

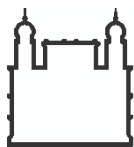
Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**ALTERAÇÕES CLÍNICAS E OCULARES EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum***

CAROLINE MAGALHÃES CUNHA

Rio de Janeiro
Abril de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

CAROLINE MAGALHÃES CUNHA

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E OCULARES EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Dra. Kátia da Silva Calabrese

Dra. Flávia de Oliveira Cardoso

RIO DE JANEIRO

Abril de 2015

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

C972 Cunha, Caroline Magalhães

Alterações clínicas e oculares em cães naturalmente infectados por
Leishmania infantum / Caroline Magalhães Cunha. – Rio de Janeiro,
2015.

xiv, 95 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Medicina Tropical, 2015.

Bibliografia: f. 62-80

1. *Leishmania infantum*. 2. Cão. 3. Leishmaniose visceral canina. 4.
Leishmaniose ocular. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: CAROLINE MAGALHÃES CUNHA

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E OCULARES EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum*

ORIENTADOR: Dra. Kátia da Silva Calabrese

Dra. Flávia de Oliveira Cardoso

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dr. André Roque (revisor)

(Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos, IOC/FIOCRUZ)

Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

(Laboratório de Anatomopatologia, Dept° Patologia, Universidade Estadual do Maranhão)

Dr. Marcelo Pelajo Machado

(Laboratório de Patologia, IOC/FIOCRUZ)

SUPLENTE:

Dr. Renato Porrozzi de Almeida

(Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, IOC/FIOCRUZ)

Dr. Valmir Laurentino Silva

(Laboratório de Imunodiagnóstico, Dept° Ciências Biológicas, ENSP/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 27 de abril de 2015.

A minha mãe Maria Teresa, que mesmo ausente, me acompanhou nesta longa jornada. Sempre que precisei ela era a estrela mais brilhante no céu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Santa Rita de Cássia por me dar forças para superar as dificuldades nesta jornada.

Agradeço à minha mãe Maria Teresa, que mesmo ausente, participou de todas as etapas da minha formação, nem todas as palavras do mundo seriam suficientes para descrever a falta que você me faz.

Agradeço a minha Vozinha Eliete, que muito me ajudou e aconselhou nas noites sem sono e indecisões. Obrigada pelos mimos! Desculpe todas as vezes que esqueci de avisar que sairia tarde da Fiocruz e te deixava AFLITA com a minha ausência.

Agradeço a toda minha família pelo apoio, carinho e muita paciência comigo nos momentos de estresse. Amo vocês!

Agradeço ao meu namorado Gabriel, que me deu forças e amparou nos momentos difíceis desta caminhada.

Aos tios Gilson e Emi, sem vocês meus finais de semana não seriam tão agradáveis. A ajuda de vocês foi muito importante nesta caminhada. Muito obrigada por tudo!

Agradeço a minha orientadora, Dra. Kátia Calabrese, pelo apoio, por estimular sempre a busca pelo conhecimento, e ter muita paciência nos momentos difíceis, e por aturar toda minha ansiedade e nervosismo. Obrigada pelo seu carinho, preocupação e muita paciência comigo!

A minha amiga Flávia Cardoso, que me ajudou em todas as etapas deste trabalho, por fazer de sua casa a minha casa. Muito obrigada por sempre se superar como amiga, orientadora. Obrigada pelos momentos e viagens mais engraçados e felizes.

A Dra. Celeste Freitas que sempre me ajudou em tudo, que sempre me estimula na pesquisa e me deu forças para seguir. Você sempre será minha “mãe de cheirinho”. Muito Obrigada!

A Daiana Hardoim que me ajudou demais na formatação deste trabalho. Me aconselhou e ouviu nos momentos de desespero. Muito obrigada!

Agradeço a Dra. Ana Lúcia Abreu Silva, por me hospedar em sua casa em todas as viagens ao Maranhão e me conceder a honra de trabalhar com seus alunos em seu ambiente de trabalho. Muito obrigada!

A todos os alunos do Laboratório de Anatomopatologia da UEMA: Professor Fábio, Anderson, Ueline, Breno, Joyce, Milena, Iara, Gabriel. A todos que me ajudaram. Muito obrigada!

A todos os meus amigos do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia: Carolina Salles, Fernando Almeida, Henrique Previtalli, Liliane Willi, Luiz Otávio Carvalho, Luiz d'Scoffier, Mariana Rottinni, Thaís, Sandy Pereira, Celso e Tânia Zaverucha por sempre me ajudarem. Obrigada por aturar minhas carências e neuroses, pago em forma de bolo de cenoura!

Agradeço a Vânia Coutrin por me proporcionar o arroz de toucinho mais gostoso do mundo e estar sempre pronta para uma boa conversa de madrugada. Não esquecerei seus conselhos!

Ao Dr. Marcelo Pelajo, por toda a paciência em analisar as lâminas histológicas. E as dúvidas de última hora.

Agradeço ao Leonardo do Laboratório de Imunofarmacologia por me ceder Paraplast para a confecção dos meus blocos.

Aos membros da banca por aceitarem o convite, se prontificando a contribuir para mais um passo da minha formação profissional.

“A tarefa não é ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê” (Arthur Schopenhauer).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

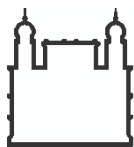
ALTERAÇÕES OCULARES E CLÍNICAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* **RESUMO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Caroline Magalhães Cunha

Os achados clínicos da leishmaniose visceral canina (LVC), assim como os da leishmaniose visceral humana (LVH) são variáveis e inespecíficos. Apesar da LVC se apresentar como uma doença que pode ser fatal e crônica, existem poucos estudos descrevendo as alterações clínicas e histopatológicas destas infecções. Desta forma, evidenciando a necessidade de obtenção de dados que pudessem contribuir nesses estudos, o objetivo deste trabalho foi estudar as alterações clínicas e oculares presentes em 25 cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - Maranhão/Brasil através da realização de avaliação clínica, testes oftalmológicos (Schirmer e colírio fluoresceína) além de dosagens hematológicas e bioquímicas, isolamento e caracterização do parasito em amostras de medula óssea, baço e humor aquoso, além de PCR. Os resultados mostraram que linfadenopatia foi o sintoma mais frequente, seguido de caquexia, alopecia, lesão de pele, onicogribose e hepatoesplenomegalia. As manifestações clínicas oculares observadas com maior frequência foram: presença de algum tipo de secreção e conjuntivite, seguido de blefarite, uveíte e opacidade de córnea. Oito animais foram positivos no teste de Schirmer e sete no colírio de fluoresceína indicando a presença de ceratoconjuntivite seca e úlcera de cornea, respectivamente. As alterações hematológicas mais frequentes foram anemia e trombocitopenia, aumento sérico de proteínas totais e globulina e a diminuição de albumina. A alteração mais frequente observada em todos os animais foi a presença de infiltrado inflamatório do tipo plasmocitário. A análise histopatológica dos olhos dos cães mostrou lesões nas pálpebras, esclera, glândulas e musculatura retrorbital. Tendo a presença do parasito sido evidenciada em 16% dos animais. Estes resultados mostram que as manifestações oftalmológicas estão presentes em animais com LVC e podem ocorrer concomitantemente com outros sinais sistêmicos da doença. É importante considerar a leishmaniose como uma doença sistêmica, a qual afeta diferentes órgãos e sistemas. Sugerimos assim, que em áreas endêmicas, este agravo deve ser incluído como diagnóstico diferencial de cães com lesões oculares ou de etiologia desconhecida.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, cão, leishmaniose visceral canina, leishmaniose ocular.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Clinical and ophthalmological alterations in dogs naturally infected for

Leishmania infantum

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Caroline Magalhães Cunha

Clinical findings of canine visceral leishmaniasis (CVL), as well as of human visceral leishmaniasis (HVL) are variable and nonspecific. Although VC present as a disease that can be fatal and chronic few studies describing the clinical and histopathological changes of these infections. Thus, highlighting the need to obtain data that could contribute to these studies, the objective of this work was to study the clinical and ocular abnormalities present in 25 dogs with visceral leishmaniasis from the locality City Workers, Sao Luis - Maranhao / Brazil by conducting clinical, ophthalmological test (fluorescein drops and Schirmer) and hematological and biochemical measurements, isolation and characterization of the parasite in samples of bone marrow, spleen, and aqueous humor, and PCR. The results showed that lymphadenopathy was the most common symptom, followed by cachexia, alopecia, skin lesion, onychogryphosis, and hepatosplenomegaly. Ocular clinical manifestations observed most frequently were the presence of some type of secretion and conjunctivitis, followed by blepharitis, uveitis and corneal opacity. Eight animals were positive in the Schirmer test and seven in drops of fluorescein indicating the presence of keratoconjunctivitis sicca and cornea ulcer, respectively. The most common hematologic abnormalities were anemia and thrombocytopenia, increased serum total protein and globulin and decreased albumin. The most frequent alteration observed in all animals was the presence of inflammatory infiltrate of plasma cell type. Histopathological analysis dogs eyes showed lesions on the eyelids, sclera, glands and muscles retrorbital. Since the presence of the parasite was observed in 16% of animals. These results show that the ocular manifestations are present in animals with LVC and can occur concurrently with other signs of systemic illness. It is important to consider leishmaniasis as a systemic disease, which affects different organs and systems. We suggest therefore that in endemic areas, this grievance should be included in the differential diagnosis of dogs with eye injuries or of unknown etiology.

Keywords: Leishmania infantum, dog, canine visceral leishmaniasis, ocular leishmaniasis.

ÍNDICE

RESUMO8

ABSTRACT

IX

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	As leishmanioses.....	2
1.2	Histórico da leishmaniose visceral.....	3
1.3	Agente etiológico e taxonomia	3
1.4	Vetor	4
1.5	Ciclo biológico	4
1.6	Epidemiologia e distribuição geográfica	5
1.7	Urbanização da leishmaniose visceral	7
1.8	LV no cão e seu papel como reservatório	8
1.9	Diagnóstico da LVC.....	9
1.10	Medidas de controle das leishmanioses.....	12
1.11	Tratamento da LVC.....	12
1.12	Anatomia e fisiologia do sistema ocular.....	13
1.13	LV e olho.....	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Área de estudo	22
3.2	Animais.....	23
3.3	Triagem dos Animais e critério de inclusão no estudo	23
3.4	Avaliação clínica.....	23
3.5	Teste lacrimal de Schirmer	23
3.6	Teste de Fluoresceína.....	24
3.7	Coleta de sangue	24
3.8	Exames laboratoriais.....	25
3.8.1	Hemograma completo	25
3.8.2	Bioquímica	25
3.9	Coleta de medula óssea (MO).....	25
3.10	Eutanásia	25
3.11	Coleta de humor aquoso e baço	26
3.12	Histopatologia	26

3.12.1	Colorações histológicas.....	27
3.12.1.1	Técnica de Hematoxilina-eosina.....	27
3.13	Isolamento de parasitos	27
3.14	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	28
3.14.1	Extração de DNA.....	28
3.14.2	Amplificação dos Fragmentos	28
3.15	Eletroforese	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Triagem dos animais	32
4.2	Exame Clínico	32
4.3	Teste de Schirmer	35
4.4	Teste de Fluoresceína.....	35
4.5	Hemograma completo	37
4.6	Bioquímica.....	37
4.7	Análise histopatológica.....	40
4.8	Isolamento e caracterização dos parasitos	50
4.9	PCR.....	50
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8	ANEXOS	81

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1.1	Distribuição da leishmaniose visceral no mundo	6
FIGURA 3.1	Mapa da ilha de São Luís	22
FIGURA 3.2	Realização do teste de Schirmer	24
FIGURA 4.1	Sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís – MA	32
TABELA I	Sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís – MA	33
FIGURA 4.2	Frequência de sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA	33
FIGURA 4.3	Sinais clínicos oculares observados em cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís – MA	34
FIGURA 4.4	Teste de Schirmer positivo mostrando produção lacrimal abaixo de 10 mm	35
FIGURA 4.5	Olho de cão infectado com <i>L. Infantum</i> . Observa-se a presença de úlcera de córnea superficial (região corada em verde – seta) após teste de fluoresceína	35
TABELA II	Alterações oculares observadas e avaliação pelos testes de Schirmer e fluoresceína de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.	36
TABELA III	Resultado do Hemograma completo de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.	38
TABELA IV	Resultado dos testes bioquímicos séricos para avaliação das funções renal e hepática de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.	39

FIGURA 4.6	Análise histopatológica da pálpebra de cães com leishmaniose visceral, provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.	42
FIGURA 4.7	Análise histopatológica da córnea de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.	44
FIGURA 4.8	Análise histopatológica da esclera de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA	45
FIGURA 4.9	Análise histopatológica da glândula de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA	46
FIGURA 4.10	Análise histopatológica da musculatura retrorbicular de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA	47
FIGURA 4.11	Análise histopatológica de tecido adiposo e conjuntivo de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA	49
FIGURA 4.12	Visualização em gel de agarose dos produtos da PCR	51
TABELA V	Resultado de todas as análises realizadas em cães com leishmaniose visceral e sua origem provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LCM	Leishmaniose Cutânea-Mucosa
LCD	Leishmaniose Cutânea-Difusa
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DPP	Dual Path Platform
LG	Glândula lacrimal
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
VLCS	Programa de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral
CCS/KCS	Cerato Conjuntivite Seca
TEG	Glândula lacrimal acessória da terceira pálpebra
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ALT	Alaninoaminotransferase
AST	Aspartatoaminotransferase
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
PCR	Reação da polimerase em cadeia
CLIOC	Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz
TBE	Tris/Borato/EDTA

1

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 - As leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças que ocasionam um amplo espectro de manifestações clínicas, as quais dependem principalmente da interação entre a espécie do parasito envolvido e a resposta imunológica do hospedeiro. Possuem grandes diferenças clínicas e epidemiológicas, que envolvem diferentes espécies de parasitos, vetores e hospedeiros reservatórios (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006).

Clinicamente é dividida em: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea-mucosa (LCM), leishmaniose cutânea-difusa (LCD) e leishmaniose visceral (LV) (Gontijo & Carvalho, 2003; Mansueto et al., 2014). A LC produz, exclusivamente lesões na pele, geralmente únicas e no local da picada do vetor. Lesões múltiplas também podem ser observadas e ocorrem por disseminação linfática do parasito e/ou várias picadas do vetor. As lesões cutâneas clássicas possuem bordos elevados, endurecidos e o fundo limpo com presença de tecido de granulação. Em alguns casos, após a cura clínica da LC, pode ocorrer recidiva ou ocorrer outra forma clínica, a leishmaniose cutânea- mucosa (LCM). Nessa forma clínica, há o acometimento da mucosa oronasal, podendo comprometer o septo nasal, palato e, menos frequentemente a traqueia. Desta forma, o risco de deformidades é bastante considerável. A LCD é a forma clínica menos comum e caracteriza-se por lesões nodulares difusas, caracterizadas histologicamente pela presença pronunciada de parasitos e infiltrado inflamatório escasso ou ausente. As lesões são de difícil cicatrização e difícil tratamento. Além disso, o paciente apresenta-se anérgico aos antígenos de *Leishmania* (Gontijo & Carvalho, 2003). Na LV humana podemos observar desde a forma assintomática até formas sintomáticas graves, com sintomatologia semelhante à de outras doenças como: febre amarela, doença de Chagas, malária, brucelose, toxoplasmose, leucemia e esquistossomose, o que dificulta o diagnóstico correto e em tempo hábil para obtenção de cura (Funasa, 2009). O quadro inicial da doença pode seguir dois cursos: o da regressão espontânea e o da progressão da doença (Moreno et al; 2002). A leishmaniose visceral acomete os cães em todo o mundo, exceto na Oceania. Na América do Sul e no Mediterrâneo há uma predominância da leishmaniose visceral canina (LVC), onde a área de ocorrência desta doença está em ampliação (Dantas Torres et al, 2012).

1.2 - Histórico da leishmaniose visceral

Admite-se que a LV foi descrita pela primeira vez na Grécia em 1835, mas só em 1869 recebeu a denominação “Kala-azar”, na Índia. William Leishman identificou o parasito no início do século XX, quando encontrou o protozoário no baço de um soldado indiano, e em 1903 Donovan foi responsável pela primeira publicação sobre o parasito. O primeiro caso humano de leishmaniose visceral, conhecida como calazar, autóctone das Américas foi descrito por Migone, em 1913, em um paciente febril que havia retornado ao Paraguai após trabalhar na construção da estrada de ferro São Paulo-Corumbá no Brasil (Lainson & Shaw, 1992). Entretanto, somente em 1936 foi descrito o primeiro caso de leishmaniose visceral em um indivíduo vivo, residente no Brasil. Evandro Chagas investigando a doença em Sergipe diagnosticou-a e caracterizou um foco de calazar na região (Chagas, 1936).

1.3 - Agente etiológico e taxonomia

Os agentes etiológicos da LV são protozoários parasitos intracelulares obrigatórios e digenéticos (heteroxênicos) que necessitam de um vetor e um hospedeiro vertebrado para completar seu ciclo biológico (Kawashi, 2006; Bates, 2008; Lainson, 2010).

Taxonomicamente são classificados como:

- ✓ Reino Protista (Haekel 1886);
- ✓ Subreino Protozoa (Goldfuss 1817);
- ✓ Filo Sarcomastigophora (Honiberg & Balamuth 1963);
- ✓ Subfilo Mastigophora (Diesing 1866);
- ✓ Classe Zoomastigophora (Calkins 1909);
- ✓ Ordem Kinetoplastida (VickKerman 1976);
- ✓ Subordem Trypanosomatina (Kent 1880);
- ✓ Família Trypanosomatidae (Grobber 1905);
- ✓ Gênero *Leishmania* (Ross 1903);
- ✓ Subgênero *Leishmania* (Saf' Janova 1982)
- ✓ Espécies *Leishmania donovani* (Laveran & Mensil 1903), *L. infantum/chagasi* (Nicole 1908; Cunha & Chagas 1937; Cabrera, 1999).

1.4 – Vetor

Os vetores da LV pertencem a ordem Díptera, família Psychodidae e gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Cerca de 30 espécies são responsáveis pela transmissão da LV no mundo (Desjeux, 1996; Strauss-Ayali & Baneth, 2000). A principal espécie de flebotomíneo envolvida com a transmissão da LV nas Américas é a *Lutzomyia longipalpis* em praticamente todas as áreas de sua ocorrência (Laison & Shaw 1987; Ishkawa et al, 2002; Balbino et al, 2006), embora, na Colômbia e na Venezuela, além desta espécie, foi descrita a participação da *Lutzomyia evansi* (Travi et al, 1990, Feliciangeli et al.,1991). Nos estados de Pernambuco e Mato Grosso do Sul *Lutzomyia migonei* (De Carvalho et al., 2010) e *Lutzomyia cruzi* (De Pita-Pereira et al., 2008) estão envolvidos na transmissão da LV, respectivamente. No Velho mundo, três espécies são responsáveis pela transmissão da LV: *Phlebotomus (Euphlebotomus) argentipe*, encontrado em regiões tropicais do subcontinente indiano, *Phlebotomus (Larroussius) orientalis* e *Phlebotomus (Synphlebotomus sp)* encontrados em regiões bioclimáticas distintas da África Oriental (Ready, 2014).

Os flebotomíneos são insetos pequenos, de aspecto piloso e coloração amarelada. São facilmente reconhecidos pela atitude que adotam quando pousados, suas asas permanecem ligeiramente entreabertas e levantadas, e somente as fêmeas necessitam de sangue para maturação de seus ovos (BRASIL, 2013).

1.5 - Ciclo biológico

Os parasitos do gênero *Leishmania* são digenéticos (heteroxênicos), apresentam em seu ciclo biológico diferenças morfológicas e bioquímicas, necessitando de um vetor e um hospedeiro vertebrado para completá-lo. Apresentam duas formas evolutivas principais: as promastigotas, que medem de 5 a 15 μm , são alongadas, possuem o flagelo livre e são encontradas no tubo digestório do vetor; e as amastigotas, medindo de 3 a 5 μm , possuem formato ovóide, com flagelo restrito a bolsa flagelar e são responsáveis pela infecção no hospedeiro vertebrado, parasitando células do sistema fagocítico mononuclear (Bates, 2008; Kamhawi, 2006; Pace, 2014).

