatia e esplenomegalia, sendo considerado assintomático o animal que não apresentava nenhum sinal clínico, oligossintomático o que apresentava entre um e três sinais clínicos, e polissintomático o que apresentava acima de três sinais clínicos (MANCIANTI et al, 1988; REIS et al, 2006a). Podemos observar que os animais classificados como

polissintomáticos foram mais frequentes nos grupos de animais com resultado positivo na cultura esplênica e no ELISA, resultado semelhante aos obtidos por Almeida e colaboradores (ALMEIDA et al, 2005) e Reis e colaboradores (REIS et al, 2006a), ambos em trabalhos realizados com cães naturalmente infectados provenientes de áreas endêmicas.

É possível observar que quase todos os animais têm evidência de infecção por Leishmania (96%), porém alguns testes, como PCR e LST podem não refletir a infecção ativa, e o LST pode até refletir algum grau de proteção contra a leishmaniose visceral (PINELLI et al., 1994; SOLANO-GALLEGO et al, 2000). Por outro lado, a sorologia positiva e cultura positiva baço são ambos indicativos de infecção ativa. Embora possam refletir a atividade da infecção, a Elisa e a cultura positiva isoladamente não indicam o curso da infecção no cão. Por exemplo, cães com infecção inicial pode ter cultura esplênica e sorologia positivas, mas evoluírem para controle do parasito. Nossa hipótese, porém é a de que a desestruturação do baço estaria associada progressão da leishmaniose visceral, portanto com infecção ativa e quadro clínico mais grave. Sendo assim, decidimos comparar o quadro clínico de cães com ou sem desestruturação do tecido linfóide esplênico com ELISA positiva ou negativa ou com cultura esplênica positiva ou negativa.

Observamos uma maior frequência de conjuntivite, maior frequência de polissintomáticos, maior score de sinais clínicos e maior número de sinais clínicos no grupo de animais com ELISA positivo e baço desorganizado, quando comparado aos outros grupos. O grupo de animais com cultura esplênica positiva apresentou uma maior frequência de emagrecimento, anemia, alopecia, onicogribose, dermatite, presença de úlcera na pele, maior frequência de polissintomáticos, maior score de sinais clínicos e maior número de sinais clínicos quando comparados aos outros grupos. Esses achados são semelhantes aos obtidos por Santana e colaboradores, que observou que animais com desorganização da polpa branca esplênica foi mais frequente nos animais que apresentavam emagrecimento (SANTANA et al, 2008). Silva e colaboradores (SILVA et al, 2012) observaram que animais com

desorganização do baço associada à infecção por *Leishmania* apresentavam mais frequentemente doença grave.

Os animais com cultura esplênica positiva e baço desorganizado também apresentavam alterações laboratoriais. Esses animais apresentavam valores mais altos na contagem de neutrófilos, confirmando os achados de Soares e colaboradores, e Tryphonas e colaboradores (SOARES et al, 2005; TRYPHONAS et al, 1977). Esse achado aponta uma diferença entre a doença canina e a doença humana, na qual é observada a ocorrência de neutropenia (PASTORINO et al, 2002; QUEIROZ et al, 2004, UZAIR et al, 2004). Esses animais também apresentavam valores mais altos na dosagem sérica de proteína C reativa, quando comparados aos outros grupos. Martínez-Subiela e colaboradores (MARTÍNEZ-SUBIELA et al, 2002) observaram valores médios de 65,03µg/mL em cães sintomáticos para leishmaniose visceral, valores médios de 30,8µg/mL para cães assintomáticos e uma média de 2,52µg/mL nos animais utilizados como controle. Embora não tenham avaliado os níveis de proteína C reativa levando em consideração a desorganização do baço, os achados de valores mais altos de proteína C reativa em cães sintomáticos infectados por *Leishmania* corroboram nosso achado, uma vez que os animais com cultura ou ELISA positivos e baço desorganizado também foram os animais com pior status clínico. Essa é, juntamente com a neutrofilia, uma importante evidência de que os animais com desorganização da polpa branca esplênica associada à leishmaniose visceral apresentam uma síndrome inflamatória, pois a proteína C reativa é uma proteína de fase aguda, se apresenta em níveis elevados em situações de inflamação. Além do estado inflamatório, esse grupo também apresentava valores mais baixos de albumina e creatinina sérica, quando comparado com os outros grupos. Tais alterações sugerem que esses animais estavam em pior estado nutricional quando comparados com os outros grupos, provavelmente causado pela leishmaniose visceral em si.