A infecção se inicia quando durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, a fêmea do flebotomíneo ingere macrófagos com formas amastigotas em seu interior. No estômago do inseto vetor, as amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas, com pouca mobilidade, e

posteriormente, diferenciam-se em promastigotas nectomonas, dando início a uma fase de multiplicação logarítmica em que os parasitos não são infectantes. Estas formas migram para o intestino médio onde se aderem às microvilosidades das células existentes neste tecido e sofrem um processo denominado metaciclogênese, que acarreta mudanças bioquímicas na sua estrutura, tornando-as assim, promastigotas metacíclicas. Estas formas migram para a região do cárdia e válvula do estomodeu, onde se aderem ao epitélio da válvula danificando-a. Dessa forma, ao realizar um novo repasto sanguíneo, o vetor regurgita a forma infectante do parasito, devido à degeneração da válvula, e deste modo as promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são introduzidas em um novo hospedeiro mamífero, sendo fagocitadas por células do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado, principalmente macrófagos e células dendríticas. No interior destas células as *Leishmanias* se diferenciam em amastigotas, que se replicam também por divisão binária, dentro do fagolisossomo. A dispersão da infecção ocorre quando a célula, densamente parasitada, se rompe e as amastigotas são fagocitadas por novas células, concluindo, assim, seu ciclo biológico (Bates, 2007; Pace, 2014).

1.6 - Epidemiologia e distribuição geográfica

A LV inicialmente descrita como doença esporádica rural, que acometia o homem e o cão, no ambiente silvestre, foi posteriormente caracterizada como de ocorrência endêmica, com surtos ocasionais nas áreas rurais nordestinas (Deane & Deane, 1962). Um processo de transição epidemiológico ocorreu na década de 70, mudando seu perfil de morbimortalidade, próprio do ambiente rural, para o ambiente urbano. Na década de 80 a leishmaniose tornou-se endêmica e epidêmica em diversas áreas metropolitanas do Brasil (Werneck, 2008). Acredita-se que o fato da doença ter se tornado de notificação obrigatória justifique o relato do aumento do número de casos da doença (Desjeux, 2004).

No mundo, cerca de 350 milhões de pessoas, distribuídas em 98 países vivem em áreas que apresentam alto risco para a infecção por *Leishmania*. Estima-se que 1.200.000 novos casos de LC e 400.000 de LV ocorram a cada ano em todo mundo. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorre em países como: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2012). Dos casos que ocorrem nas Américas, 96,5% (3.118) estão concentrados no Brasil, seguidos do Paraguai, Argentina, Colômbia e México (OPAS, 2014). Tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo, a distribuição dos casos está concentrada nas regiões

periurbanas (Figura 1) (Pigot et al, 2014). Em 2012, a taxa de incidência da LV na região das Américas foi de 48 casos por 100.000 habitantes, variando de 0,6 casos por 100.000 habitantes (Informe Epidemiológico das Américas, 2014).

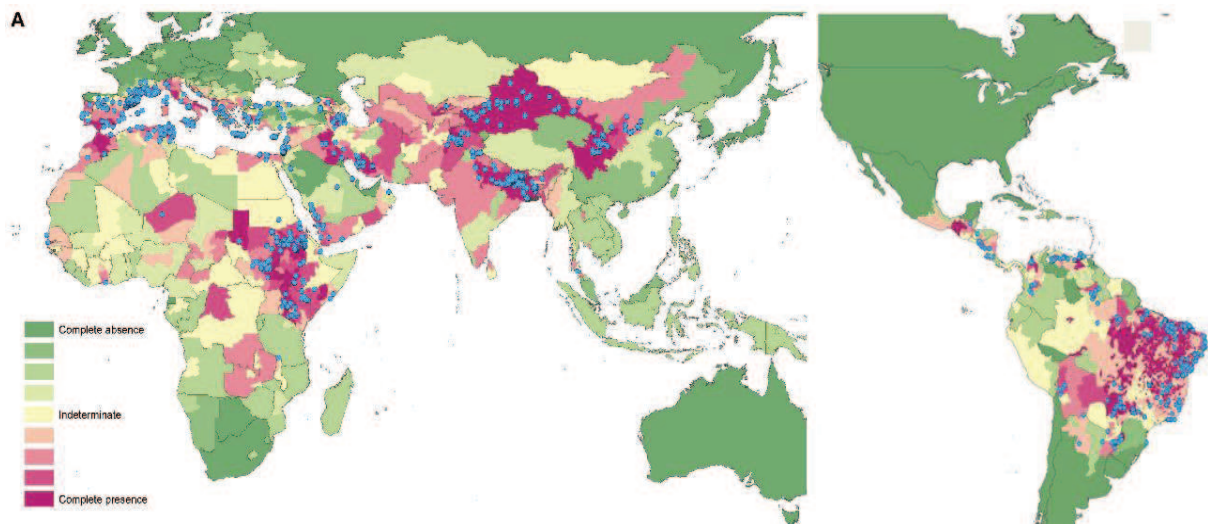


Figura 1.1: Distribuição da Leishmaniose Visceral no Mundo. Fonte: Pigott et al., 2014.

No Brasil, o panorama epidemiológico não deixa dúvidas sobre a expansão geográfica e mudança de perfil da LV. De 1980 a 2008 foram notificados no país mais de 70.000 novos casos, causando mais de 3.800 óbitos. Entre os anos de 2006 e 2008, cerca de 1.200 municípios, pertencentes a 21 unidades federativas, apresentaram transmissão autóctone, e tem demonstrado caráter endêmico-epidêmico, com média anual de 3.630 novos casos (2000 – 2004) (Werneck, 2010).

A expansão da LV nos centros urbanos tem como principal fator a limitação de um programa de controle do reservatório doméstico (Braga et al., 1992). Na América do Sul o número de cães infectados com *Leishmania* chega a milhões, e em regiões como Venezuela e Brasil essa taxa de infecção é muito alta, e pode ser associada a elevado risco de infecção humana, possuindo prevalência de 60% a 80% na população canina. Dentre estes animais a sua maioria não apresenta sinais clínicos aparentes (Baneth & Aroch, 2008).

A ilha de São Luís do Maranhão é o resultado da invasão de terras, que começou em 1960, seguido de desmatamento grave e migração intensa. Esses fatores causaram um desequilíbrio ecológico na região, o qual deslocou os febotomíneos de seu ecótopo natural, resultando em uma epidemia de LV humana em 1993. A partir deste ano em diante, foi dada ênfase a ações preventivas e estudos epidemiológicos na área (Viana et al., 2011). O perfil epidemiológico atual

da leishmaniose no Maranhão é preocupante, pois, além do padrão de periurbanização da doença, que afeta particularmente municípios da ilha de São Luís como: São Luís, São José do Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa; há uma expansão da LV para outras cidades do Estado, que pode ser observado através do número de casos notificados em 50,2% (109 municípios) dos 217 municípios existentes (Caldas, 2004).

1.7 - Urbanização da leishmaniose visceral

A LV, historicamente reconhecida como uma endemia rural invadiu grandes centros urbanos no início da década de 80 atingindo São Luís (MA), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Natal (RN) e, posteriormente Belo Horizonte (MG), Palmas (TO), Campo Grande e Corumbá (MS), Araçatuba (SP) entre outras. Posteriormente, casos autóctones foram detectados no Rio Grande do Sul (Brasil, 2006). Diversos fatores contribuíram para o processo de urbanização da LV tais como transformações socioambientais como o desmatamento, movimentos migratórios, ocupação urbana não planejada, além das condições precárias de saneamento e habitação nas periferias das cidades e a desnutrição. Estas alterações tem provocado uma mudança no perfil epidemiológico da doença reduzido a disponibilidade de animais que servem de fonte de alimentação para o flebótomo, e desta forma, o cão e o homem surgiram como alternativas mais acessíveis na cadeia alimentar do vetor, (Caldas et al., 2001; Barata et al.; 2005, Santos et al., 2010).

Em 1956, Deane chamava atenção para o processo de expansão e urbanização da LV, que ficou mais forte durante os anos 80, quando ocorreu uma grande transformação na distribuição geográfica da doença. Foi nesse momento que a doença aos poucos adquiriu característica periurbana e hoje se caracteriza como uma endemia em ampliação geográfica, sendo observada em áreas urbanas e já instalada definitivamente em muitas cidades como: São Luís (MA), Fortaleza (CE), Aracajú (SE), Rio de Janeiro (RJ), e Belo Horizonte (MG), recentemente Palmas (TO), Cuiabá (MT), Campo Grande (MS) e outras (Funasa 2005).

Na LV, o coeficiente de incidência tem alcançado 20,4 casos/100.000 habitantes em algumas regiões dos estados nordestinos do Piauí, Maranhão e Bahia, onde as taxas de letalidade, chegam a 10% em alguns locais. A incidência da LV sofre aumento significativo em quase todas as regiões geográficas do país, se

tornando uma preocupação constante no papel na saúde pública nacional (Funasa, 2009).

1.8 - Leishmaniose visceral no cão e seu papel como reservatório

Os hospedeiros vertebrados responsáveis por albergar os parasitos responsáveis pelas leishmanioses são animais silvestres, como roedores, gambás, tamanduás, tatus, canídeos, primatas e preguiças; e animais domésticos, como cães, gatos e equinos; e o homem. No ambiente doméstico, o cão é considerado o principal reservatório da *L. infantum* e seu papel com dispersor da infecção em áreas endêmicas para LV é bem conhecido (Gontijo & Melo 2004). A presença de cães infectados com presença de parasitos na pele e, portanto, servindo como transmissores ao inseto vetor é um fator de risco para a ocorrência de casos humanos da doença (BRASIL, 2006). Esse fato é um consenso entre a comunidade científica e as autoridades de saúde responsáveis pela vigilância epidemiológica da doença, o que torna esses animais um dos alvos das estratégias de controle deste agravo (Gontijo & Melo 2004).

Assim como nos casos da doença humana o parasito incriminado com responsável pela infecção canina é a *L. infantum*, no entanto em algumas regiões do país pode ocorrer sobreposição nos ciclos de transmissão de outras espécies como *L. amazonensis* e a *L. braziliensis*, responsáveis por formas cutâneas da doença humana, e os cães tornarem-se coinfectados (Dantas-Torres, 2009). Casos desse tipo foram descritos na região sudeste do Brasil (Madeira et al., 2006a,b) e ainda existe relato de LVC causada por *L. amazonensis* (Tolezano et al., 2007), reforçando a necessidade de identificação das espécies envolvidas na doença canina (Dantas-Torres, 2009).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose progressiva crônica de grande impacto para saúde pública. As características clínicas da LV, tanto no cão como no homem, são variáveis e inespecíficas (Marzochi et al., 1985; Feitosa, 2006). Nos cães, essas características clínicas resultam em portadores sintomáticos e assintomáticos o que torna o diagnóstico clínico extremamente complicado, podendo ser confundida com várias outras enfermidades (Albuquerque et al., 2007), portanto, o diagnóstico laboratorial ou parasitológico é fundamental para a confirmação da infecção. Em áreas cujo padrão socioeconômico é baixo, outros fatores podem estar associados, dificultando o diagnóstico clínico, especialmente as

dermatoses e a desnutrição, mascarando ou modificando o quadro clínico da leishmaniose visceral canina (Monteiro et al., 2005; Alvar et al., 1994).

Animais infectados por *Leishmania* podem permanecer assintomáticos por toda a vida ou desenvolver os sintomas após períodos que variam de três meses a anos (Gontijo & Melo, 2004; Marcondes, 2007). Animais sintomáticos apresentam sinais clínicos da doença, como: perda de peso, de apetite; linfadenopatia local ou generalizada; lesões de pele - alopecia local ou generalizada, descamação, eczemas em focinho e pele, lesões de orelha, focinho, cauda, pelos opacos; lesões oculares - blefarite, ceratoconjuntivite seca bilateral, uveíte, glaucoma; epistaxe, anemia, insuficiência renal, onicogribose, edema de patas e em casos mais graves apresentam neuralgia, poliartrite e lesões ósseas (Galvez et al., 2011).

Estudos realizados em áreas de ocorrência de casos humanos de LV concluíram que as infecções humanas são precedidas de enzootia canina (Oliveira et al., 2000; Calabrese et al. 2010) e o cão incriminado como principal fonte de infecção para os vetores (Brasil, 2006). Alguns fatores como sua distribuição cosmopolita e o papel que ocupa nos grupos sociais (Costa et al., 1999), o intenso parasitismo da pele nesses animais facilitando a contaminação dos flebotomíneos (Barata et al., 2005), as altas taxas de prevalências de infecção e o elevado número de animais assintomáticos, que pode chegar a 80% da população infectada (Marcondes & Rossi, 2013) e apresentam alta competência para estabelecer a infecção em flebotomíneos (Laurenti et al., 2013) colocam o cão como principal elo na cadeia de transmissão da LV.

1.9- Diagnóstico da LVC

O desenvolvimento de sintomas inespecíficos e, muitas vezes, tardios e à grande porcentagem de cães assintomáticos são fatores que contribuem para o subdiagnóstico da LVC. Devido ao importante papel que esses animais assumem, especialmente em áreas endêmicas, o diagnóstico correto e precoce desta zoonose, tanto do ponto de vista epidemiológico quanto individual torna-se extremamente relevante (Barbosa et al, 2010).

O diagnóstico da LVC é difícil devido a grande variedade de manifestações clínicas doença e a inespecificidade dos mesmos, tornando o diagnóstico parasitológico e/ou laboratorial necessários para confirmação. Apesar ainda de constantes discussões, o método parasitológico ainda é considerado o padrão ouro para diagnóstico da infecção (Nogueira et al, 2009). O diagnóstico

parasitológico pode ser feito através de análises citológicas de lâminas de esfregaço ou “imprints” de diferentes tecidos ou ainda por análises histopatológicas e técnicas imunohistoquímica. Esta última apresenta alto grau de contraste entre a célula hospedeira e o parasito, e possui maior eficiência na detecção do agente (Ikeda-Garcia & Marcondes, 2007; Tasca et al., 2009). O exame parasitológico permite a identificação de formas amastigotas nos tecidos examinados, no entanto, é preciso levar em consideração o quadro clínico do animal para eleger o método adequado e tecido a ser examinado. Animais assintomáticos apresentam, muitas vezes, baixa carga parasitária, podendo ocorrer resultados falsos negativos (Farias, 2015). Para avaliação direta, o baço é o órgão que se mostra com maior sensibilidade quando comparado à medula óssea e linfonodo (Sarker et al, 2004). O isolamento de parasitos em meio de cultura também pode ser realizado, permitindo a visualização de formas promastigotas, apesar de apresentar alta especificidade (100%), é pouco utilizado devido a desvantagens como demora nos resultados, possibilidade de contaminação microbiológica, dependência da carga parasitária e dependência de execução (Moreira et al., 2007; Maia & Campino, 2008)

Os principais métodos utilizados para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes em cães são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (EIE) ou “enzima linked immunosorbent” (ELISA) e, mais atualmente, o teste rápido imunocromatográfico TRDPP® produzido por Biomanguinhos (BRASIL, 2013).

Até 2011 a proposta do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) era que o EIE fosse utilizado como triagem de casos e a RIFI como teste confirmatório. Sendo assim, o RIFI era o teste sorológico mais frequentemente utilizado em estudos epidemiológicos. Apesar de ter sensibilidade e especificidade variando entre 60% e 100% (Mohammed et al., 1986; Almeida et al., 2005; da Silva et al, 2013) reatividade cruzada com tripanossomíase, erlichiose, babesiose, dirofilariose e borreliose tem sido relatada (Moreira et al., 2007; Zanette et al, 2014). O EIE também é amplamente utilizado como diagnóstico de LVC e permite a análise simultânea de um grande número de amostras e o uso de diferentes antígenos que podem melhorar a qualidade do ensaio (Tasca et al., 2009). O maior problema em relação aos testes sorológicos, até então empregados, era o longo tempo de espera para a entrega dos resultados, permitindo a permanência de animais soropositivos nas áreas urbanas e a manutenção do ciclo de transmissão ativa (Lira et al., 2006). A partir de 2011, pela necessidade de um

diagnóstico rápido e prático concomitante com alta sensibilidade e especificidade o Ministério da Saúde (MS), baseado em estudos multicêntricos, avaliando as metodologias de RIFI, EIE e o TR DPP® propôs a substituição do protocolo anterior utilizado pelo PVC-LV. O TR DPP® passou a ser utilizado como método de triagem pelas equipes de campo e, dentro dos laboratórios de apoio, o EIE como teste confirmatório dos animais sororreagentes (Funed, 2013).

O TR DDP® é um teste de diagnóstico rápido que utiliza uma tecnologia de imunoenensaio cromatográfico desenvolvido pela empresa norte-americana Chembio e transferida para Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Brasil (<http://www.chembio.com/newtechnologies.html>). O TR DPP® é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza a fusão das proteínas recombinantes K26 e K39 como antígeno. Esta proteína é produto de um gene clonado a partir de *L. infantum* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies do complexo *L. donovani* de *Leishmania*, assim, o teste reagente para anticorpos anti-rK39 é indicativo de presença de infecção visceral (Grimaldi et al., 2012; Coura-Vital et al., 2013; 2014). Estudo recente mostrou bom desempenho do teste com 90,6 % de sensibilidade e especificidade de 95,1%, com capacidade em detectar anticorpos anti-*Leishmania* em cães sintomáticos, 92,1 %, e assintomáticos, 89,4 %. A reação cruzada detectada só foi significativa para babesiose, entretanto, menor do que a apresentada pelos demais testes sorológicos utilizados (Laurenti et al., 2014).

Dentre as técnicas de diagnóstico molecular, o teste comumente realizado é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a identificação do DNA do parasito em questão (Ikeda-Garcia & Marcondes, 2007). Estudos realizados em cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos mostraram sensibilidade de 100, 96 e 95,65% respectivamente, no entanto, este teste exige equipamentos e mão de obra bem treinados, a fim de evitar a contaminação da amostra uma vez que esta técnica é capaz de detectar pequenas quantidades de DNA do parasito (Moreira et al, 2007).

No Brasil, o diagnóstico canino é crítico, especialmente porque a eliminação de cães soropositivos é uma das medidas adotada pelo PVC-LV para controlar a propagação da LV humana e canina. Vale a pena ressaltar que sorologia reflete exposição do animal ao agente etiológico e não significa transmissibilidade ou presença de doença, assim como animais não reagentes podem estar infectados.

1.10 - Medidas de controle das leishmanioses

O programa de controle das leishmanioses no Brasil está centrado, basicamente, na identificação e eliminação do reservatório canino, eliminação do vetor, diagnóstico e tratamento adequado dos casos registrados. Entretanto, devido à falta de evidências de que as medidas empregadas reduzam a incidência da doença humana no país, o Ministério da Saúde, em 2003, adotou uma metodologia que se baseia em uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco, com utilização de informações relativas aos casos humanos, prevalência canina e aspectos ambientais e de ocupação. Um maior conhecimento científico sobre o papel específico de cada elemento da cadeia de transmissão (agente etiológico, inseto transmissor, homem e reservatórios silvestres e domésticos), representa um dos maiores desafios para o aprimoramento das estratégias de controle, visando quebrar os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão do parasito. As medidas de controle usualmente empregadas não têm apresentado efetividade suficiente para redução da prevalência, ainda que importantes avanços tenham sido alcançados na redução da letalidade (Gontijo & Melo, 2004).

Com o objetivo de reduzir a mortalidade, o Ministério da Saúde criou o Programa de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral (VLCSP). Essas diretrizes também incluem o diagnóstico precoce e tratamento de casos humanos, controle de vetores, a triagem sorológica e a eutanásia de cães infectados, e medidas de educação para a saúde. De acordo com o VLCSP, todos os casos suspeitos de VL devem ser confirmados e comunicados às autoridades sanitárias e registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (Coura-Vital et al., 2014).