Qual seria a relação entre a infecção por *Leishmania infantum* e a desorganização do tecido linfóide esplênico, e qual seria o impacto dessa alteração no curso da doença? Após a infecção, o indivíduo produz uma

resposta imune, que pode ser Th1 ou Th2, e que vai determinar a resistência ou suscetibilidade à doença. A resposta imune tipo Th1, é exibida por indivíduos que desenvolvem a forma assintomática da LV. Já os indivíduos que desenvolvem a doença tendem a apresentar uma resposta imune do tipo Th2 (GHALIB et al., 1993; PINELLI et al. 1994). Além da infecção por *Leishmania*, os animais podem também desenvolver coinfeções, principalmente virais, que podem contribuir para o agravamento das manifestações clínicas. Por se tratar de animais semi-domiciliados, os cães utilizados no nosso estudo estão expostos a diversos patógenos além da *Leishmania*, que podem resultar em coinfeções, que por sua vez podem contribuir para a desorganização do baço. Estudos em cães mostram que infecção pelo herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1) e pelo vírus da cinomose também causam alterações na polpa branca esplênica (CARVALHO et. al, 2007; DKHIL, 2009; OLIVEIRA et al., 2009b; SONNE et al., 2009).

O baço é um órgão fundamental no contexto da leishmaniose visceral, uma vez que é responsável por grande parte da resposta imune contra diversos patógenos, entre eles a *Leishmania*, mas é também um alvo da infecção, sendo afetado durante seu curso e sofrendo alterações que podem vir a comprometer a sua função. Alterações nos órgãos linfóides associadas à leishmaniose visceral têm sido relatadas em estudos, tanto em humanos (VERESS et al, 1977), quanto em cães (SANTANA et al, 2008; SILVA et al, 2012) e modelos experimentais (ENGWERDA et al, 2002), e como observado em nossos resultados, essa desorganização do baço coincide com os estágios avançados e mais graves da doença. A ausência desse órgão também está associada a uma maior susceptibilidade a disseminação de infecções por bactérias encapsuladas (HANSEN & SINGER, 2001).

A desorganização do baço, causada pela leishmaniose visceral ou por coinfeções, afeta o microambiente do baço, necessário para a ativação de células B e geração de resposta imune humoral aos antígenos, podendo assim comprometer a resposta imune, tanto contra a *Leishmania* quanto contra outros patógenos. Dessa forma, é possível que a alteração da estrutura esplênica esteja relacionada à imunossupressão e a uma resposta ineficiente a

infecções. Isso pode explicar o desenvolvimento das formas mais graves de leishmaniose visceral nesses animais, bem como o surgimento de outras infecções que podem comprometer ainda mais o status clínico do animal.

Em conjunto, nossos resultados mostram que cães com desorganização do tecido linfóide esplênico associado à infecção por *Leishmania infantum* apresentam um maior número e uma maior intensidade de sinais clínicos indicativos de leishmaniose visceral, além de um pior estado nutricional e de uma síndrome inflamatória, o que reflete o desenvolvimento de formas mais graves da doença, quando comparados com os cães sem a desorganização do tecido linfóide esplênico.

8. CONCLUSÕES

1. Cães com desorganização da polpa branca esplênica associada à leishmaniose visceral têm mais sinais clínicos indicativos da doença, como alopecia, conjuntivite, anemia, dermatite, emagrecimento, onicogribose e presença de úlceras na pele.
2. Esses animais apresentam os sinais clínicos da doença em maior intensidade do que os animais sem a desorganização da polpa branca esplênica associada à leishmaniose visceral.
3. Esses animais apresentam também um pior estado nutricional e um pior estado inflamatório do que os animais sem a desorganização da polpa branca esplênica associada à leishmaniose visceral.