1.11 - Tratamento da leishmaniose visceral canina

Atualmente existe uma grande discussão sobre o tratamento dos cães com LV. Segundo a recomendação do Ministério da Saúde, juntamente com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) baseado na Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008, é proibido o tratamento da LVC com produtos de uso humano ou que não sejam registrados no MAPA, o que tem gerado grande polêmica entre o meio veterinário e os proprietários de cães positivos.

No entanto, poucos estudos são realizados em relação ao acompanhamento do animal antes, durante e após o tratamento, porém, estes

estudos indicaram que no tratamento para leishmaniose canina, mesmo com a utilização de regimes combinados ou com drogas únicas, ocorre alto índice de recidiva, não atingindo a cura parasitológica, e a remissão dos sinais clínicos pode ser observada durante o tratamento ou meses após (Travi, 2014).

Na Europa o tratamento canino é amplamente utilizado e a base terapêutica consiste no uso de antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio (Frezard et al; 2009). O tratamento com antimoniato de meglumine, como monoterapia, com a dose de 50 a 150mg/kg pela via subcutânea ou intramuscular durante 3 a 4 semanas demonstrou resultado foi promissor, atingindo a cura clínica dos pacientes, porém, foi observada a persistência do parasito no baço, medula óssea, fígado e linfa, havendo recidivas em 70 a 100% dos casos, após um ano de tratamento. O tratamento com Alopurinol demonstra vantagens como: baixo custo e facilidade de administração, tornando-se uma droga bem aceita pelos veterinários e proprietários, no entanto, não é incomum que os donos abandonem o tratamento. É utilizada nas doses de 15 a 30mg/kg/dia, durante 4 a 12 meses, e mesmo após o termino do protocolo é comum observar recidivas. A associação destas drogas também é usada na clínica, mostrando inicial remissão da sintomatologia, porém, a eliminação do parasito não ocorre (Travi, 2014).

Devido a ocorrência de recidivas e a persistência do parasito, o ministério da Saúde e autoridades de saúde pública estão receosos que o uso prolongado e indiscriminado dos compostos antimoniais possam selecionar cepas resistentes do parasito, justificando sua proibição aqui no Brasil (WHO, 2010).

1.12 - Anatomia e fisiologia do sistema ocular

O globo ocular está localizado dentro de uma caixa óssea protetora, denominada órbita, protegido pelas pálpebras. É composto por: câmara escura, camada de células receptoras sensoriais; sistema de lentes para focalização da imagem e um sistema de células para iniciar o processamento de estímulos e enviá-los para o córtex cerebral. Em sua conformação possui três túnicas, que são dispostas concentricamente: camada externa – formada pela esclera ou esclerótica e pela córnea; camada média ou túnica vascular- coróide, corpo ciliar e íris; e a camada interna ou retina (que se comunica com o cérebro por meio do nervo óptico). Além desses envoltórios, o olho possui uma estrutura transparente biconvexa que é mantida em posição pelo ligamento circular (cristalino ou lente); a zônula ciliar, que se insere no corpo ciliar e está posicionada na camada média

juntamente com a íris (expansão pigmentada e opaca), a qual se posiciona em frente ao cristalino, recobrando-o em parte (Tedesco, 2003).

O olho é dividido em três compartimentos: câmara anterior - delimitada entre a íris e a córnea; câmara posterior - delimitada entre a íris e o cristalino; e o espaço vítreo - localizado atrás do cristalino e circundado pela retina. As câmaras anterior e posterior possuem um líquido rico em proteínas, o humor aquoso, e o espaço vítreo possui no seu interior o corpo vítreo (substância viscosa e gelatinosa) (Turner, 2010). Também fazendo parte do globo ocular, mas localizados fora dele, encontram-se o aparelho lacrimal e as pálpebras.

A lente do olho, o cristalino, esta em contato com a superfície posterior da íris e coberta por uma cápsula avascular nutrida pelo humor aquoso e vítreo. A manutenção da pressão intraocular depende de um balanço entre produção e drenagem deste. O humor aquoso é produzido pelas células do epitélio do corpo ciliar, e é drenado através de processos de secreção ativa e de ultrafiltração passiva, fluindo através da pupila para a câmara anterior. É drenado para fora do bulbo do olho, através do ângulo iridocorneal, e já neste local passa por ligamentos pectinados e para malha trabecular uveal, e absorvido pelos vasos do plexo venoso e veias de drenagem da esclera. Existe outra via de drenagem, menos comum, a via uveoescleral, onde o humor aquoso é drenado pelas células intersticiais do corpo ciliar para o espaço supracoroidal e os vasos da esclera e da coroide (Turner, 2010).

A córnea é a porção anterior, transparente e avascular da região externa do olho que em associação com a esclera, origina a túnica fibrosa do olho. É composta por cinco camadas: epitélio corneano anterior, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet, e epitélio posterior ou endotélio. O epitélio corneano anterior possui de 4 a 6 camadas celulares, é do tipo estratificado pavimentoso não queratinizado e representa aproximadamente 10% da espessura total da córnea, apresentando alta capacidade regenerativa e diversas terminações nervosas livres; produz sua própria membrana basal e as células aderem-se a ela e entre si por meio de interdigitações das membranas celulares e hemidesmossomos. A membrana de Bowman, localizada abaixo do epitélio corneano anterior, é homogênea e relativamente espessa composta por finas fibras de colágenos e proteoglicanas organizadas em todas as direções, conferindo-a alta resistência. O estroma é a porção que ocupa maior espaço (90% da espessura corneal), sendo composto por ceratócitos que produzem colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas

da matriz extracelular. A membrana de Descemet é formada por uma camada acelular e elástica que está localizada entre o estroma e o endotélio. O endotélio da córnea é pouco resistente e formado por uma única camada celular mais delgada. Apesar de ser pequeno, este se mostra essencial para o normal funcionamento da córnea (Muccioli et al., 2006; Turner, 2010). As funções do epitélio da córnea são: funcionar como barreira física de organismos patogênicos, barreira lipofílica para absorção de substâncias e contribuir para a manutenção do privilégio imune do olho (Dubielzig et al., 2010). A superfície corneal é banhada pelo filme lacrimal pré-ocular.

O sistema nasolacrimal é formado por um componente secretório (filme lacrimal pré-ocular) e um componente excretório (sistema de drenagem nasolacrimal). A secreção do filme lacrimal é produzida pelas glândulas lacrimais e da terceira pálpebra, as glândulas tarsais (ou Meibômio) e as células caliciformes. Toda essa secreção flui por um sistema de drenagem formado por pontos, canalículos e o ducto nasolacrimal. (Turner, 2010).

A glândula lacrimal é a responsável pela maior parte da produção do componente aquoso do filme lacrimal pré-corneal no olho canino, e a glândula nictante produzindo aproximadamente de um quarto a um terço da quantidade total. Essa camada aquosa atua na proteção e nutrição da córnea, além de facilitar o movimento do globo ocular (Turner, 2010). Estas secreções também contribuem para a imunidade da superfície ocular, e o comprometimento destas glândulas pode levar a alterações na homeostasia lacrimal e, conseqüentemente, a diminuição da produção lacrimal, ocasionando o aparecimento de oftalmopatias como a ceratoconjuntivite seca, por exemplo (Terakado et al., 2015).

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma deficiência da porção aquosa da lágrima, conhecida popularmente como “olho seco”. A maioria das causas são imunomediadas, porém, também é observada em casos de doenças neurológicas ou intoxicações por fármacos. A CCS é uma condição inflamatória da superfície ocular causada por uma redução no componente aquoso do filme lacrimal.. Para avaliar a presença de CCS, utiliza-se o teste lacrimal de Schirmer, que pode ser interpretado como positivo com uma leitura inferior a 10 mm em um minuto (Williams, 2008).

1.13 - Leishmaniose visceral (LV) e olho

Os sinais clínicos associados a LV são altamente variáveis e dependem de diversos mecanismos, que estão associados à quantidade de parasito inoculado e a resposta imunológica do hospedeiro (Peña et al., 2008). Na LV as manifestações

oculares são frequentemente descritas e acompanhadas de sinais clínicos sistêmicos e raramente identificadas isoladamente (Ciaramella et al., 1997; Oliveira-Neto et al., 2000.;Peña et al. 2008).

As alterações anatomopatológicas identificadas em animais naturalmente infectados por *L. infantum* podem acometer vários órgãos, pois a doença é sistêmica, com um período de incubação variável e prolongado e com sinais clínicos comuns a outras doenças. No entanto, os mecanismos patológicos da LVC e a morfologia das lesões nos diferentes órgãos estão na dependência da resposta imunológica do hospedeiro, associada à sua amplitude e à evolução da doença (Peña et al., 2008). Assim, logo após a infecção pelo vetor e fagocitose e diferenciação dos parasitos os macrófagos parasitados são drenados por via linfática para linfonodos regionais e disseminados para outros órgãos (Luvizotto, 2006). Sendo assim, o envolvimento de vários órgãos, inclusive os olhos e seus anexos durante a infecção é comum (McCornell et al.,1970; Giles et al., 1975; Molleda et al.,1993; Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999).

As manifestações oftalmológicas na LVC podem determinar desde discretas alterações nos anexos oculares, a envolvimento completo do bulbo, provocando perda da função visual. Embora possam ocorrer concomitantemente com outros sinais sistêmicos da doença, as lesões oculares algumas vezes constituem a primeira ou a única alteração aparente representando a principal queixa dos proprietários (Roze, 1986a; Peña et al., 2000; Fulgêncio et al., 2004; Fulgêncio, 2006).

A prevalência de lesões oculares em cães com leishmaniose foi descrita em alguns estudos, e varia de 16 e 80% (Slappendel, 1988; Peña et al., 2000). As alterações oftalmológicas mais frequentes associadas são blefarite (3,8%), ceratoconjuntivite (2,8%) (Molleda et al., 1993; Ciaramella et al., 1997) e uveíte anterior (42,8) (Peña et al, 2000). Os primeiros estudos iniciaram-se em 1913 com a descrição de ocorrência de ceratoconjuntivite em dois cães experimentalmente infectados com *Leishmania*. No mesmo ano o autor e colaboradores foram os primeiros a estudar as características histológicas desta alteração e associá-la a presença de amastigotas no estroma (Lemaire et al., 1913). Posteriormente, outros autores diagnosticaram a mesma alteração (Donatien e Lestoquard, 1935; Nattan-Larrier e Guimard, 1935; Leitão, 1946; Deane e Deane, 1955; Slappendel 1988; Molleda et al. 1993; Ciaramella et al. 1997; Koutinas et al 1999; Peña et al. 2000; Fulgêncio et al., 2004) além de blefarites (Ho et al., 1947 Koutinas et al., 1999; Peña

et al. 2000; Fulgêncio et al., 2004) e uveíte (Slappendel 1988; Molleda et al. 1993; Ciaramella et al. 1997; Koutinas et al. 1999; Peña et al. 2000; Fulgêncio et al. 2004) durante o curso da LVC em cães naturalmente infectados. Outras alterações oftálmicas como panoftalmite (Slappendel, 1988; Ciaramella et al; 1997); coriorretinite, ceratite e atrofia de retina e nervo óptico (Molleda et al. 1993); celulite orbital e glaucoma (Peña et al, 2000); alopecia periocular (Peña et al. 2000; Fulgêncio et al., 2004); descolamento de retina (Fulgêncio, 2006); endoftalmite (McConnell et al., 1970), cegueira (Kumar et al, 1993), dentre outras, vêm sendo descritas, menos frequentemente, em associação a LVC.

Dois mecanismos patológicos principais têm sido descritos como causadores de lesões oculares e não oculares, tais como: inflamação granulomatosa local e formação de complexos imunológicos que se depositam nos tecidos (Peña et al., 2008). Entretanto, Roze (1986) propôs três teorias que poderiam esclarecer a deficiência da produção lacrimal em cães infectados com LV. A primeira delas seria pela destruição do ácino e a presença de infiltrado inflamatório em glândula lacrimal, a segunda ocasionada pela obstrução dos ductos secretórios pela presença de infiltrado inflamatório e a terceira a pela reduzida secreção seguido de hipoestesia de córnea.

Os estudos histopatológicos mostraram a presença de amastigotas no estroma do órgão (Lemaire et al., 1913); terceira pálpebra, córnea, limbo, corpo ciliar e íris (Molleda et al. 1993; Nicolau & Perard, 1936); pálpebra, esclera, córnea, íris, corpo ciliar e coróide (Giles et al., 1975); segmentos da conjuntiva e em nódulos periféricos da córnea (Peña et al., 2000) e nas glândulas da terceira pálpebra e do meibômio (Naranjo et al., 2005). Além disso, alguns autores já descreveram o isolamento de parasitos da esclera (Falchetti & Faure-Brac, 1932); lágrima de animais infectados (Faure-Brac, 1933; Nattan-Larrier & Grimard, 1935); conjuntiva palpebral, humor aquoso e humor vítreo (McConnell et al., 1970). As manifestações oculares e perioculares na LVC embora sejam mais comuns em concomitância com outros sinais sistêmicos da doença, muitas vezes, podem constituir a primeira alteração aparente da doença (Fulgêncio et al., 2004). Tais manifestações foram responsáveis pela ida do animal ao médico veterinário de 3,5% a 14,0% dos cães diagnosticados com LV (Koutinas et al., 1999 e Peña et al., 2000). Em estudos com cães naturalmente infectados, Molleda et al. (1993) observaram que 96,7% dos cães apresentaram lesões oculares as quais foram atribuídas a LVC. Posteriormente Peña et al. (2000) constataram que 24.4% dos animais diagnosticados com

leishmaniose canina entre 1993 e 1998 apresentavam lesões oculares ou perioculares e 15.2% dos casos apresentavam apenas lesões oculares, sem sinais sistêmicos de LV aparentes.

Considerando a alta frequência com que as alterações oftálmicas associadas à LV afetam os cães, o estudo das alterações oftalmológicas presentes nestes animais é importante para o esclarecimento dos mecanismos patológicos envolvidos na infecção. Apesar dessa alta frequência, os trabalhos são pontuais e se restringem, na maioria das vezes, a relatos de casos. Estudos mais aprofundados caracterizando e mostrando a extensão das lesões nestes órgãos se fazem necessários para melhor descrição da variedade e singularidade das oftalmopatias associadas à LVC. Além disso, este estudo poderia auxiliar na melhoria do diagnóstico, facilitando a detecção precoce das lesões oculares nos cães, o que auxilia na melhor compreensão da doença humana, já que, além de terem o mesmo agente etiológico, ambas apresentam alterações semelhantes, proporcionando assim um tratamento adequado.

2

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Descrever a sintomatologia clínica e oftalmológica, assim como as alterações histopatológicas oculares presentes em cães com leishmaniose visceral (LV), provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar o diagnóstico dos cães utilizados no estudo através da observação do parasito (em esfregaço de medula óssea e/ou isolamento) e/ou positividade em dois testes sorológicos: teste rápido para leishmaniose visceral canina (DPP® BioManguinhos, RJ) e ELISA;
- Avaliar os cães clinicamente e descrever a presença de sinais característicos de LV;
- Isolar e caracterizar a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção, através das punções de medula óssea, baço e humor aquoso dos animais estudados;
- Detectar a presença de DNA de *Leishmania* sp. nas amostras de baço dos animais em que não for possível o isolamento do parasito em qualquer das amostras puncionadas (baço, medula óssea e humor aquoso) ou sua visualização em esfregaço de medula óssea.
- Avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas presentes nos cães com LV;
- Verificar a produção lacrimal nos cães estudados através do teste de Schirmer;
- Avaliar a presença de úlcera córnea através da utilização do colírio de fluoresceína;
- Analisar as alterações histopatológicas presentes nos olhos dos cães estudados;

3

MATERIAL E
MÉTODOS

3 - Material e Métodos

3.1 - Área de estudo

O presente estudo foi realizado no município de São Luís, localizado na região norte do Estado do Maranhão. O município possui 1.014.837 habitantes (IBGE, 2010). Ocupa uma área de 834,785 Km² e está localizado no Nordeste do Brasil, nas coordenadas geográficas, latitude 2°35'37"S, longitude 44°12'0"W, estando à 24 metros acima do nível do mar. Possui clima do tipo tropical, quente e úmido. A temperatura mínima na maior parte do ano fica entre 21 e 27 graus e a máxima geralmente fica entre 27 e 34 graus (UFMA, 2011). Apresenta dois períodos distintos: um chuvoso, de janeiro a julho, e outro seco, de agosto a dezembro. A média pluviométrica é de 2290 mm por ano e umidade relativa do ar de 65%, com máxima de 80% no período chuvoso (INMET, 2014). O município divide-se em sete distritos sanitários: Itaqui-Bacanga, Centro, Tirirical, Vila Esperança, Cohab, Bequimão e Coroadinho (FONTES: IBGE e SEPLAN/MA, 1984). A área de estudo escolhida foi a localidade Cidade Operária, pertencente ao distrito Tirirical. É uma área urbanizada, sem proximidade com a mata, sem histórico de criação de animais de produção no domicílio e com poucos relatos de animais silvestres observados nas suas imediações.

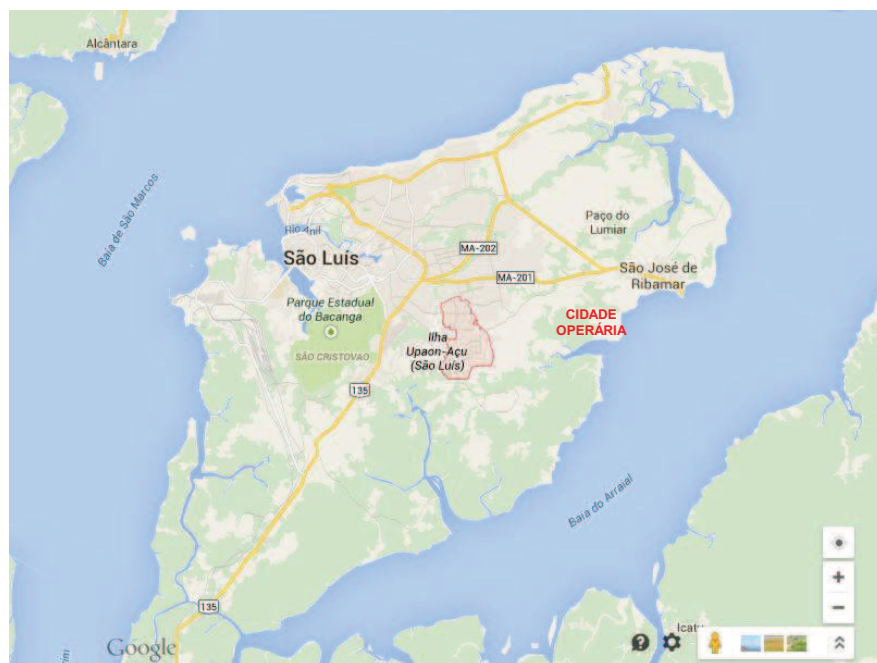


Figura 3.1 – Mapa da ilha de São Luís (Fonte: Google maps, acessado em: 12 de março de 2015).

3.2 - Animais

O presente estudo utilizou 25 cães domiciliados ou errantes, sem raça definida, de ambos os sexos (14 fêmeas e 11 machos), com idade igual ou superior a seis meses. Estes animais eram provenientes da localidade Cidade Operária (Distrito Tirirical) - São Luís, MA e foram recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses por apresentarem positividade nos testes sorológicos para leishmaniose visceral canina de acordo com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2006). O projeto está licenciado pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) sob nº 037/2010. Para os animais que possuíam proprietários, foram repassados informações sobre a doença e os procedimentos adotados pelo Ministério da Saúde, quanto à eutanásia dos cães. Quando o proprietário estava de acordo, o mesmo assinava um termo de doação do animal para o estudo (Anexo 1).

3.3 - Triagem dos Animais e critério de inclusão no estudo

A triagem dos animais foi realizada de acordo com as normas estabelecidas para o diagnóstico de LVC segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2006). Os animais incluídos no estudo apresentaram positividade em dois testes sorológicos (teste rápido para leishmaniose visceral canina (DPP® BioManguinhos, RJ) e o ELISA) e/ou positividade em um teste parasitológico (esfregaço de medula óssea). Todos os testes foram realizados no Laboratório de Anatomopatologia da UEMA, segundo instruções do fabricante, exceto esfregaço de medula.

3.4 - Avaliação clínica

Os animais incluídos no estudo foram avaliados clinicamente por técnicas semiológicas de inspeção e palpação para observação de sintomas clínicos compatíveis com LVC como alopecia, caquexia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, lesões de pele e onicogribose. A ficha de avaliação utilizada consta no anexo 2.

3.5 - Teste lacrimal de Schirmer (TLS)

O teste de Schirmer é um método semiquantitativo para mensuração da produção de lágrimas, o que permite a avaliação da presença de ceratoconjuntivite seca em cães. O teste envolve a colocação da parte arredondada de uma fita de

papel filtro comercialmente disponível (5 por 35 mm), no fundo-de-saco da pálpebra inferior mais ou menos a um terço de distância do canto lateral. Mais de 10 mm de umidade no papel filtro em 5 minutos é considerado normal (Figura 3.2). Ambos os olhos normalmente secretam a mesma quantidade de lágrimas. Realiza-se o teste medindo-se a produção basal reflexa sem anestesia tópica. O teste é realizado antes de manipulações excessivas das pálpebras ou dos anexos e sem a instilação de soluções para não haver alteração nos resultados.(Turner, 2010)



Figura 3.2 - Realização do teste de Schirmer.

3.6 - Teste de Fluoresceína

O teste da fluoresceína foi utilizado para avaliar a presença de úlcera de córnea nos animais. Este teste consiste em instilar uma gota do colírio Fluoresceína em cada olho do animal e, através de privação luminosa e com auxílio de luz artificial, determinar a presença ou não de ulceração de córnea, através da ocorrência de coloração em verde.

3.7 - Coleta de sangue

Após os exames clínicos, os animais foram contidos e submetidos à coleta de sangue periférico para realização de análises hematológicas e bioquímicas. Após garroteamento do membro e assepsia do local, foi realizada a punção da veia cefálica e coletados cerca de 5mL de sangue com seringa e agulha (25 x 7mm) estéreis e descartáveis.

3.8 - Exames laboratoriais

3.8.1 - Hemograma completo

Para a realização do hemograma completo, cerca de 2mL do sangue coletado foi armazenado em tubos com EDTA e encaminhado imediatamente ao laboratório de análises clínicas da UEMA para análise.

3.8.2 - Bioquímica

Para a realização dos testes bioquímicos, o sangue foi armazenado em tubos sem anticoagulante e com gel separador, para posterior obtenção de soro. Após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 min para a separação do soro, e armazenados a -20°C até a realização das dosagens. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório Clínico Veterinário Flávia Uchôa para a dosagem de uréia, creatinina, alaninoaminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), proteínas totais e frações.

3.9 - Coleta de medula óssea (MO)

Os animais foram anestesiados com a administração de uma solução contendo Cloridrato de Ketamina (0,2 a 0,3ml/kg) e cloridrato de xilazina (0,1 a 0,15ml/kg) por via intramuscular. Após 7 a 15 minutos, verificando-se a diminuição das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), bem como a ausência de sinais como: reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e então foi realizada a tricotomia e assepsia do local de coleta. Posteriormente foi realizada punção aspirativa da medula óssea, preferencialmente no osso esterno, utilizando-se agulha de 40 x 1,2 mm acoplada à seringa de 20 mL, ambas descartáveis e estéreis. A amostra obtida foi acondicionada em tubos com meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicolle) + Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino para isolamento do parasito e posterior caracterização da espécie de *Leishmania* implicada na infecção.

3.10 - Eutanásia

Após a coleta de medula óssea, foi realizada a administração de Tiopental 2,5% na dose de 3-15 mg/kg, por via endovenosa. Após a verificação da diminuição dos parâmetros respiratórios e cardíacos, ausência de reflexo palpebral e rotação de globo ocular, caracterizando plano anestésico profundo, foi administrado cloreto de

potássio na dose de 100 mg/kg por via endovenosa observando parada cardiorrespiratória e constatando a morte do animal (Viana, 2014).

3.11 - Coleta de humor aquoso e baço

Posteriormente à eutanásia, foi realizada a coleta de pálpebra, globo ocular, humor aquoso e baço dos animais.

A punção do humor aquoso foi realizada na câmara anterior de cada um dos olhos utilizando-se agulha de 0,45 x 13 mm acoplada à seringa de 3 mL, ambas descartáveis e estéreis.

Para obtenção de material do baço, o mesmo foi puncionado com seringa de 3 ml e agulha 45 x 13 mm, estéreis.

As amostras obtidas das punções de baço e humor aquoso foram acondicionadas em tubos com meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicolle) + Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino, para isolamento do parasito e posterior caracterização da espécie de *Leishmania* implicada na infecção.

Para realização da técnica de PCR, a coleta de um pequeno fragmento do baço (3 a 5 mm) foi realizada utilizando bisturi estéril. Posteriormente, os fragmentos foram acondicionados em microtubos plásticos estéreis de 2 mL, RNase e DNase free, contendo 1,5 mL de RNAlater® Solution (Applied Biosystems) e acondicionados a - 20°C até o momento da realização da técnica.

3.12 - Histopatologia

Os globos oculares e fragmentos de tecidos anexos ao bulbo foram retirados com o auxílio de um bisturi e acondicionados em potes plásticos contendo formalina a 10% para fixação dos mesmos. Após um período mínimo de 24 horas, o globo ocular foi seccionado, realizando-se um corte paralelo ao nervo óptico, dividindo o mesmo em duas metades para facilitar a fixação total de todas as camadas oculares. Posteriormente, foram acondicionados em cassetes apropriados e pós-fixados em formalina 10%. Após 24 horas, foram então submetidos a uma bateria de desidratação, clarificação e impregnação em parafina utilizando-se um processador automático de tecidos (Leica® – TP 1020). A bateria é composta pela seguinte sequência: álcool etílico 80 °GL (1 hora), 95 °GL (1 hora), 100 °GL (1 hora), 100 °GL (1 hora e 30 minutos), 100 °GL (1 hora e 30 minutos) e 100 °GL (2 horas), diafanizados manualmente em Clorofórmio Absoluto em três banhos, com 1 hora, 1

hora e 30 minutos e 1 hora e 30 minutos respectivamente. Embebidos em três banhos de parafina, com 1 hora, 2 horas e 2 horas cada, a uma temperatura de 56 a 60°C. Em seguida todo o material foi incluído em parafina utilizando-se uma unidade modular de inclusão (Micron – AP280) e cortado em micrótomo automático (Micron - HM 360).

Cortes com 5 µm de espessura foram corados por hematoxilina-eosina e montados em Entellen (Merck), examinados e fotografados em microscópio óptico (marca Zeiss, modelo Axioplan 2, equipado com equipamento fotomicrográfico Axiophot 2).

3.12.1- Colorações histológicas

3.12.1.1. Técnica de Hematoxilina-eosina

Esta técnica foi empregada para estudar a variação morfológica dos tecidos, onde os núcleos celulares são evidenciados pela coloração por hematoxilina e o citoplasma pela eosina.

Os cortes foram hidratados em decrescentes concentrações de etanol (100, 90, 80, 70 °GL) e água destilada e então corados durante 7 minutos com hematoxilina de Harris pré-filtrada, preparada previamente. Após a coloração, os cortes foram lavados, azurecidos em água corrente, diferenciados em álcool-ácido, novamente lavados em água corrente e corados por 2 minutos em solução alcoólica de eosina. Finalmente, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90, 100 °GL), diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merck).

3.13 - Isolamento de parasitos

O isolamento e caracterização dos parasitos foram realizados em amostras de humor aquoso, medula óssea e baço.

Os tubos contendo as amostras foram encaminhados ao Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia/IOC – FIOCRUZ, incubados a temperatura de 26 a 28 °C e examinados semanalmente. As culturas positivas foram encaminhadas ao Laboratório de Referência Nacional para tipagem de *Leishmania* (CLIOC) do Instituto Oswaldo Cruz para caracterização da espécie de *Leishmania* pela técnica de eletroforese de enzimas.

3.14 - Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada como contraprova dos resultados negativos nas amostras em que não foi possível o isolamento do parasito no baço, medula e humor aquoso e/ou visualização do mesmo em esfregaço de medula óssea.

3.14.1 - Extração de DNA

Os fragmentos de baço, armazenados a - 20 °C, tiveram seu DNA genômico extraído (Sambrook & Russell, 2001) através da maceração dos mesmos, com posterior adição de 500 µL do tampão de lise, acrescido de 5 µL de proteinase K a 2 mg/mL e incubados “overnight” em estufa a 56°C (Thermostat 5320 – Eppendorf®). Após este período, foi adicionado a cada microtubo 500µL de fenol e a mistura então foi homogeneizada em Vortex (Phoenix – A56) e centrifugada a 18.410 g durante 15 minutos a 4 °C (Jouan rotor AB 2.14). Os sobrenadantes foram recuperados e transferidos para novos microtubos e então foi acrescentado 500 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (v/v). Após agitação durante 30 segundos, por inversão, e nova centrifugação a 18.410 g por 15 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram, novamente, recuperados e transferidos para novos tubos. Nesta próxima etapa, 1 mL de etanol absoluto foi acrescentado ao conteúdo de cada tubo e, a seguir, agitado durante 30 segundos por inversão e novamente centrifugado a 18.410 g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos deixados à temperatura ambiente até a total evaporação do etanol. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em 100 µL de água ultra pura, livre de DNA e armazenado a - 20 °C até o momento da quantificação do DNA genômico, a qual foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000 – ThermoScientific).

3.14.2 - Amplificação dos Fragmentos

A amplificação do gene GAPDH de cão (Forward: 5' - TCA ACG GAT TTG GCC GTA TTG G - 3' e Reverse: 5'- TGA AGG GGT CAT TGA TGG CG - 3') tem como produto um fragmento de 90 pares de base (Reis et al, 2013) que foi utilizado como controle interno da reação e para a avaliação da viabilidade do DNA genômico, após o processo de extração. As condições da reação foram padronizadas, conforme demonstrado no quadro abaixo:

SOLUÇÃO	CONCENTRAÇÃO	VOLUME
Tampão	10 X [100mM de Tris-HCl pH8,3 em 500mM de KCl]	2,5µL
MgCl ₂	50 mM	2µL
dNTP	10mM	0,5µL
Primer Reverse	5pmol/µL	2,5µL
Primer forward	5pmol/µL	2,5µL
Taq DNA polymerase	5U/µL	0,2µL
DNA	20ng	1µL
Água		q.s.p.25µL

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (GeneAmp® 9600 PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA) e o perfil térmico utilizado consta no quadro abaixo:

TEMPERATURA °C	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95	10 min	1
95	30 seg	40
60	1 min	
72	30 seg	
72	5 min	1
4	∞	

A PCR para evidenciar a presença de DNA do parasito foi realizada empregando o primer minicirculo de *Leishmania* (Forward 5'- CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT - 3' e Reverse 5'- GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA - 3') que amplifica um fragmento de 120 pares de bases (Prina et al, 2007). As condições da PCR estão expressas no quadro abaixo:

SOLUÇÃO	CONCENTRAÇÃO	VOLUME
Tampão	10 X [100mM de Tris-HCl pH8,3 contendo 500mM de KCl]	2,5µL
MgCl ₂	50 mM	2µL
dNTP	10 mM	0,5µL
Primer Reverse	10 pmoles/µL	1µL
Primer Forward	10 pmoles/µL	1µL
Taq DNA polimerase	5U/µL	0,2µL
DNA	20ng/µL	5µL
Água		q.s.p. 25µL

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (GeneAmp® 9600 PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA) e o perfil térmico utilizado consta no quadro abaixo:

TEMPERATURA °C	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95	5 min	1
95	30 seg	35
54	45 seg	
72	30 seg	
72	10 min	1
4	∞	

3.15 – Eletroforese

Os produtos das amplificações foram evidenciados em gel de agarose a 2%, corado com GelRed™ (Biotium) e carregados com tampão de amostra [6x]. Como condutor de corrente elétrica foi utilizado o tampão TBE [1x] e voltagem de 110V.

4

RESULTADOS

4 - Resultados

4.1 - Triagem dos animais

Dos 25 animais incluídos no presente estudo, 24 (96%) foram sororreagentes pelo DPP® e 25 (100%) pelo ELISA. Somente um animal (4%) teve resultado negativo no teste DPP, entretanto, este se mostrou positivo no exame parasitológico realizado no esfregaço de medula óssea sendo, portanto, incluído neste estudo.

4.2 - Exame Clínico

Cem por cento dos animais examinados foram classificados como sintomáticos por meio de avaliação clínica (Figura 4.1). Todos apresentaram dois ou mais sinais clínicos característicos da leishmaniose visceral canina, conforme demonstrado na tabela I. O sintoma que apresentou maior frequência foi linfadenopatia, acometendo 100% dos animais, seguido de caquexia (96%), alopecia (76%), lesão de pele (72%), onicogribose (60%) e hepatoesplenomegalia (44%), respectivamente. A frequência da associação entre os demais sintomas está representada na Figura 4.2.



Figura 4.1 – Sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís – MA. A - Alopecia; B e F- Lesão de pele; C e D - Apatia; E- Caquexia e G – Onicogrifose.

Tabela I - Sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.

Sinais clínicos	Nº e (%) de cães apresentando sinais clínicos (n=25)
Linfoadenopatia	25 (100%)
Caquexia	24 (96%)
Alopecia	19 (76%)
Lesões cutâneas	18 (72%)
Onicogrifose	15 (60%)
Hepatoesplenomegalia	11 (44%)

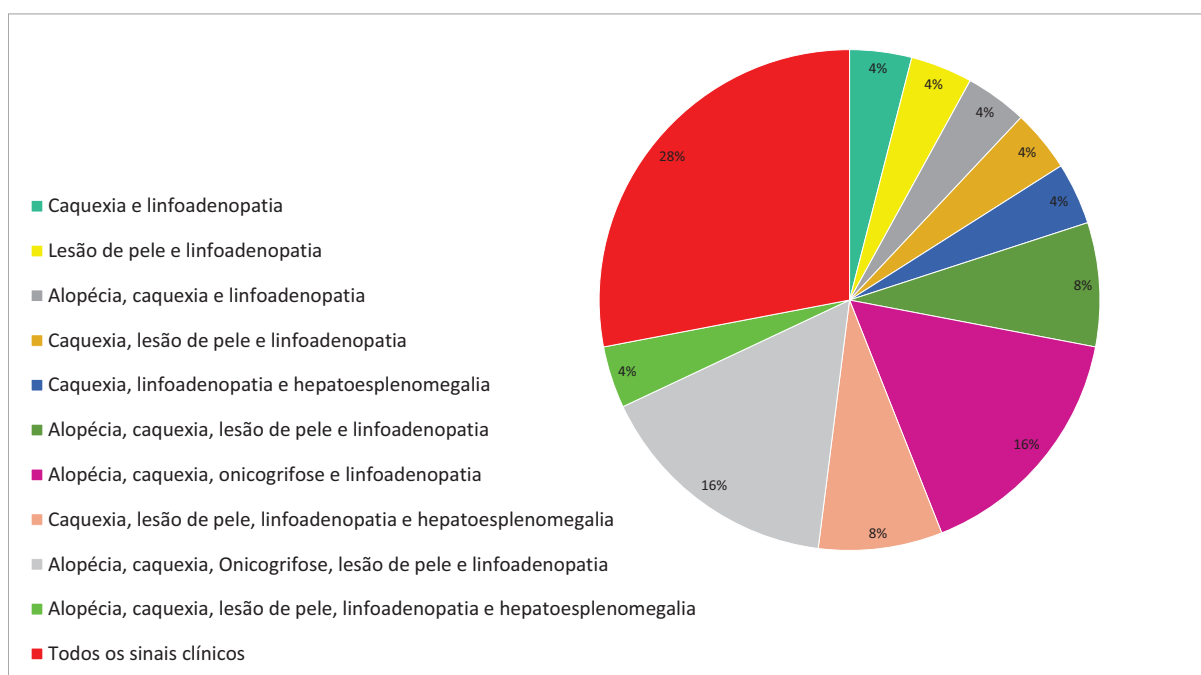


Figura 4.2 – Frequência de sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.

Em anexo encontra-se a tabela com os sinais clínicos observados em cada animal incluído no estudo (Anexo 3).

A análise dos olhos dos animais mostrou que 80% (20) dos cães apresentaram sinais clínicos oftálmicos bilaterais, os quais estão representados na figura 4.3. Entre os animais que apresentaram sinais oculares, 10% (2) tiveram apenas um tipo de alteração, enquanto 90% (18) apresentaram mais de uma alteração. A avaliação da ocorrência de lesões oculares mostrou que a presença de algum tipo de secreção (mucopurulenta, purulenta ou sanguinolenta) era a principal alteração aparente em 95% (19) dos animais e estava associada à conjuntivite em 84,2% (16) dos animais. Além disso, foi observado blefarite em 35% (7) dos animais, uveíte em 20% (4) e opacidade de córnea em 10% (2) (Tabela II).

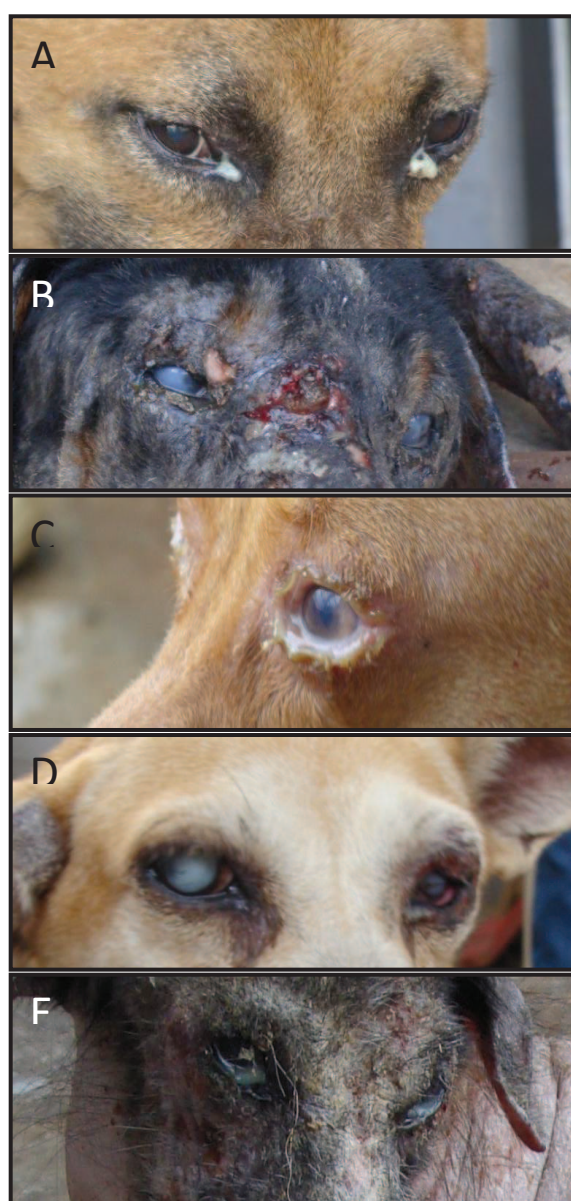


Figura 4.3 – Sinais clínicos oculares observados em cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís – MA. A - Secreção ocular; B - Opacidade de córnea; C - Blefarite; D - Uveíte; E - Conjuntivite.

4.3 - Teste lacrimal de Schirmer (TLS)

O TLS foi realizado para avaliar a produção lacrimal dos cães e realizar o diagnóstico diferencial e confirmatório da ceratoconjuntivite seca (KCS) (Figura 4.4). Os valores obtidos com esse teste variaram de 1,5 a 30 mm para ambos os olhos. Dos 25 animais examinados no presente estudo, 32% (8) apresentaram uma baixa produção lacrimal que variou de 1,5 mm a 6,0 mm, sugerindo assim um quadro de KCS, conforme pode ser observado na Tabela II.