9. PERSPECTIVAS

- Publicação do presente trabalho

- Iniciar estudo das alterações hepáticas ocorridas nesses animais, correlacionando às alterações histológicas com:
 - Estado clínico dos animais
 - Perfil imunológico dos animais
 - Desorganização da polpa branca esplênica

10. REFERÊNCIAS

ABREU, C. B. D.; NAVARRO, I. T.; BALARIN, M. R. S.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; MARANA, E. R. M.; TRAPP, S. M.; FUGINAKA, C. A.; PRUDÊNCIO, L. B.; MATOS, M. R.; TSUTSUI, V. S. **Clinical, pathological and serologic aspects of experimental toxoplasmosis in young dogs**. Semina: Ci. Agrárias, v. 22, n. 2, p. 123-130, 2001.

ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E.; ATTA, A. M. **Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with Leishmania chagasi**. Vet Parasitol, v. 127, n. 3-4, p. 227-232, 2005.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. **Canine leishmaniasis**. Adv Parasitol, v. 57, p. 1-88, 2004.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. **[Pathology of the spleen in hepatosplenic schistosomiasis]**. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 7, n. 4, p. 218-227, 1965.

ANDRADE, Z. A.; BINA, J. C. **[The pathology of the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni in its advanced form (study of 232 complete necrosies)]**. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 78, n. 3, p. 285-305, 1983.

ARGILES, J. M.; BUSQUETS, S.; TOLEDO, M.; LOPEZ-SORIANO, F. J. **The role of cytokines in cancer cachexia**. Curr Opin Support Palliat Care, v. 3, n. 4, p. 263-268, 2009.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARO, R. **Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil**. Am J Trop Med Hyg, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

ATO, M.; STAGER, S.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. **Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis**. Nat Immunol, v. 3, n. 12, p. 1185-1191, 2002.

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, v. 12, n. 8, p. 1228-1231, 2000.

BALEEIRO, C. O.; PARANHOS-SILVA, M.; DOS SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, G. G.; NASCIMENTO, E. G.; DE CARVALHO, L. P.; DOS-SANTOS, W. L. **Montenegro's skin reactions and antibodies against different Leishmania species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area.** Vet Parasitol, v. 139, n. 1-3, p. 21-28, 2006.

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, v. 99, n. 2, p. 195-197, 2004.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; DE ANDRADE FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIAO, F. S.; FRANKE, C. R.; PALIS AGUIAR, P. H.; CONRADO DOS-SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. **Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals.** Vet J, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.

BENEDICT, C. A.; DE TREZ, C.; SCHNEIDER, K.; HA, S.; PATTERSON, G.; WARE, C. F. **Specific remodeling of splenic architecture by cytomegalovirus.** PLoS Pathog, v. 2, n. 3, p. e16, 2006.

BERMAN, J. D. **Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years.** Clin Infect Dis, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais,** Roca, São Paulo, 3 ed., p.287, 2008.

BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais.** Roca, São Paulo, 3 ed., p. 513-514, 1996.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. EPIDEMIOLOGICA,** D. D. V. N. Brasília: Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde 2006.

BRASIL. **PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 1.426, DE 11 DE JULHO DE 2008.** Disponível em http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras_normas/porta1426.pdf. 2008.

BRASIL, M. D. S. **II Fórum de discussão sobre o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC).** Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii_forum_tratamento_relatorio_final_07_10_2009.pdf. 2009a.

BRASIL. **Nota de esclarecimento sobre as Vacinas Antileishmaniose Visceral Canina registradas no MAPA.** Disponível em http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/Aniamal/Registros_Atorizacoes/Produtos_veterinarios/Comunicacoes_e_instrucoes_tecnicas/Nota_de_esclarecimento%20sobre_a_vacina_.pdf. 2009b.

BRASIL, M. D. S. **Glossário Leishmaniose.** Ministério da Saúde, v. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561. 2013.

BRASIL. **Leishmaniose Visceral, Descrição da doença.** Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31934. 2013b.

CAMERON, P. U.; JONES, P.; GORNIAC, M.; DUNSTER, K.; PAUL, E.; LEWIN, S.; WOOLLEY, I.; SPELMAN, D. **Splenectomy associated changes in IgM memory B cells in an adult spleen registry cohort.** PLoS One, v. 6, n. 8, p. e23164, 2011.

CARRION, J.; NIETO, A.; IBORRA, S.; INIESTA, V.; SOTO, M.; FOLGUEIRA, C.; ABANADES, D. R.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C. **Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice.** Parasite Immunol, v. 28, n. 5, p. 173-183, 2006.