Figura 4.4 – Teste de Schirmer positivo mostrando produção lacrimal abaixo de 10 mm.

4.4 - Teste de Fluoresceína

Com o intuito de detectar a presença de úlceras nas córneas dos cães, realizou-se o teste de fluoresceína. O resultado deste teste mostrou que sete (28%) dos animais estudados apresentaram positividade, indicando a presença de úlcera de córnea. Na figura 4.5 é possível observar a coloração esverdeada na camada superficial da córnea indicando o local da úlcera. Quando associamos os resultados do teste de Schirmer e do teste de fluoresceína observamos que quatro animais (16%) apresentaram positividade nos dois testes (Tabela II).



Figura 4.5 – Olho de cão infectado com *L. infantum*. Observa-se a presença de úlcera de córnea superficial (região corada em verde – seta) após teste de fluoresceína.

Tabela II - Alterações oculares observadas e avaliação pelos testes de Schirmer e fluoresceína de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.

Animal	Alterações Clínicas	Diagnóstico Oftálmico	
	Alterações oculares observadas	Teste de Schirmer	Teste da Fluoresceína
01	Conjuntivite, Secreção mucopurulenta	6 mm	+
02	Conjuntivite, Secreção purulenta, Uveíte	15 mm	-
03	Conjuntivite, Secreção mucopurulenta, Blefarite	30 mm	-
04	Sem alterações	1,5mm	+
05	Sem alterações	26 mm	-
06	Secreção mucopurulenta	24 mm	-
07	Conjuntivite, Secreção sanguinolenta, Uveíte	17 mm	-
08	Conjuntivite, Secreção purulenta, Uveíte, Opacidade de córnea	4,5mm	-
09	Conjuntivite, Secreção purulenta	5,0mm	-
10	Conjuntivite, Secreção Purulenta, Blefarite, Uveíte	5,0mm	-
11	Sem Alterações	4,5mm	+
12	Conjuntivite, Secreção purulenta, Blefarite, Opacidade de córnea	10 mm	-
13	Conjuntivite, Secreção mucopurulenta	4,0mm	-
14	Conjuntivite, Secreção mucopurulenta	14 mm	-
15	Conjuntivite, Secreção mucopurulenta	15 mm	-
16	Conjuntivite, Secreção mucopurulenta, Blefarite	12 mm	-
17	Conjuntivite, Blefarite	6,0mm	-
18	Sem Alterações	14 mm	+
19	Secreção mucopurulenta, Blefarite	16 mm	-
20	Sem Alterações	12 mm	-
21	Secreção mucopurulenta	13 mm	+
22	Conjuntivite, Secreção mucopurulenta	14 mm	+
23	Conjuntivite, Secreção mucopurulenta, Blefarite	13 mm	-
24	Conjuntivite, Secreção mucopurulenta	15 mm	+
25	Conjuntivite, Secreção mucopurulenta	16 mm	-

4.5 – Hemograma completo

A análise individual dos resultados demonstrou alterações hematológicas em 100% (25) dos animais avaliados. Ao analisarmos a série vermelha, observamos que o quadro de anemia, caracterizado pela diminuição da contagem de hemácias, redução do teor de hemoglobina e/ou diminuição dos níveis de hematócrito, correspondeu ao achado laboratorial mais frequente, sendo observado em 92% (23) dos animais, seguido de trombocitopenia que foi observada em 52% (13) dos animais.

A análise do leucograma demonstrou diversas alterações: leucocitose, presente em 4 animais (16%), leucopenia em 11 animais (44%), eosinofilia em 1 (4%), eosinopenia em 10 (40%), linfocitose em 1 (4%), linfopenia em 10 (40%), monocitose em 2 (8%), monocitopenia em 13 (52%), neutropenia em 7 (28%) e neutrofilia em 5 (20%) sendo que destes, 2 animais (8%) apresentaram desvio para a esquerda (Caracterizado pela presença de bastões acima dos valores de referência). (Tabela III).

4.6 – Bioquímica

As análises bioquímicas individuais dos animais revelaram um padrão heterogêneo em relação a alguns parâmetros avaliados, apresentando oscilação acima e abaixo dos valores de referência para os níveis séricos de AST, ALT, creatinina e proteínas totais. As taxas de ureia, globulina e albumina, quando alteradas, não apresentaram as mesmas oscilações. Os valores para ureia e globulina estavam sempre elevados enquanto para albumina sempre abaixo dos valores de referência (Tabela VI).

Tabela III - Resultado do Hemograma completo de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.

Animal	LEUCOGRAMA							ERITROGRAMA				
	Leucócitos (6.000-17.000)	Eosinófilos (100-1.250)	Bastonetes (0-540)	Segmentados (3.000-11.500)	Linfócitos (1.000-4.800)	Monócitos (150-1.350)	Eritrócitos (5,5-8,5)	Hemoglobina (12-18)	Hematócrito (37-55)	Plaquetas (200.000-900.000)		
1	26.000 **	0 *	1.064 **	23.142 **	2.394	0 *	3,03 *	6,06 *	20 *	105.000 *		
2	10.250	512,5	0	6.970	1.743	1.025	4,55 *	9,09 *	30 *	203.000		
3	9.100	273	0	8.099	546 *	182	2,27 *	4,55 *	15 *	60.000 *		
4	5.000 *	250	0	3.600	1.050	100 *	3,03 *	6,06 *	20 *	106.000 *		
5	3.300 *	528	66	2.244 *	396 *	66 *	6,52	13,03	43	513.000		
6	5.000 *	150	150	4.250	400 *	100 *	3,94 *	7,88 *	26 *	70.000 *		
7	19.000 **	950	190	14.250 **	2.470	1.140	5,91	11,82 *	39	307.000		
8	5.250 *	315	0	4.253	578 *	105 *	3,48 *	6,97 *	23 *	176.000 *		
9	2.300 *	161	23	1.794 *	115 *	207	2,73 *	5,45 *	18 *	285.000		
10	13.650	0 *	683 **	11.193	1.092	683	4,85 *	9,70 *	32 *	493.000		
11	1.500 *	0 *	30	1.170 *	285 *	15 *	2,27 *	4,55 *	15 *	230.000		
12	3.150 *	220,5	0	2.300 *	567 *	63 *	4,70 *	9,39 *	31 *	282.000		
13	3.300 *	66 *	0	2.970 *	264 *	0 *	3,33 *	6,67 *	22 *	160.000 *		
14	20.800 **	0 *	0	18.096 **	1.248	1.456 **	5,00 *	10,00 *	33 *	100.000 *		
15	6.500	260	0	4.550	1.495	195	3,03 *	6,06 *	20 *	260.000		
16	7.000	210	0	3.640	2.870	280	4,55 *	9,09 *	30 *	215.000		
17	7.350	220,5	147	6.615	368 *	0 *	3,79 *	7,58 *	25 *	230.000		
18	2.500 *	75 *	25	2.050 *	350 *	0 *	1,52 *	3,03 *	10 *	190.000 *		
19	4.000 *	80 *	0	2.400 *	1.320	200	2,73 *	5,45 *	18 *	190.000 *		
20	9.300	2.232 **	0	5.022	1.860	186	4,39 *	8,79 *	29 *	250.000		
21	16.500	0 *	0	14.025 **	2.475	0 *	4,24 *	8,48 *	28 *	310.000		
22	27.000 **	270	3.780 **	16.200 **	5.130 **	1.620 **	4,24 *	8,48 *	28 *	70.000 *		
23	9.000	90 *	180	6.210	2.250	270	4,09 *	8,18 *	27 *	160.000 *		
24	5.700 *	0 *	228	3.192	2.166	114 *	5 *	10 *	33 *	150.000 *		
25	6.800	272	68	5.576	748 *	136 *	4,24 *	8,48 *	28 *	100.000 *		

*Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Tabela IV - Resultado dos testes bioquímicos séricos para avaliação das funções renal e hepática de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.

Animal	BIOQUÍMICA									
	AST (VR: 26 a 66 UI/L)	ALT (VR: 21 a 102 UI/L)	Creatinina (VR: 0,5 a 1,5 mg/dL)	Proteínas totais (VR: 5,4 a 7,7 g/dL)	Albumina (VR: 2,3 a 3,8 g/dL)	Globulina (VR: 2,3 a 5,2 g/dL)	Uréia (VR: 10 a 60 g/dL)			
1	24,10 *	39,30	0,5	6,0	1,9 *	4,1	27,71			
2	30,20	23,20	0,5	3,9 *	1,0 *	2,9	63,9 **			
3	37,70	22,10	0,5	4,5 *	1,2 *	3,3	65,8 **			
4	31,90	21	0,5	6,4	1,8 *	4,6	30,4			
5	34,30	38,10	0,8	7,0	2,7	4,3	21,5			
6	44,30	81,10	0,5	5,7	2 *	3,7	27,6			
7	39,30	29,50	0,6	5,5	2 *	3,5	30,5			
8	125 **	62	1,10 **	10,20 **	2,50	7,80 **	18,50			
9	38	56	1	10,40 **	2,40	8 **	59,10			
10	36	40	0,80	9,80 **	2,40	7,40 **	37,20			
11	35	62	0,80	8,90 **	2,90	6 **	23,40			
12	53	54	0,50	7,20	2,20 *	5	47,10			
13	46	28	2,60 **	6,60	1,90 *	4,70	150,20 **			
14	42	30	0,20 *	5,70	1,20 *	4,50	31,30			
15	43	31	0,40 *	7,30	2,40	5	17,40			
16	43	32	0,10 *	3,90 *	1,50 *	3,90	15,80			
17	41	13*	0,20 *	3,90 *	1,10 *	2,70	12,90			
18	0 *	141 **	0,20 *	11,70 **	2,60	9,10 **	31,60			
19	44	27	0,40 *	4,70 *	1,40 *	3,30	23,40			
20	33	22	0,30 *	7,80 **	1,90 *	5,90 **	19,20			
21	56	7*	0,50	8,60 **	2,30	6,30 **	24,50			
22	39,08	13*	0,30 *	3,90 *	1,10 *	2,8	112,5 **			
23	46	13*	0,30 *	9,20 **	1,80 *	7,4 **	20,40			
24	52	11*	0,70	8,50 **	2,70	5,8 **	26,40			
25	62	0 *	1,10 **	9,90 **	2,60	7,30 **	25,90			

*Abaixo dos níveis de referência.**Acima dos níveis de referência.

4.7 - Análise histopatológica

A análise histopatológica das pálpebras dos 25 cães envolvidos neste estudo mostrou que 76% (19) dos animais estudados apresentaram alterações neste anexo. A alteração mais frequente observada em todos os animais foi a presença de infiltrado inflamatório do tipo plasmocitário, permeando toda a extensão da derme. A intensidade deste infiltrado variou de leve a intenso e pode ser observado algumas vezes de forma difusa e outras focal (Figuras 4.6 A-B). Dentre estes animais, somente 4 (21%) apresentaram inúmeras formas amastigotas distribuídas no interstício (Figura 4.6 C), assim como no interior de macrófagos (Figura 4.6 D). Degeneração hialina em derme superficial foi observada em 1 único cão (5%). Além disso, notou-se a presença de neutrófilos e células de Mott, associados a esse infiltrado inflamatório em 3 animais (16%) (Figuras 4.6 E-F) e células gigantes em 1 animal (5%) (Figura 4,6 G). Foram notadas ainda, em algumas regiões, ectasia de vaso linfático com valva e edema palpebral neste mesmo animal (Figura 4.6 H).

Alterações na córnea foram observadas em 4 animais (16%) dos 25 estudados. Dentre estas, destacamos a visualização de intenso infiltrado inflamatório plasmocitário, entremeando lamelas em todos eles (Figura 4.7 A), com presença de formas amastigotas dentro de fibras da camada média em 2 animais (50%) (Figura 4.7 B-C), edema córneo em 3 cães (75%) (Figura 4.7 D).

Na esclera, região contínua à córnea, foi observado infiltrado inflamatório plasmocitário difuso que variou de leve a intenso em 11 animais (44%) (Figuras 4.8 A-B).

Alterações da glândula lacrimal foram registradas em 11 animais (44%). Em todos eles foi possível observar infiltrado inflamatório plasmocitário perivascular que variou de leve a intenso (Figura 4.9- A). Entre os ácinos, este infiltrado encontrava-se associado à presença de formas amastigotas em 1 animal (9%) (Figura 4.9 B). A presença de exsudato glandular foi observada em 2 animais (18%) (Figura 4.9 C-D) e desorganização do estroma em 3 dos cães avaliados (27%) (Figura 4.9 E).

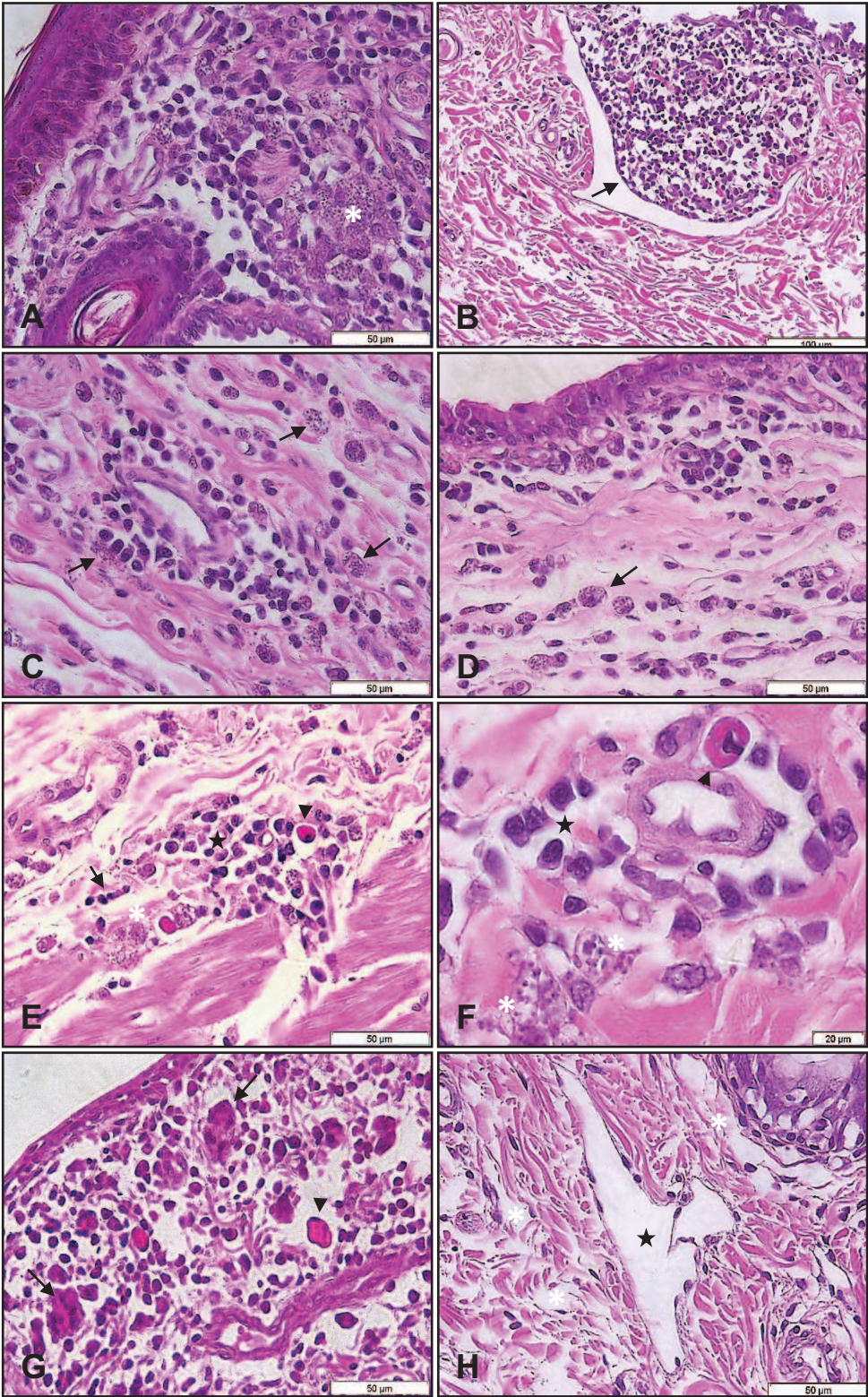
Outra região na qual puderam ser registradas alterações em 11 animais (44%) foi a coróide. Novamente, o infiltrado inflamatório plasmocitário, também variando de leve a intenso, estava presente em 3 (27%), além de hiperplasia em 1 animal (9%) (Dados não mostrados).

Alterações na musculatura retrorbicular foram observadas em 11 animais (44%). Todos eles apresentaram infiltrado inflamatório focal e difuso (Figura 4.10 A-

B). A presença de edema entre as fibras musculares foi observada em 2 animais (18%) e destruição segmentar em 1 deles (9%) (Figura 4.10 C-D). A visualização de amastigotas foi possível em 2 (18%) cães. Em um dos animais os parasitos encontravam-se no interior de miócitos (Figura 4.10 E-F) e em outro, estavam associados ao intenso infiltrado inflamatório plasmocitário presente nos tecidos adiposo e conjuntivo, junto à musculatura (Figura 4.11 A-B).

Em anexo encontra-se um quadro resumindo de todas as alterações histopatológicas individualizadas observadas nas diferentes regiões do globo ocular e seus anexos examinadas neste estudo (Anexo 4).

Figura 4.6 – Análise histopatológica da pálpebra de cães com leishmaniose visceral, provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA. A – infiltrado inflamatório plasmocitário difuso associado à diversas formas amastigotas no interstício (asterísco); **B –** infiltrado inflamatório plasmocitário focal (seta); **C –** amastigotas distribuídas no interstício (setas); **D –** amastigotas no interior de macrófagos (seta); **E-F –** neutrófilos (seta) e células de Mott (cabeça de seta) associados à infiltrado inflamatório plasmocitário (estrela) com presença de formas amastigotas (asterísco); **G –** células gigantes (seta) e células de Mott (cabeça de seta) associadas à infiltrado inflamatório plasmocitário (seta); **H –** ectasia de vaso linfático com valva (estrela) e edema.



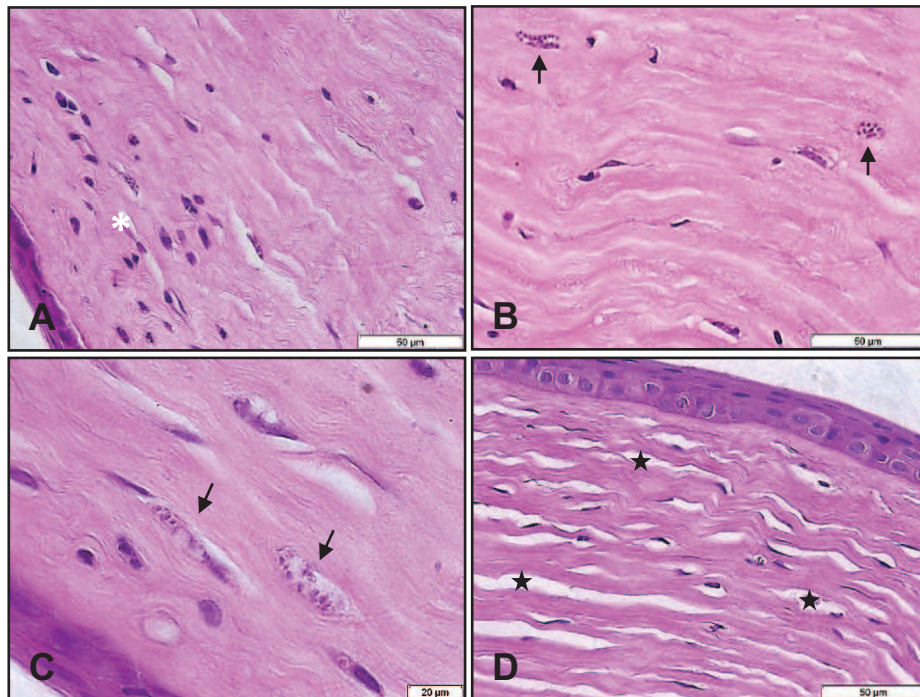


Figura 4.7 – Análise histopatológica da córnea de cães com leishmaniose visceral, provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA. A –infiltrado inflamatório plasmocitário intenso entre lamelas (asterisco); B-C – formas amastigotas dentro de fibras (setas); D – edema (estrela).

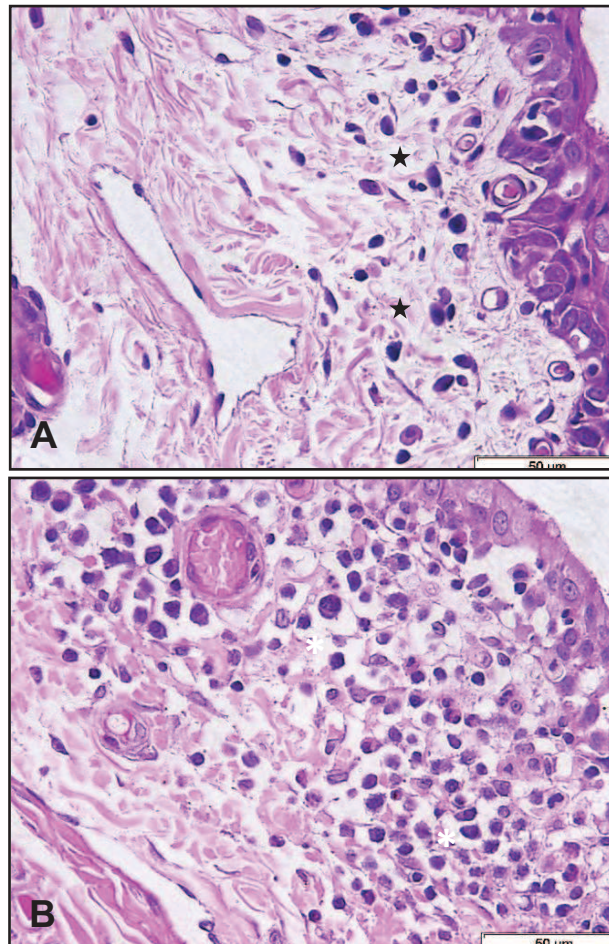


Figura 4.8 - Análise histopatológica da esclera de cães com leishmaniose visceral, provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA. A – discreto infiltrado inflamatório plasmocitário difuso (estrela); B – intenso infiltrado inflamatório plasmocitário difuso (asterisco).

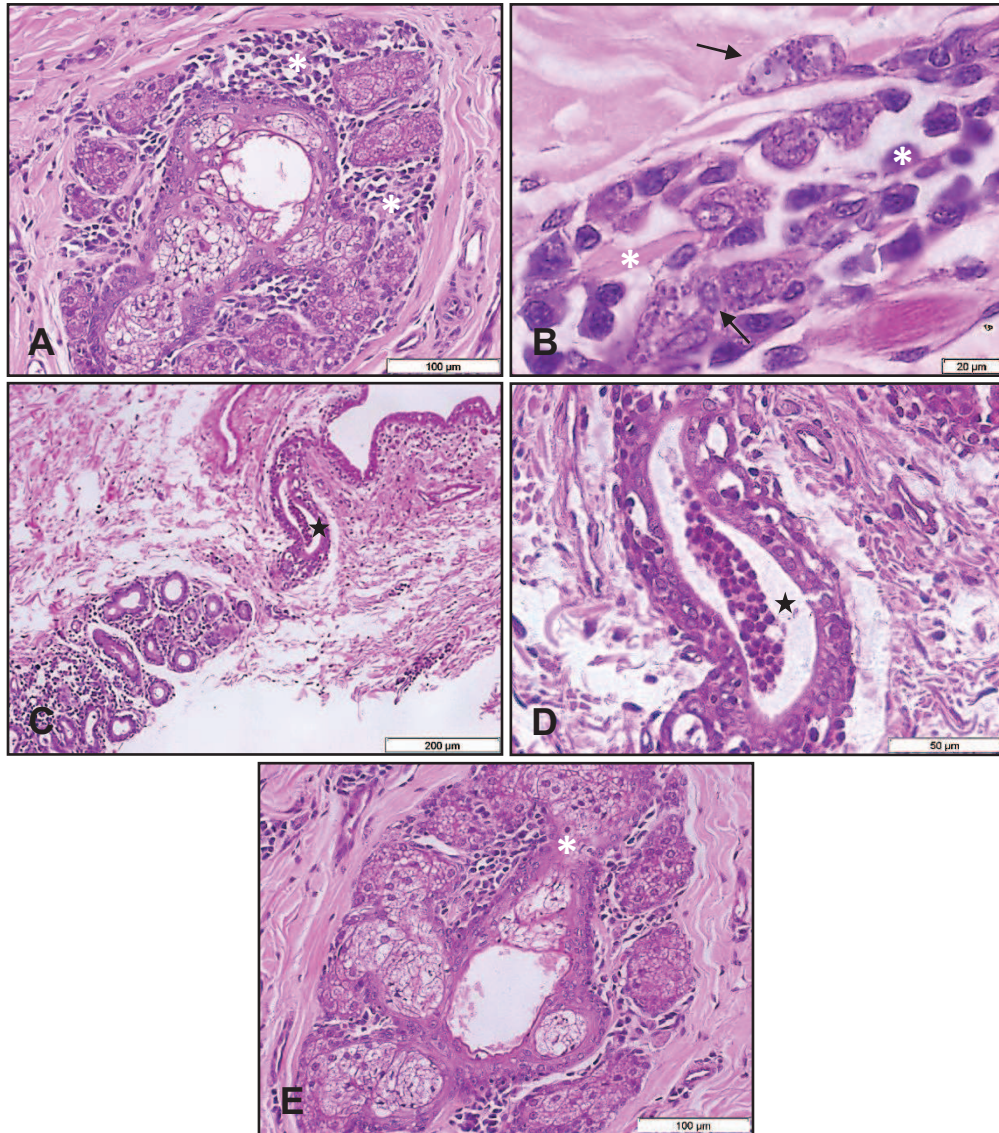
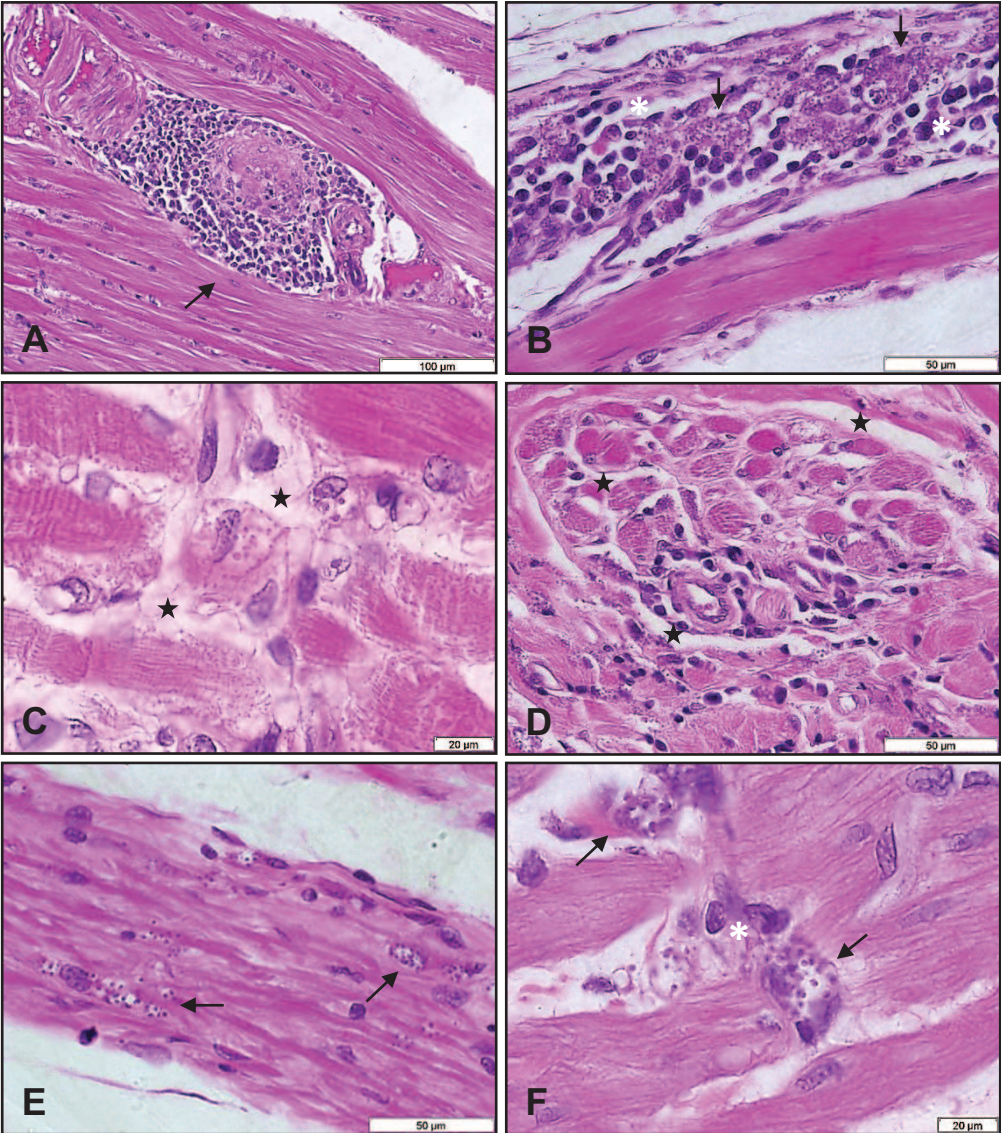


Figura 4.9 - Análise histopatológica da glândula lacrimal de cães com leishmaniose visceral, provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA. A – intenso infiltrado inflamatório plasmocitário (asterisco); B – infiltrado inflamatório plasmocitário (asterisco) associado à amastigotas (setas); C-D – exudato em ducto glandular (estrela); E – desorganização do estroma (asterisco).

Figura 4.10 - Análise histopatológica da musculatura retrorbicular de cães com leishmaniose visceral, provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA. A – infiltrado inflamatório plasmocitário focal (seta); **B** – infiltrado inflamatório plasmocitário difuso (asterísco) associado à presença de amastigotas (setas); **C-D** – edema entre fibras e destruição segmentar (estrela); **E-F** – amastigotas no interior de miócitos (setas) e infiltrado inflamatório plasmocitário (asterísco).



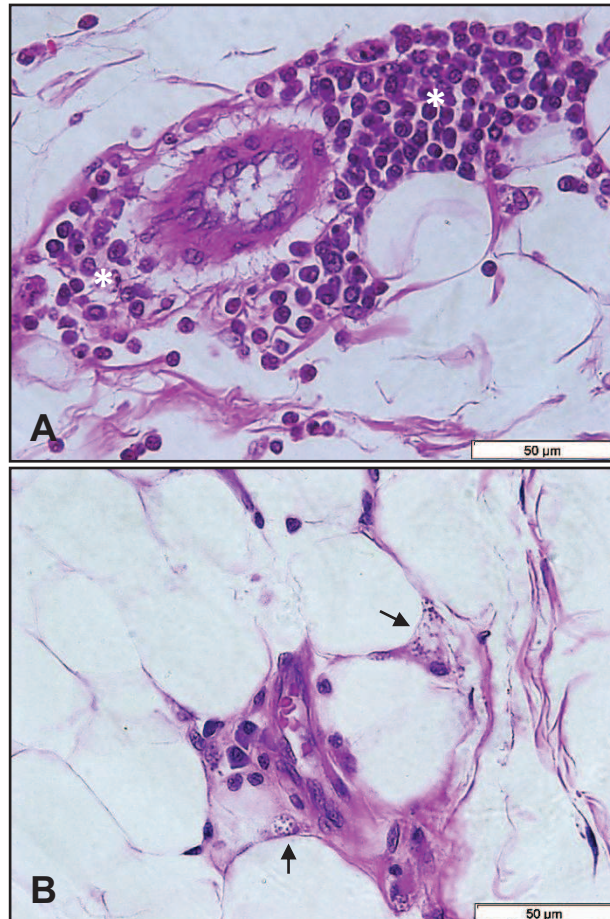


Figura 4.11 - Análise histopatológica de tecido adiposo e conjuntivo de cães com leishmaniose visceral, provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA. A – intenso infiltrado inflamatório plasmocitário (asterísco); B – infiltrado inflamatório plasmocitário com amastigotas (setas).

4.8 – Isolamento e caracterização dos parasitos

A evidenciação do parasito, após isolamento em cultura, foi possível em 14 animais (56%), sendo 7 (50%) em amostras provenientes de medula óssea; 6 (43%) em amostras de baço; 2 (14%) de medula e baço e 1 (7%) em humor aquoso. Em 11 amostras (44%) não foi possível o isolamento do parasito devido à contaminação bacteriana e fúngica, porém destas, em 3 amostras (27%) foram observadas formas amastigotas nas culturas e em 2 (18%) observou-se, nos esfregaços de material proveniente de medula óssea a presença do parasito.

As amostras isoladas foram caracterizadas pela técnica de isoenzimas como *Leishmania infantum*, conforme relatório de espécies de *Leishmania* fornecido pelo CLIOC (Anexo 5), exceto o isolado do animal 25, que foi descartado por causa da excessiva contaminação bacteriana.

4.9 - PCR

A PCR foi realizada em 6 amostras provenientes dos animais que não positivaram em nenhuma das amostras puncionadas para isolamento do parasito (baço, medula e humor aquoso) e/ou não houve a visualização do mesmo em esfregaço de medula óssea.

A amplificação do fragmento referente ao endogene GADPH foi positiva em todas as amostras, confirmando a qualidade do DNA extraído e validando a reação (Figura 4.28 A).

A PCR para a detecção do DNA do parasito demonstrou que duas amostras foram negativas (animais 5 e 6) e quatro foram positivas (animais 9, 10, 11 e 12) apresentando uma banda referente ao fragmento de 120 pares de base, correspondente à presença do DNA de *Leishmania sp.* (Figura 4.28 B).

~

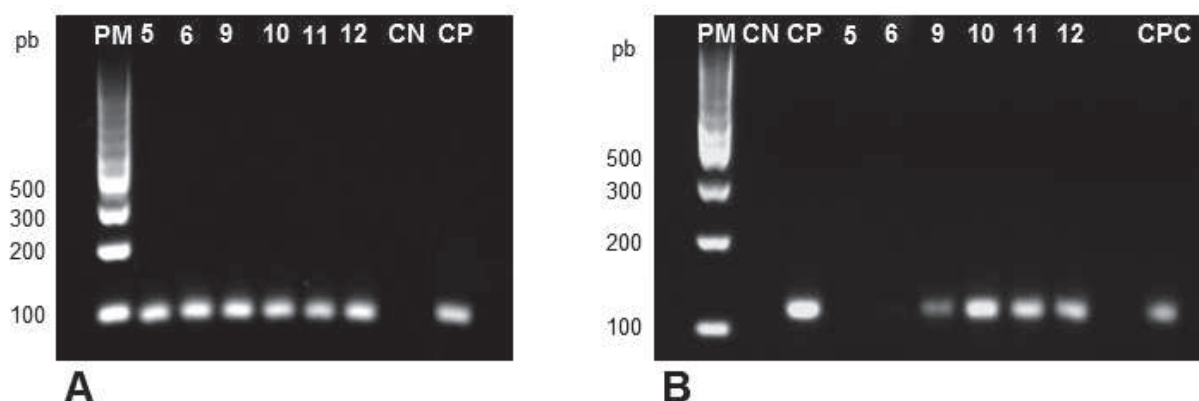


Figura 4.12 – Visualização em gel de agarose dos produtos da PCR.

A - GAPDH. B - Minicirculo. PM - Peso molecular; CN - Controle negativo; CP - Controle positivo (*Leishmania amazonensis*); CPC - Controle positivo de cão infectado; 5, 6, 9, 10, 11, 12 - cães com isolamento parasitário e esfregaço de medula óssea negativos.

Tabela V- Resultados de todas as análises realizadas em cães com leishmaniose visceral e sua origem provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA.

Animal	Elisa/DPP	Isolamento	PCR	Schirmer	Fluoresceína	Esfregaço	Parasito no olho	Origem
1	+/+	+	**	+	+	**	+	Errante
2	+/+	+	**	-	-	**	-	Errante
3	+/+	+	**	-	-	**	-	Errante
4	+/+	+	**	+	+	**	+	Errante
5	+/+	-	-	-	-	**	-	Errante
6	+/+	-	-	-	-	**	-	Errante
7	+/+	+	**	-	-	**	-	Errante
8	+/+	-	**	+	-	+	-	Errante
9	+/+	-	+	+	-	**	-	Domiciliado
10	+/+	-	+	+	-	**	+	Errante
11	+/+	-	+	+	+	**	-	Errante
12	+/+	-	+	-	-	**	-	Errante
13	+/-	-	-	+	-	+	-	Domiciliado
14	+/+	- / *	**	-	-	**	-	Domiciliado
15	+/+	+	**	-	-	**	-	Domiciliado
16	+/+	- / *	**	-	-	**	-	Domiciliado
17	+/+	+	**	+	-	**	+	Errante
18	+/+	+	**	-	+	**	-	Domiciliado
19	+/+	+	**	-	-	**	-	Errante
20	+/+	+	**	-	-	**	-	Domiciliado
21	+/+	+	-	-	+	**	-	Errante
22	+/+	- / *	**	-	+	**	-	Errante
23	+/+	+	**	-	-	**	-	Domiciliado
24	+/+	+	**	-	+	**	-	Domiciliado
25	+/+	+	**	-	-	+	-	Domiciliado

*Visualização de formas amastigotas

**Não realizado

5

DISCUSSÃO

5 – Discussão

Com alto índice de positividade, a LVC está presente na localidade de Cidade Operária, no distrito de Tirirical, São Luiz, MA, onde este estudo foi realizado. Esta localidade é uma área urbanizada e sem proximidade com a mata. Nos domicílios desta região não há criação de animais de produção e existem poucos relatos de animais silvestres nas suas imediações, o que fortalece o conceito de expansão da leishmaniose visceral para grandes centros urbanos nas últimas décadas (BRASIL, 2006; Diniz et al, 2008; Barbosa, et al, 2010). Na transmissão da leishmaniose visceral o cão é considerado o principal hospedeiro reservatório da *Leishmania infantum* e principal fonte de infecção para os vetores. Este fato requer atenção, para que sejam desenvolvidas estratégias de controle da doença em áreas urbanas (Amora et al, 2006).

O diagnóstico da LVC é complexo e pode gerar resultados divergentes, o que reforça a utilização de dois métodos diagnósticos (Assis et al, 2010). Além disto, podemos encontrar resultados conflitantes em relação à sensibilidade e especificidade de diferentes métodos diagnósticos, que dependem do tipo de antígeno utilizado, tempo de infecção e alterações de protocolo (Badaró et al, 1983; Reithinger et al, 2002). O uso de um método confiável e eficaz para o diagnóstico da LVC é decisivo para o sucesso dos programas de controle da doença (Reithinger et al 2002). Inicialmente, segundo recomendações do Ministério da Saúde, o diagnóstico sorológico da LVC consistia na utilização de dois testes sorológicos: o teste de ELISA e a reação de Imunofluorescência indireta (RIFI). Porém, devido à existência de reações cruzadas com outras infecções e de ser de difícil realização em áreas endêmicas, a partir de 2011, o teste imunocromatográfico DPP®, o qual utiliza os antígenos recombinantes (r-K26 e r-K39) de *L. infantum* começou a ser utilizado como método de triagem e o ELISA como teste confirmatório com o intuito de diminuir tais reações cruzadas. De acordo com Rosário et al (2005) a utilização de antígenos recombinantes aumenta a especificidade dos testes diagnósticos quando comparados aos antígenos brutos, no entanto, não aumenta sua sensibilidade. O teste imunocromatográfico DPP®, quando utilizado de forma isolada, tem um índice de falha de 9,4% na detecção cães infectados (Laurenti et al, 2014). No presente estudo, dos 25 animais analisados, 24 foram positivos no teste rápido DPP®, e somente um animal foi negativo, no entanto, este animal possuía previamente exame positivo no esfregaço de medula óssea, demonstrando a limitação na sensibilidade diagnóstica deste teste. Esta falha, alerta sobre a

necessidade de se criar um teste com melhor desempenho (Laurenti et al, 2014), além de reforçar a utilização, concomitante, de testes parasitológicos para diagnosticar a LVC.