CARVALHO, L. J.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; PELAJO-MACHADO, M.; LENZI, H. L. **Germinal center architecture disturbance during Plasmodium berghei ANKA infection in CBA mice.** Malar J, v. 6, p. 59, 2007.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. **A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum.** Vet Rec, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CORBEIL, L. B.; WRIGHT-GEORGE, J.; SHIVELY, J. N.; DUNCAN, J. R.; LAMOTTE, G. B.; SCHULTZ, R. D. **Canine visceral leishmaniasis with**

amyloidosis: an immunopathological case study. Clin Immunol Immunopathol, v. 6, n. 2, p. 165-173, 1976.

COSTA, C. H.; WERNECK, G. L.; COSTA, D. L.; HOLANDA, T. A.; AGUIAR, G. B.; CARVALHO, A. S.; CAVALCANTI, J. C.; SANTOS, L. S. **Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study.** Rev Soc Bras Med Trop, v. 43, n. 4, p. 386-392, 2010.

DANTAS-TORRES, F. **The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis.** Vet Parasitol, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F. **Canine leishmaniosis in South America.** Parasit Vectors, v. 2 Suppl 1, p. S1, 2009.

DAVOUDI, N.; TATE, C. A.; WARBURTON, C.; MURRAY, A.; MAHBOUDI, F.; MCMASTER, W. R. **Development of a recombinant Leishmania major strain sensitive to ganciclovir and 5-fluorocytosine for use as a live vaccine challenge in clinical trials.** Vaccine, v. 23, n. 9, p. 1170-1177, 2005.

DE CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; DE AQUINO, L. P.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. **Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings.** Vet Parasitol, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

DE PORTO, A. P.; LAMMERS, A. J.; BENNINK, R. J.; TEN BERGE, I. J.; SPEELMAN, P.; HOEKSTRA, J. B. **Assessment of splenic function.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v. 29, n. 12, p. 1465-1473, 2010.

DE QUEIROZ, N. M.; DA SILVEIRA, R. C.; DE NORONHA, A. C., JR.; OLIVEIRA, T. M.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. **Detection of Leishmania (L.) chagasi in canine skin.** Vet Parasitol, v. 178, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. **Glycoconjugates in Leishmania infectivity.** Biochim Biophys Acta, v. 1455, n. 2-3, p. 341-352, 1999.

DESJEUX, P. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DINIZ, S. A.; SILVA, F. L.; CARVALHO NETA, A. C.; BUENO, R.; GUERRA, R. M.; ABREU-SILVA, A. L.; SANTOS, R. L. **Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas.** J Infect Dev Ctries, v. 2, n. 1, p. 24-33, 2008.

DKHIL, M. A. **Apoptotic changes induced in mice splenic tissue due to malaria infection.** J Microbiol Immunol Infect, v. 42, n. 1, p. 13-18, 2009.

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, v. 123, n. 3-4, p. 251-259, 2008.

DYCE, K.M., SACK, W.O. & WENSING, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 3 ed., p. 410-411. 2004.

EGBE-NWIYI, T. N.; ANTIA, R. E. **The effect of trypanocidal drug treatment on the haematological changes in Trypanosoma brucei brucei infected splenectomised dogs.** Vet Parasitol, v. 50, n. 1-2, p. 23-33, 1993.

EL-ON, J. **Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis.** Isr Med Assoc J, v. 11, n. 10, p. 623-628, 2009.

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, v. 161, n. 2, p. 429-437, 2002.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária – moléstias do cão e do gato.** Manole, São Paulo, 4 ed., v.2, p. 565- 567. 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, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FOSSUM, T. **Cirurgia de pequenos animais**. Roca, São Paulo, 2 ed., p.39-544, 2002.

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, v. 190, n. 3-4, p. 591-594, 2012.

FRANCA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. 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**. Vet Parasitol, v. 111, n. 2-3, p. 161-173, 2003.

GARTNER LP, HIATT JL. **Tratado de histologia em cores**. Elsevier, Rio de Janeiro, 3 ed., p. 301 - 306, 2007.

GAUTAM, S.; KUMAR, R.; MAURYA, R.; NYLEN, S.; ANSARI, N.; RAI, M.; SUNDAR, S.; SACKS, D. **IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis**. J Infect Dis, v. 204, n. 7, p. 1134-1137, 2011.

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. **Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections**. J Clin Invest, v. 92, n. 1, p. 324-329, 1993.

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, v. 121, n. 1-2, p. 23-33, 2008.

GUERRA, J. A.; BARROS, M. L.; FE, N. F.; GUERRA, M. V.; CASTELLON, E.; PAES, M. G.; SHERLOCK, I. A. **[Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Roraima, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1989 to 1993]**. Rev Soc Bras Med Trop, v. 37, n. 4, p. 305-311, 2004.

GUERRA, L. L.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; REIS, A. B.; CORREA-OLIVEIRA, R. **Evaluation of the**

influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. Parasitol Res, v. 104, n. 3, p. 611-622, 2009.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** Elsevier, Rio de Janeiro, 11 ed., p. 179 – 180, 2006.

HANSEN, K.; SINGER, D. B. **Asplenic-hyposplenic overwhelming sepsis: postsplenectomy sepsis revisited.** Pediatr Dev Pathol, v. 4, n. 2, p. 105-121, 2001.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. **Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil.** Trends Parasitol, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U. C., J. **Histologia Básica.** Guanabara-Koogan - Rio de Janeiro, v.10. ed. p. 276 - 280, 2004.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H. K.; JOHNSON, A. J. **Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology.** Vet Pathol, v. 21, n. 1, p. 74-79, 1984.

KEMMING, G.; MESSICK, J. B.; MUELLER, W.; ENDERS, G.; MEISNER, F.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; SCHROPP, A.; WOJTCZYK, C.; PACKERT, K.; MESSMER, K.; THEIN, E. **Can we continue research in splenectomized dogs? Mycoplasma haemocanis: old problem--new insight.** Eur Surg Res, v. 36, n. 4, p. 198-205, 2004.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. **Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996).** J Am Anim Hosp Assoc, v. 35, n. 5, p. 376-383, 1999.

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, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

KUMAR, R.; NYLEN, S. **Immunobiology of visceral leishmaniasis.** Front Immunol, v. 3, p. 251, 2012.

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, v. 115, n. 1-2, p. 135-145, 2007.

LEMESRE, J. L.; HOLZMULLER, P.; GONCALVES, R. B.; BOURDOISEAU, G.; HUGNET, C.; CAVALEYRA, M.; PAPIEROK, G. **Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial**. Vaccine, v. 25, n. 21, p. 4223-4234, 2007.

LEUNG, L. S.; SZAL, G. J.; DRACHMAN, R. H. **Increased susceptibility of splenectomized rats to infection with *Diplococcus pneumoniae***. J Infect Dis, v. 126, n. 5, p. 507-513, 1972.

LIMA, L. V.; CARNEIRO, L. A.; CAMPOS, M. B.; CHAGAS, E. J.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; LAINSON, R.; SILVEIRA, F. T. **Canine visceral leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Amazonian Brazil: comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs**. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 52, n. 5, p. 259-266, 2010.

LOPES, S. T. D. A.; MACIEL, R. M.; FRANCISCATO, C.; EMANUELLI, M. P.; RIVERA, R. S.; MAZZANTI, A.; TEIXEIRA, L. V. **Reticulocytes and hematocrit of dogs before and after partial splenectomy**. Ciência Rural, v. 36, n. 3, p. 1000 - 1003, 2006.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. **Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment**. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.

MARTINEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P. D.; CERON, J. J. **Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis**. Vet Rec, v. 150, n. 8, p. 241-244, 2002.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. **The strange case of *Leishmania chagasi***. Parasitol Today, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MCGAVIN M.D.; ZACHARY J.F. **Pathologic basis of veterinary disease.** Mosby Elsevier, St Louis, Missouri. 5 ed, p. 737 – 742, 2012.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. **Structure and function of the spleen.** Nat Rev Immunol, v. 5, n. 8, p. 606-616, 2005.

MELLES, D. C.; DE MARIE, S. **Prevention of infections in hyposplenic and asplenic patients: an update.** Neth J Med, v. 62, n. 2, p. 45-52, 2004.

MENDONÇA, L.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G.; VASCONCELOS, J. R. D. **Clinical aspects of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs in the city of Teresina, Piauí.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 8, n. 1, p. 23 - 25, 1999.