Segundo Laurenti e colaboradores, apesar do DPP utilizar antígenos recombinantes, o que diminui a ocorrência de reações cruzadas, tais resultados ainda podem ocorrer (Laurenti et al, 2014). Resultados obtidos no nosso trabalho mostraram que dois animais foram positivos para LVC nos exames sorológicos e negativos nos testes parasitológicos e molecular apesar de apresentarem sinais clínicos compatíveis com LVC. Há duas hipóteses que podem explicar este resultado: ou estes animais são realmente negativos para LVC e a positividade encontrada é proveniente de reação cruzada com outras doenças como Erlichiose, Babesiose, Toxoplasmose e Neosporose como descrito por diversos autores (Laurenti et al, 2014); ou estes animais são positivos para LVC, mas a amostra recolhida para a realização da PCR não continha o parasito, o que demonstra que apesar da técnica de PCR ser considerada de alta sensibilidade e especificidade, há limitações que justificam os resultados negativos encontrados nos diferentes modelos de estudo (Patel et al, 2014).

Cães de com LV em áreas endêmicas apresentam como principais sinais clínicos caquexia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, onicogrifose, lesão de pele, dentre outros (Ciaramella et al., 1997; Ferrer, 1999; Lima et al., 2004; Brito et al., 2004; Langoni et al., 2005; Linhares et al., 2005; Krauspenhar et al., 2007, Albuquerque et al, 2007).A ocorrência de mais de um sinal clínico nos animais é comum e relatada por diversos trabalhos (Mattos Jr et al, 2004;Freitas et al, 2012). Trabalhos realizados por Mattos Jr. e colaboradores (2004) e Freitas e colaboradores (2012) relataram que 88,8% e 86,8% dos animais com LV apresentavam mais de um sinal clínico compatível com a doença, respectivamente. Em nosso estudo, também observamos a presença de mais de um sinal clínico nos animais, corroborando os dados obtidos por esses autores. Os sinais clínicos mais frequentes encontrados em nosso estudo foram linfadenopatia, caquexia e lesão de pele. No entanto, Freitas e colaboradores (2012), em estudos com cães naturalmente infectados em Fortaleza, observaram vômito e caquexia como sinais mais frequentes. Apesar de todos os animais estudados no presente trabalho, terem apresentado pelos menos um sintoma compatível com a leishmaniose, o diagnóstico clínico continua sendo um problema significativo quando falamos de LVC. Este fato ocorre porque muitos dos sinais clínicos descritos podem surgir em inúmeras outras

doenças infecciosas, distúrbios autoimunes sistêmicos ou dermatológicos (Aguiar et al, 2007).

Diversos estudos relatam alterações hematológicas e bioquímicas em cães naturalmente ou experimentalmente infectados com *L. infantum*. No presente estudo observamos alterações hematológicas e bioquímicas como: anemia, trombocitopenia, leucopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e alterações nas enzimas hepáticas. Estes resultados corroboram com os descritos por Reis et al, (2006) e Nicollato et al, (2013) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* em Belo Horizonte. Andrade et al (2014) estudando cães naturalmente infectados com *L. infantum* em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, atribuiu as alterações ocasionadas na série vermelha, a uma possível anemia hemolítica ocasionada pela presença de epítomos parasitários na corrente sanguínea do hospedeiro. Outros autores acreditam que ocorra redução significativa destes valores em função de alguns fatores como: alterações nos compartimentos eritróides (Reis et al, 2006., Trópia de Abreu et al, 2011); aumento de hemólise, que pode estar ligada a resposta inflamatória sistêmica; ou a alteração da superfície do macrófago, que ocasiona uma maior retenção de ferro no seu interior, fato observado em doenças crônicas (Nicolatto et al, 2013).

No presente estudo a maioria dos animais estudados era cães não domiciliados, o que favorece o desenvolvimento de subnutrição, reduzindo a condição corporal e a capacidade de responder adequadamente às doenças. Tal fator pode influenciar a diminuição de alguns parâmetros da série vermelha observados e justificar a alta frequência de caquexia nos animais estudados.

A presença de doença renal é comumente descrita em cães com LV e estão relacionadas com a deposição de imunocomplexos, principalmente IgG e IgM, no parênquima renal, alterando sua capacidade de filtração e consequente aumento destes níveis no sangue. (Freitas et al, 2012). Em nosso estudo, ao analisarmos a bioquímica da função renal, observamos que em 5 animais, os valores de ureia e creatinina encontravam-se aumentados, e em somente 1 animal os dois parâmetros estavam alterados, caracterizando a presença de doença renal.

Segundo Freitas e colaboradores (2012), o acompanhamento dos níveis plasmáticos de proteínas totais e frações é um importante parâmetro avaliado na LVC, os quais podem estar alterados nestes animais, devido ao aumento dos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*. Nossos resultados mostraram uma redução de albumina e aumento de globulina, corroborando com os dados de Freitas e

colaboradores (2012), contudo, estes autores observaram um aumento nos níveis séricos de proteínas totais enquanto em nossos animais estes níveis oscilaram acima e abaixo dos valores de referência. Estes mesmos autores mostraram ainda, um aumento na concentração sérica das enzimas ALT e AST em apenas 11% dos cães estudados. Em nosso estudo observamos resultados semelhantes onde somente 8% dos animais apresentaram um aumento destas enzimas. Tais resultados demonstram que na LVC pode não ocorrer lesão hepática severa, como descrito por Ciaramella & Corona (2003). Todavia, a presença de muitos macrófagos, infectados com formas amastigotas de *Leishmania*, dispersos pelo fígado acarreta doença hepática crônica nesses cães (Silva, 2007).

Dentre os parasitos que podem causar doenças oculares estão incluídos protozoários, helmintos e artrópodes. Dentre os protozoários, destacamos *Acanthamoeba*, *Microsporidia*, *Toxoplasma* e *Leishmania* (Shoukrey & Laskay, 1986). De acordo com Peña e colaboradores (2000), as manifestações oculares são comuns na LVC e ocorrem em aproximadamente 25% dos casos. Mesmo que ocorram associadas a outros sinais sistêmicos, as manifestações oculares e perioculares podem constituir a primeira alteração aparente da LVC (Roze, 1986) e os aspectos clínicos destas lesões, podem, em alguns animais, sugerir o envolvimento de uma doença sistêmica (Fulgêncio et al, 2004).

Estudos em cães com leishmaniose mostraram que as manifestações oculares são comuns, ocorrendo em aproximadamente 25% dos casos (Peña et al, 2000). Mais tarde, Fungêncio (2006) mostrou que de 100 cães com leishmaniose, 38% deles apresentavam lesões oculares, apontando um aumento desta manifestação. A ocorrência de sintomas oftalmológicos nos animais examinados no nosso estudo foi constante; 80% dos cães tinham lesões oculares, o que corrobora com a descrição da importância desses achados na LVC, feita por outros autores (Brito, 2006; Naranjo et al, 2005; Brito et al, 2010; Barbosa et al, 2012).

A avaliação histopatológica do globo ocular e pálpebras no nosso estudo mostrou intenso parasitismo, assim como espaçamento de fibras colágenas e elásticas na camada estromal da córnea, o que caracteriza a presença de edema córneo, como descrito em outro estudo realizado por Brito e colaboradores (2004) em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. A presença de formas amastigotas associada a infiltrado inflamatório plasmocitário nessas fibras da camada córnea também foi observada em nosso estudo, corroborando com o trabalho de Peña e colaboradores (2008), os quais também observaram um maior

tropismo do parasito por regiões anteriores do olho, como a córnea e a esclera. A camada córnea é composta em sua maioria por um concatenado de fibras que se entremeiam, e as células ali presentes, principalmente fibroblastos, são descritas por possuírem um ambiente menos hostil para o parasito quando comparado com o macrófago (Bogdan et al, 2000), justificando o alto parasitismo observado nesta camada.

No presente estudo observamos a presença de grande quantidade de plasmócitos no infiltrado inflamatório ocular. Segundo Calabrese e colaboradores (2013), em estudo das alterações oculares de camundongos infectados experimentalmente pela *L. amazonensis*, o dano ocular pode ocorrer em consequência da resposta de hipersensibilidade do tipo III estimulada pela presença de antígenos do parasito, ocasionando deposição de imunoglobulinas. Tal deposição favorece o aparecimento de lesões oculares, o que pode explicar as lesões observadas no nosso modelo.

Anosa e Idowu (1983) mostraram uma correlação entre o intenso parasitismo e o aumento na contagem de plasmócitos e células de Mott na medula óssea. Em nosso estudo, observamos a presença de células de Mott (células caracterizadas por possuírem ilhas produtoras de imunoglobulina), associadas a macrófagos intensamente parasitados e muitos plasmócitos na pálpebra dos animais, confirmando esta correlação.

Alguns estudos mostram a presença de formas amastigotas de *Leishmania* no músculo mastigatório e esquelético de animais naturalmente infectados (Vanvakids et al, 2000; Paciello et al, 2009), assim como em animais infectados experimentalmente (Silva-Almeida et al, 2010). Embora Dubey e colaboradores (1990) tenham relatado que o *Neospora caninum* é o único capaz de ocasionar alterações na musculatura ocular e extraocular de cães, nosso estudo mostrou a presença de formas amastigotas de *L. infantum* dentro do miócito da musculatura retrorbicular, assim como ao redor deste em cães naturalmente infectados. Paciello e colaboradores, (2009) demonstraram que a presença do parasito na musculatura esquelética de cães naturalmente infectados por *L. infantum* ocasionaram uma severa miopatia, sugerindo que a presença do parasito em fragmentos de musculatura lesionada possa explicar a presença de miosite, semelhante ao observado em nossos achados. Esta miosite altera a musculatura palpebral, que sofre atrofia, e pode expor o globo ocular, predispondo o aparecimento de uveíte. Peña et al, (2000) descreveu a presença de ceratite como sendo o sinal clínico

oftálmico observado com maior frequência em seus estudos, divergindo dos nossos resultados, os quais mostraram que a secreção ocular foi o sinal clínico observado com maior frequência nos animais estudados.

A análise glandular no nosso modelo mostrou alteração estrutural que variou de desorganização de estroma, edema e presença de infiltrado inflamatório plasmocitário e exsudato, independente da positividade ou não no teste de Schirmer. Rose (1986) propôs três teorias para as alterações no filme lacrimal de cães com leishmaniose. A primeira delas supõe que haja destruição direta do parasito sobre a glândula, acompanhada de intenso infiltrado inflamatório; a segunda propõe que possa ocorrer obstrução dos ductos lacrimais devido ao intenso edema de estruturas adjacentes e a terceira propõe que haja uma redução da secreção reflexa seguida de dano córneo. Naranjo et al, (2005) em estudos sobre a etiologia da ceratoconjuntivite seca em cães naturalmente infectados com *L. infantum* propôs que o mecanismo patológico observado na glândula lacrimal seria proveniente de um intenso infiltrado inflamatório ao redor desta, que culminaria com dilatação retrógrada nos ductos e conseqüente acúmulo de secreção, confirmando a segunda teoria proposta por Rose (1986). Nossos dados mostraram que a maioria dos animais apresentaram alterações oftálmicas, dos quais 30% apresentaram resultados positivos no teste de Schirmer, indicando diminuição da produção de lágrima o que confirma a teoria de Naranjo et al, (2005) e a segunda teoria proposta por Rose (1986).

Diante dos resultados obtidos em nosso estudo, podemos concluir que manifestações oculares são achados comumente observados em animais com LVC sendo os sinais clínicos mais frequentes são secreção ocular e conjuntivite. É importante considerar a leishmaniose como uma doença sistêmica, que afeta vários órgãos e sistemas uma vez que alterações hematológicas e bioquímicas consistentes como: anemia, plaquetopenia, hiperproteinemia hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia também são observadas. Devido à alta frequência com que se observam as manifestações oculares, como proposto por Naranjo e colaboradores (2010), nós também sugerimos que em áreas endêmicas, a leishmaniose deva ser incluída como diagnóstico diferencial em cães com alterações oculares ou de etiologia desconhecida.

7

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7 – Referências bibliográficas

Aguiar PHP et al Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. Ver. Bras. Saúde Prod.An. 2007;8(4):283-294.

Albuquerque AR, Aragão FR, Faustino MAG, Gomes YM, Lira RA, Nakasawa M, Alves LC. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. Clin Vet. 2007;12:78-80.

Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet. Parasitol. 2005;127:227–232.

Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M. WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos One, 2012;7(5):1-12.

Alvar J. Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. Parasitol Today. 1994;10(4):160-3.

Amora et al, 2006. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Ciência Rural. 2006;.36(6):1854-1859.

Andrade GB, Barreto WT, Santos LL, Ribeiro LR, Macedo GC, Sousa KC, André MR, Machado RZ, Herrera HM. Pathology of dogs in Campo grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. Rev Bras Parasitol Vet. 2014;23(4):509-

Anosa VO, Idowu AL. The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. Zentralbl Veterinarmed B. 1983;30(8):600-8.

Assis J, Queiroz NM, Silveira RC, Nunes CM, Oliveira TM, Junior AC, Neves MF, Machado RZ & Buzetti WA. 2010. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. Revta Bras. Parasitol. Vet. 19:17-25.

- Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(3):480-4.
- Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Melo MA, de Andrade PP, de Castro JA, Rebêlo JM, Carvalho SM, Ramalho-Ortigão M. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. *Acta Trop.* 2006 Apr;98(1):15-24. Epub 2006 Feb 14.
- Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J.* 2008;175(1):14-5.
- Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, Paula KM, Dias ES. Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(5):421-5.
- Barbosa VT, Silva MAG, Sousa MG, Gering AP, Santos HD, Laus JL. Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.6, p.1465-1470,2012.
- Barbosa. D.S. et al Soroprevalência e Variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil., *Ci. Anim. Bras.*, 2010;11(3):653-659.
- Bates PA. *Leishmania* sand flies interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(4):340-344.
- Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007;37(10):1097-106.
- Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J Exp Med.* 2000 Jun 19;191(12):2121-30.
- Braga FJ, Abreu CM, Abreu PR, Camargo EE, Rivitti MC, Tedesco-Marchesi LC, Gambini DJ, Barritault L. [2 infectious granulomatous diseases (leprosy and

cutaneous and mucous leishmaniasis) by scintigraphic methods]. Bull Soc Pathol Exot. 1992;85(1):53-6.

Brasil. Ministério da Saúde. Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011. 2012a. [Cited 2013 May 21]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_lv_entre_1990_e_2011_final.pdf. Acesso em: 6 maio 2013.

Brasil. Ministério da Saúde. Esclarecimento sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. NOTA TÉCNICA. 2011.s.d.v.e.s. 48.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral. Editora MS:Brasília-DF.122p.2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de controle da leishmaniose visceral. 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do estado do Rio Grande do Sul com a Argentina. 2010. 3 p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/notas_tec_front_br_argentina_lv_final_ses_rspdf>. Acesso em: 6 maio 2013. Acesso em: 6 maio 2013.

Brito FLC, Alves, LC, Maia FCL et al. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2006;58:768-775.

Brito FLC. Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (*Canis familiaris* LINNEUS,1758). 2004. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Brito, F.L.C.; Laus, J.L.; Tafuri, W.L. et al. Histopathological findings and detection of parasites in the eyes of dogs infected naturally with *Leishmania chagasi*. *Cienc. Rural*, v.40, p.1141-1147, 2010.

Calabrese KS, Cortada VMCL, Dorval MEC, Souza-Lima MAA, Oshiro ET, Souza, CSF, Silva-Almeida M, Carvalho LOP, Gonçalves da Costa SC, Abreu-Silva AL. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. *Exp.Parasitol.* 2010;124:253–257.

Calabrese KS, Silva LS, Haridoim DJ, Souza CSF. Abreu-Silva AL. Ocular experimental leishmaniasis in C57BL/10 and BALB/c mice induced by *Leishmania amazonensis* infection. *Exp Parasit.* 2013;133:156-161.

Caldas AJ, Silva DR, Pereira CC, Nunes PM, Silva BP, Silva AA, Barral A, Costa JM. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in children from an endemic area of visceral leishmaniasis in the São Luís Island-MA, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34(5):445-51.

Caldas AJM. Marcadores de eficácia terapêutica na leishmaniose visceral humana em crianças e adultos [PhD Thesis]. [Salvador]: Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz; 2004. 103p

Campino L; Maia C. Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Acta Med Port.* 2010;23(5):859-64.

Cerbino-Neto J; Werneck GL, Costa CHN. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cad.Saúde Pública.*2009, 25(7):1543-1551.

Cesse EAP, Carvalho EF, Andrade PP, Ramalho WM, LUNA L. Organização do espaço urbano e expansão do Calazar. *Ver. Brás.Saúde Materno Infantil,* 2001;1(2):167-76.

Chagas, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico.* 1936; 50: 221-222.

Ciaramella P, Corona M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Vet Learn* 2003; 25:358-368.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study os canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 1997; 141:539.

Costa CHN, Pereira HF, Pereira FC, Tavares JP, Araújo MV, Gonçalves MJO. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis? *Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg.*, 1999, 93:464.

Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Leal GGA, Moreira, N.D., Oliveira LAM, Machado EMM, Morais MHF, Corrêa-Oliveira R, Carneiro M, Reis AB., Evaluation of changes in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis Control Program in Brazil and a new protocol for diagnosis. *PLoS One*. 2014;9(3):e91009.

Coura-vital W, Reis AB, Fausto MA. et al. Risk Factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a Cohort of Dogs from an Endemic Area of Brazil. *PloS one*, 2013, 8(8):e71833.

Coura-Vital W. et al. Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. *Plos One*. 2014;9:e3665.

da Silva MA, Pedrosa Soares CR, Medeiros RA, Medeiros Z, de Melo FL. Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2013;134(2):206-10.

da Silva MS, Monteiro JP, Nunes VS, Vasconcelos EJ, Perez AM, Freitas-Júnior Lde H, Elias MC, Cano MI. *Leishmania amazonensis* promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle. *PLoS One*. 2013;8(11):e81397.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting Paradigms of epidemiology and control. *Rev int med trop São Paulo* 2006; 48:151-6.

Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol*. 2012; 28(12):531-8.

Dantas-Torres, F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, 2009; 2(1) Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S1>>. Acesso em 11/11/2013.

de Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, de Pita-Pereira D, de Araújo Pereira T, Britto C, Brazil RP, Brandão Filho SP. Natural *Leishmania infantum* infection in *Lutzomyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Trop. 2010;116(1):108-10.

de Pita-Pereira, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in na endemic área of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. Acta Trop, 2008; 107(1):66-9.

Deane, LM. Leishmaniose Visceral no Brasil: Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. 1956. 162p. Tese (Doutorado). Universidade de são Paulo. São Paulo.

Deane, LM.; Deane, MP. Observações preliminares sobre a importância do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em áreas endêmica no Ceará. Hospital, 1955; 48:61-76.

Deane, LM.; Deane, MP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. Rev. Inst. Med Trop. São Paulo, 1962;4:198-212.

Desjeux P. Leishmaniasis. Nat Rev Microbiol., 2004;2(9):692.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol. 1996;14(5):417-23.

Donatien A, Lestoquard F. Observations et reflexions sur la leishmaniose généralisé du chien. Arc.Inst. Pasteur d'Algérie, 1935; 13:320-328.

Donovan, C.1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. Br. Med. J. ii: pp. 79

dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA.Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Med Vet Entomol. 1998;12(3):315-7.

Dubey JP, Koestner A, Piper RC. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. J Am Vet Med Assoc. 1990;197(7):857-60.