MICHELIN, A. D. F.; PERRI, S. H. V.; LIMA, V. M. F. D. **Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs.** Annals of Tropical Medicine & Parasitology, v. 105, n. 5, p. 373–383, 2011.

MORENO, J.; ALVAR, J. **Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model.** Trends Parasitol, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway.** Artmed, Porto Alegre, 7 ed, p. 299 - 301, 2010.

MURRAY, H. W.; CARTELLI, D. M. **Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity.** J Clin Invest, v. 72, n. 1, p. 32-44, 1983.

MURRAY, H. W.; FLANDERS, K. C.; DONALDSON, D. D.; SYPEK, J. P.; GOTWALS, P. J.; LIU, J.; MA, X. **Antagonizing deactivating cytokines to enhance host defense and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis.** Infect Immun, v. 73, n. 7, p. 3903-3911, 2005.

MUYOMBWE, A.; OLIVIER, M.; HARVIE, P.; BERGERON, M. G.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. **Protection against *Leishmania* major challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene.** J Infect Dis, v. 177, n. 1, p. 188-195, 1998.

NAGILL, R.; KAUR, S. **Vaccine candidates for leishmaniasis: a review.** Int Immunopharmacol, v. 11, n. 10, p. 1464-1488, 2011.

NICHOLSON, J. P.; WOLMARANS, M. R.; PARK, G. R. **The role of albumin in critical illness.** Br J Anaesth, v. 85, n. 4, p. 599-610, 2000.

NYSTROM, P. O. **The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology.** J Antimicrob Chemother, v. 41 Suppl A, p. 1-7, 1998.

OLIVEIRA, E. C.; PESCADOR, C. A.; SONNE, L.; PAVARINI, S. P.; SANTOS, A. S.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. **Análise imuno-histoquímica de cães naturalmente infectados pelo parvovírus canino¹.** Pesq. Vet. Bras., v. 29, n. 2, p. 131-136, 2009a.

OLIVEIRA, E. C.; SONNEI, L.; JÚNIOR, P. S. B.; TEIXEIRA, E. M.; DEZENGRINI, R.; PAVARINI, S. P.; FLORES, E. F.; DRIEMEIER, D. **Achados clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por herpesvírus canino.** Pesq. Vet. Bras., v. 29, n. 8, p. 637-642, 2009b.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SILVA-ANTUNES, I.; MORGADO ADE, 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, v. 27, n. 27, p. 3505-3512, 2009.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. **Vaccines for canine leishmaniasis.** Front Immunol, v. 3, p. 69, 2012.

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, v. 136, n. 8, p. 823-831, 2009.

PARANHOS-SILVA, M.; OLIVEIRA, G. G.; REIS, E. A.; DE MENEZES, R. M.; FERNANDES, O.; SHERLOCK, I.; GOMES, R. B.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. **A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with Leishmania chagasi in the presence or absence of sand fly saliva.** Vet Parasitol, v. 114, n. 2, p. 97-111, 2003.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. **[Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]**. J Pediatr (Rio J), v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.

PAULO, D. N. S.; SILVA, A. L. D. **The plasma lipids after total and partial splenectomy in dogs**. Rev. Col. Bras. Cir, v. 28, n. 4, p. 264 - 270, 2001.

PEDROSA, C. M.; DA ROCHA, E. M. **[Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil]**. Rev Soc Bras Med Trop, v. 37, n. 4, p. 300-304, 2004.

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, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

QUEIROZ, M. J.; ALVES, J. G.; CORREIA, J. B. **[Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area]**. J Pediatr (Rio J), v. 80, n. 2, p. 141-146, 2004.

RAMOS, R. A.; RAMOS, C. A.; JUSI, M. M.; DE ARAUJO, F. R.; MACHADO, R. Z.; FAUSTINO, M. A.; ALVES, L. C. **Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of Leishmania infantum chagasi in dogs**. Rev Bras Parasitol Vet, v. 21, n. 3, p. 192-195, 2012.

REECE, W.O. **Dukes: Fisiologia dos animais domésticos**. Guanabara Koogan, São Paulo, 12.ed., p. 41 - 42, 2006.

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, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006a.

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, v. 112, n. 3-4, p. 102-116, 2006b.

REY, L. C.; MARTINS, C. V.; RIBEIRO, H. B.; LIMA, A. A. **American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area.** J Pediatr (Rio J), v. 81, n. 1, p. 73-78, 2005.

SANT'ANA, J. A. P.; LIMA, W. G.; OLIVEIRA, M. R.; SIMÕES, L. A.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. **Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, v. 59, n. 5, p. 1137-1144, 2007.

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, v. 30, n. 10, p. 515-524, 2008.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. **Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications.** Vet Dermatol, v. 20, n. 5-6, p. 471-489, 2009.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O.; BRAZIL, R. P. **Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SILVA, F. S. **Pathology and pathogenesis of canine visceral leishmaniasis.** Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas, v. 1, n. 1, p. 20 - 31, 2007.

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, v. 7, n. 1, p. e29103, 2012.

SINGH, O. P.; GIDWANI, K.; KUMAR, R.; NYLEN, S.; JONES, S. L.; BOELAERT, M.; SACKS, D.; SUNDAR, S. **Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood.** Clin Vaccine Immunol, v. 19, n. 6, p. 961-966, 2012.

SLAPPENDEL, R. J. **Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands.** Vet Q, v. 10, n. 1, p. 1-16, 1988.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. Manole, São Paulo, 3.ed., p.1056-1061, 2007.

SMELT, S. C.; ENGWERDA, C. R.; MCCROSSEN, M.; KAYE, P. M. **Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis**. J Immunol, v. 158, n. 8, p. 3813-3821, 1997.

SOARES, M. J. V.; MORAES, J. R. E.; BORGES, V. P.; MIYAZATO, L. G.; MORAES, F. R. **Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs**. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, v. 11, n. 4, p. 579-593, 2005.

SOBOTTA, J. **Atlas de Anatomia Humana Órgãos internos**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 23. ed. v. 1, p. 128 – 129, 2013.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. **Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum-infected dogs**. J Comp Pathol, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; TROTTA, M.; CARLI, E.; CARCY, B.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T. **Babesia canis canis and Babesia canis vogeli clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease**. Vet Parasitol, v. 157, n. 3-4, p. 211-221, 2008.

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 leishmaniosis**. Vet Parasitol, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

SONNE, L.; OLIVEIRA, E. C.; PESCADOR, C. A.; SANTOS, A. S.; PAVARINI, S. P.; CARISSIMI, A. S.; DRIEMEIER, D. **Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina**. Pesq. Vet. Bras., v. 29, n. 2, p. 143-149, 2009.

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

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; JUNGE, K.; BRYCESON, A.; BERMAN, J. **Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis**. N Engl J Med, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, 2002.

TAFURI, W. L.; 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, v. 38, n. 2, p. 81-89, 1996.

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. **Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil**. Vet Parasitol, v. 96, n. 3, p. 203-212, 2001.

TRACEY, K. J. **The inflammatory reflex**. Nature, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.

TROPIA DE ABREU, R.; CARVALHO, M.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; COURA-VITAL, W.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. **Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with leishmania (Leishmania) chagasi**. PLoS One, v. 6, n. 5, p. e18873, 2011.

TRYPHONAS, L.; ZAWIDZKA, Z.; BERNARD, M. A.; JANZEN, E. A. **Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations**. Can J Comp Med, v. 41, n. 1, p. 1-12, 1977.

UZAIR, M.; KHAN, S. J.; MUNIB, S.; RAHEEM, F.; SHAH, S. H. **Visceral leishmaniasis (kala azar): presentation, diagnosis and response to therapy (an experience of ten cases in adults)**. Gomal Journal of Medical Sciences, v. 2, n. 1, p. 9 - 12, 2004.

VARMA, N.; NASEEM, S. **Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar**. Indian J Hematol Blood Transfus, v. 26, n. 3, p. 78-82, 2010.

VERCOSA, B. L.; MELO, M. N.; PUERTO, H. L.; MENDONCA, I. L.; VASCONCELOS, A. C. **Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of Leishmania (Leishmania) chagasi naturally infected dogs: a histomorphometric analysis**. Vet Parasitol, v. 189, n. 2-4, p. 162-170, 2012.

VERESS, B.; OMER, A.; SATIR, A. A.; EL HASSAN, A. M. **Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis**. Immunology, v. 33, n. 5, p. 605-610, 1977.

WHO. Initiative for Vaccine Research (IVR), Parasitic Diseases, Leishmaniasis. Disponível em http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index3.html. 2013.