- Dubielzig, R. R. Diseases of the eyelids and conjunctiva. In: Dubielzig RR, Ketring KL, McLellan GJ, Albert DM. Veterinary ocular pathology: a comparative review. Edinburgh: Elsevier-Saunders, Cap. 7, p. 147-189.2010.
- Durdu M, Gođkc,e S , Bagirova M, Yalaz M, Allahverdiyev AM, Uzun S. Periocular involvement in cutaneous leishmaniasis. JEADV 2007;21:214–8.
- Falchetti E, Faure-Brac G. La leishmaniose canine à Nice. Étude épidémiologique. Bull. Soc. Pathol. Exotiq. 1932; 25:1091-1099.
- Faria AG, Veloso CL, Coura-Vital W, Reis BA, Damasceno LM, Gazzinelli, Andrade MH. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum* Infected Dogs. PLOS Neglected Tropical Diseases. January 2015. Volume 9. Issue 1. E3429.
- Faure-Brac G. La leishmaniose canine. Rev. Pathol. Complic. Hyg. Gén.1933;33:648-649.
- Feitosa MM. Leishmaniose visceral: facetas da doença. In: 6º Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de pequenos animais, 2006, São Paulo, p 57-58.
- Feliciangeli MD, Delgado O, Suarez B, Chiurillo MA. The burden of the *Leishmania chagasi/infantum* infection in a closed rural focus of visceral leishmaniasis in Lara state, west-central Venezuela. Trop Med Int Health. 2005;10(5):444-9.
- Feliciangeli MD. Vectors of leishmaniases in Venezuela. Parassitologia. 1991 Dec;33 Suppl:229-36. Review.
- Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From canine leishmaniasis update (Ed. R. Killick-Kendrick). Proceedings of a canine leishmaniasis forum, Barcelona, 28-31 January, pp 6-10, 1999.
- Freitas JC, Nunes-Pinheiro DC, Lopes Neto BE, Santos GJ, Abreu CR, Braga RR, Campos RM, Oliveira LF. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. Rev Soc Bras Med Trop.2012;45(1):24-9.
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. Molecules. 2009;14(7):2317-36

Fulgêncio GO. Prevalência de oftalmopatias em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* no município de Belo Horizonte – Estudo clínico e histopatológico. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Medicina Veterinária. Área: Clínica e Cirurgia; 2006.

Fulgêncio GO; Silva MAP; Borges KD A. Ceratoconjuntivite seca em três cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) Chagasi*. Rev Univers Rural Ser Ciências da Vida. 2005;25:177-178.

Fulgêncio GO; Viana FAB; Michalicj MS. Alopecia periocular, blefarite, ceratoconjuntivite e uveíte: Manifestações oftálmicas da leishmaniose visceral canina? Rev.Univers. Rural. Série Ciências da Vida, 2004;24(Supl.):31-32.

Funasa. Guia de Vigilância Epidemiológica. 2009. Ministério da Saúde. 7ª edição. Brasília/DF.

Funed - Serviço de Doenças Parasitárias Referência Nacional para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças Instituto Octávio Magalhães – Lacen – MG Fundação Ezequiel Dias – Funed. Manual do Programa de Avaliação da Qualidade Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. 2013

Galati EA; Nunes VL; Rego Júnior F; Oshiro ET; Chang MR. Phlebotomines (Diptera:Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul,Brazil. Rev Saude Publica. 1997;31(4):378-90.

Galvez, R. et al. Questionnaire-based survey on the clinical management of canine leishmaniosis in the Madrid region (Central Spain). Prev Vet Med, v. 102, n. 1, p. 59-65, Oct 2011

Giles RC, Hildebrandt PK, Becker RL. Visceral Leishmaniasis in a dog with bilateral endophthalmitis. J. Am. An. Hosp. Assoc.. 1975;11:155-159.

Gontijo B, Carvalho RLM. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36:71-80.

Gontijo FMC; Melo NM. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol. 2004;7(3).

Grimaldi G; Teva A; Ferreira AL; dos Santos CB; de Souza Pinto I; de Azevedo CT; Falqueto A. Evaluation of a novel chromato-graphic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPPCVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2012;106:54–59.

Harith AE, Kolk AHJ, Laarman JJ. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for s e rodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and Elisa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81:603-606.

Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editores. Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15; Leeds, UK. New York: Springer; 2002

Ho EA, Chu HJ, Yuan IC. Visceral leishmaniasis in dogs with special reference to skin examination and 45 ilium puncture. *Chin Med J;1947;40:889-894.*

IBGE, População residente, em 30 de Novembro de 2010, Publicação Completa. Acessado em 3 de Março de 2010.

Ikeda-Garcia AF, Marcondes M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clin Vet.* 2007;Ano XII:71.

Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhães AL, Guerra júnior RB, Melo MN, Gomes R, Silveira TG, Shaw JJ. Variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(1):S111-21.

Jafari AK, Akhyani M, Valikhani M, Ghodsi ZS, Barikbin B, Toosi S. Bilateral cutaneous leishmaniasis of upper eyelids: a case report. *Dermatol Online J.* 2006;12(1):20.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *TRENDS in Parasitol.* 2006;22(9);439-445.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a restrospective study of 158 cases (1989-1996). *J. Am. An. Hosp. Assoc.* 1999;35:376-383.

- Krauspenhar C, Beck C, Sperotto V, Silva AA, Bastos R, Rodrigues L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. 2007;37.
- Kumar PV, Roozitalab MH, Lak P, Sadeghi E. Ocular leishmaniasis, a cause of blindness. *Ir J Med Sci* 1993; 18:106-11.
- Lainson R, Shaw JJ. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. *Ciência e Cultura* 1992;44: 94-106.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1 W Peters, R Killick-Kendrick (eds), Academic Press, London, p. 1-120, 1987.
- Lainson, R. & J.J. Shaw, 1998. New World Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species, p. 242-266. In: Cox, F.E.G., J.P. Kreier & D. Wakelin (Eds.). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology*, 701p.
- Lainson. The neotropical leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010;1: 13-32.
- Langoni H, Lucheis SB, Silva RC, Castro APB, Paes AC. American visceral leishmaniasis: a case report. *The Journal of Venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2005, 11: 361-372,.
- Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, Pimenta PFP, Marcondes M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet. Parasitol.*, 2013;196(3-4):296-300.
- Laurenti, M.V. de Santana Leandro Jr., TY. Tomokane, H.R.L. De Lucca, M. Aschara, C.S.F. Souza, R.M. Silvab, M. Marcondes, V.L.R. da Matta Comparative evaluation of the DPP®CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, 2014;205:444-450.
- Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Brit. Med. J.*, 1903;1:1252-1254.

Leitão JLS. Canine leishmaniasis. *Amatus*.1946;5:318-326.

Lemaire G, Sergent E, L'Héritier A. Recherches sur la leishmaniose du Chien d'Alger. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1913;6:579-581.

Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Ronigberg BM, Lieedale GF, Leoblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vávra J, Wallace FG. A newly revised classification of the PROTOZOA. *J. Protoz.* 1980;27:37-58.

Lima WG, Michalick MSM, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta tropica*. 2004;92: 43-53,.

Linhares GFC, Chavez NST, Duarte SC, Fernandes PR, Amaral AVC, Souza MA. Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. *Revista de Patologia Tropical*. 2005;34: 69-72,

Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, Abath FGC, Alves LC, Souza WV, Gomes YM. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.* 2006;137:11–16.

Luvizotto MCR. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. Anais do 1º Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina. Cólegio Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista. 2006. p. 15-22.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira AS, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MC. Mixed *Leishmania chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006a;100(5):442-445.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Pereira AS, Figueiredo FB, Baptista C, Leal CA, Melo CX, Confort, EM, Marzochi MC. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Parasitol.* 2006b;138(3-4):366-370.

- Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 2008;158: 274-287.
- Mansueto P. et al. Leishmaniasis in travelers: A literature review. *Trav. Med. Infect. Dis.* 2014;12:563-581.
- Marcondes M, Rossi CN. Leishmaniose visceral no Brasil. *Visceral leishmaniasis in Brazil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo.* 2013;50(5):341-352.
- Marcondes, M. Leishmaniose uma zoonose. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 7; 2007, São Paulo, São Paulo, Anais... São Paulo, 2007, p. 211.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MR. Leishmaniose visceral (Calazar). *J. Bras. Med.* 1981;41(5):61-84.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Grimaldi GJr, Monenn H, Pacheco RS, Sabroza PC, Souza MA, Rangel FB, Tramontano N. 1985. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985;80(3):349-57.
- Mattos Jr DG, Pinheiro JM, Menezes RC, Costa DA. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2004., 56:119-122.
- McConnel EF, Chaffee EF, Cashell IG, et al. Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog. *J Am. Vet. Med. Assoc.* 1970;156:197-203.
- Migone LE. Un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). *Bull. Soc. Pathol. Exotiq.* 1913;6:118-120.
- Missawa NA, Veloso MA, Maciel GB, Michalsky EM, Dias ES. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(1):76-8.
- Mohammed AR, Wright EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW. Sero a dignosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparision of

- Elisa - imunofluorescence and indirect haemagglutination. Trans R Soc Trop Med.Hyg 1986; 80:271-4.
- Molleda JM, Novales M, Ginel PJ.Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. J. Vet. Med. 1993;48:173-8.
- Monteiro MC, Nogueira LG, Almeida Souza AA, Ribeiro JM, Silva JS, Cunha FQ.Effect of salivary gland extract of *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis*, on leukocyte migration in OVA-induced immune peritonitis. Eur J Immunol. 2005;35(8):2424-33.
- Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet Parasitol. 2007;145(3-4):245-52.
- Moreira MAB. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet. Parasitol. 2007;145(3-4):245-252.
- Moreno E, Melo MN, Antunes CMF. et al. Epidemiologia da leishmaniose visceral humana assintomática em área urbana, Sabará, Minas Gerais, 1998-1999. Informe epidemiológico do SUS. 2002;11:37-9.
- Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trend. Parasitol. 2002;18(8):399-405.
- Morgan G. Case of cutaneous leishmaniasis of lid. British Journal of Ophthalmology 1965;49: 542–546.
- Muccioli C, Campos M, Goldchmit M, Dantas PEC, Bechara SJ, Costa VP. A córnea não é um pedaço de plástico. Arq Bras Oftalmol.;69(5):629-30, 2006.
- Naranjo C. et al. Detection of *Leishmania* spp. And associated inflammation in ocular-associated smooth and striated muscles in dogs with patente leishmaniosis. Veterinary Ophthalmology 2010;13(3):139-143.

Naranjo, C. et al. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 2005;133(1):37-47.

Nattan-Larrier L, Grimard L. Étude comparative de tríos disinés au diagnostic sérologique du kala-azar. *Bull. Soc. Pat. Exot.* 1935;28:658-665.

Nicolau S, Peard CH. Étude histo-physio-pathologique de l'oeil et du système nerveux dans la leishmaniose généralisée du chien. *Ann. Inst. Pasteur.* 1936;5:463-4485.

Nicollato RC et al. Clinical Forms of Canine Visceral Leishmaniasis in Naturally *Leishmania infantum*- Infected Dogs and Related Myelogram and Hemogram Changes. *PLOS ONE.* 2013;8(12). E82947.

Nicolle C. Nouvelles acquisitions sur le kala-azar: culture; inoculation au chien; etiologie. *Compte rendu hebdomadaire des Sciences de l'Academie des Sciences.* 1908;87:7-13.

Nogueira J L, Silva MVM, Passos CC, Ambrósio CE. A importância da Leishmaniose Visceral Canina para a Saúde Pública: Uma Zoonose Reemergente. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.* Ano VII, n. 13, p12, 2009.

Oliveira-Neto MP, Martins VJ, Mattos MS, Pirmez C, Brahin LR, Benchimol E. South American cutaneous leishmaniasis of the eyelids: report of five cases in Rio de Janeiro State, Brazil. *Ophthal.* 2000;107(1):169-72.

Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza CSF, Fernandes O, Pirmez C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis . *Int. J. Dermatol.* 1998;37:846-849.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Informe Leishmanioses Nº 2 - Junho de 2014. Informe Epidemiológico das Américas. <http://new.paho.org/leishmaniasis> . 1-4p.

Pace D. Leishmaniasis. *J Infect.* 2014;69(1):S10-8.

- Paciello O, et al. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. *Neuromuscular disorders* 2009, 124-130.
- Patel AP, Deacon A, Getti G. Development and validation of four *Leishmania* species constitutively expressing GFP protein. A model for drug discovery and disease pathogenesis studies. *Parasitology*. 2014;141(4):501-10.
- Patel G, Roncal NE, Lee PJ, Leed SE, Erath J, Rodriguez A, Sciotti RJ, Pollastri MP. Repurposing human Aurora kinase inhibitors as leads for anti-protozoan drug discovery. *Med. Chem. Comm.* 2014;5(5):655-658.
- Peña M.T., et al. Histopathological Features of Ocular Leishmaniosis in the Dog. *J. Comp. Path.* 2008;138:32-39.
- Peña MT, et al. Ocular and Periocular manifestations in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet. Ophthalmol.* 2000;3:35-41.
- Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Bras Med* 1934;48:949-50.
- Prata A, Silva LA. Calazar. In: Coura JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e Parasitária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.p.713-732.
- Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* 2007;9(11):1307-15.
- Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol.* 2014;6:147-54.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006;81(1):68-75.
- Reis LE, Coura-Vital W, Roatt BM, Bouillet LÉ, Ker HG, Fortes de Brito RC, Resende Dde M, Carneiro M, Giunchetti RC, Marques MJ, Carneiro CM, Reis AB. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol.* 2013;197(3-4):498-503.

- Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. J Clin Microbiol. 2002 Jul;40(7):2352-6.
- Reithinger R, Mohsen M, Wahid M, Bismullah M, Quinnell RJ, Davies CR, Kolaczinski J, David JR. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. Clin Infect Dis. 2005;40(8):1148-55.
- Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, Costa RT, Mayrink W, Reis AB, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(2):197-203.
- Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. Br Med J. 1903a;2(2237):1261-2.
- Roze M. Manifestations oculaires de la leishmaniose canine. Rec Med Vet 1986; 162:19-26.
- Sambrook J & Russell DW. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. In: Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press, App 8, Vol 3, 3rd edition. 2001.
- Santos JM, Dantas-Torres F, Mattos MR, Lino FR, Andrade LS, Souza RCA, Brito FLC, Brito MEF, Brandão-Filho SR, Simões-Mattos L. Prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop. 2010 Jan-Feb;43(1):41-5.
- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. Med. Vet. Entomol.1998;2: 315-317.
- Sarker CB et al. Sensitivity os splenic and bone marrow aspirate study for diagnosis of Kala-zar. Mumensingh Med J.2004;13(2):130-3.

- Shourek W, Laskay T. Eye-related parasitic diseases. In: Tabbara KF, Hyndiuk RA, eds. Infections of the eye, 1st ed. Boston. Little, Brown, 1986,167-207.
- Silva FS. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. Rev Trop: Ci Agr Biol 2007; 1:20-31
- Silva-Almeida M, Carvalho LO, Abreu-Silva AL, d'Escoffier LN, Calabrese KS. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection: Muscular involvement in BALB/c and C3H.HeN mice. Exp Parasitol. 2010 Mar;124(3):315-8. doi: 10.1016/j.exppara.2009.11.006. Epub 2009 Nov 26
- Slappendel APPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. Vet. Quart. 1988;10:1-16.
- Slappendel RJ. Leishmaniasis. In (Ed. Greene C) Microbiology and Infectious Diseases of Dogs and Cats. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998:450-458.
- Strauss-Ayali D, Baneth G, Jaffe CL. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. Vet Res. 2007;38(4):547-64.
- Strauss-Ayali, D., & Baneth, G. (2000). Canine Visceral Leishmaniasis Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Ithaca, New York, USA: International Veterinary Information Service(IVIS)
- Tasca IK et al. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. Rev Bras. Parasitol. Vet. 2009;18(1):27-33.
- Tedesco RC. Alterações morfológicas na retina de camundongos C57BL/6 infectados com *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa, Sarcocystidae). Rio de Janeiro; 2003. Doutorado [Dissertação em Biologia Molecular e Celular]- Instituto Oswaldo Cruz.
- Terakado K. et al. Marked Depletion of the Water Channel Protein, AQP5, in the Canine Nictitating Membrane Glands Might Contribute to the Development of KCS. Veterinary Pathology. 50. 2012.(4) 664-667.
- Tolezano JE, Juliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JÁ, Barbosa JE, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. The first records of *Leishmania (Leishmania)*

amazonensis in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 2007;149(3-4):280-284.

Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84(5):676-7.

Trópia de Abreu R, Carvalho Md, Carneiro CM, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Coura-Vital W, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Plos One*, 2011;6(5):1-9.

Turner S. M. *Oftalmologia em Pequenos Animais*. Elsevier. 2010.

Ul Bari A, Rahman SB. Many faces of cutaneous leishmaniasis. *Ind J Dermatol Venereol Leprol* 2008;74:23–7.

Universidade Federal do Maranhão. Comportamento térmico no centro histórico e comercial de São Luís-MA. Visitado em 8 de fevereiro de 2015.

Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec.* 2000;146(24):698-703.

Veraldi S, Bottini S, Currò N, Gianotti R. Leishmaniasis of the eyelid mimicking an infundibular cyst and review of the literature on ocular leishmaniasis. *Int J Infect Dis.* 2010;14(3):e230-2.

Viana, FAB. *Guia Terapêutico Veterinário*. Editora. Cem. 2º edição. 2014

Vianna GMC, et al 2011 Relationship between rainfall and temperature: observations on the cases of visceral leishmaniasis in São Luis Island, State of Maranhão, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.44 no.6 Uberaba Nov./Dec. 2011

Vinetz JM, Soong L. *Leishmania mexicana* infection of the eyelid in a traveler to Belize. *Braz J Infect Dis.* 2007;11(1):149-52.

Werneck GL Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. Cad Saude Publica. 2008;24(12):2937-40

WHO, 2010. The disease and its epidemiology. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis.2012. Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en>. Acesso em: 6 jul. 2013.

Williams, D.L. et al. Immunopathogenesis of Keratoconjunctivitis Sicca in the Dog. Vet Clin Small Anim 38 (2008) 251-268.

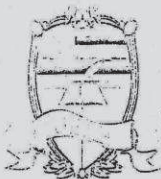
Zanette, MF, Lima, VMF, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFC, Biondo AW, Marcondes M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2014;47:105–10.

Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. Cad. Saúde Pública. 2010; 26(4):644-645.

8

ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA



LABORATÓRIO DE ANATOMOPATOLOGIA

Termo de Doação

Eu, _____, RG _____

residente e domiciliado _____

Informo a doação do meu animal abaixo identificado e, cuja responsabilidade é minha, para a realização de estudos científicos, em virtude do mesmo apresentar doença incurável e que acarreta sofrimento prolongado ao mesmo. Estou ciente e perfeitamente esclarecido dos exames necroscópico, citopatológico e histopatológico a serem realizados.

Nome _____ Espécie _____ Raça _____

Sexo _____ Idade _____

São Luís, ____/____/____

Assinatura

Anexo 2



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
 Departamento de Protozoologia – Lab. de Imunomodulação

FICHA CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA PARA LEISHMANIOSE CANINA

Localidade: _____ Nº Registro: _____ DATA: __/__/__

Veterinário: _____

Referências geográficas:

Latitude	Longitude	Altitude

I. Identificação do Animal:

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: () macho () fêmea Raça: _____

Pelagem predominante: () branca () preta () dourada () marrom () outra _____

Tipo de pelagem: () longo () curto

Nome proprietário: _____

Endereço atual: _____

Nº: _____ Bairro: _____ Município: _____ Tel: _____

Zona Rural () Zona urbana ()

II. Dados epidemiológicos

1) Procedência do animal: _____

2) O animal costuma caçar? () Sim () Não. Onde? _____

3) Tipo de residência: () fixa () veraneio Tempo de moradia _____

4) Nº de cães na casa? _____ () Fixos () Esporádicos

5) Possui outro(s) animal(is)? () sim () não
 () galinha, pato ou peru (...) porcos () gato () cavalo, burro, jegue
 () outros: _____

6) A casa é próxima à: () Mata () plantações () bananal () coleção de água () terreno baldio () criações de animais () outras casas

7) Vê na propriedade: () entulho () carrapato () mosquitos () animais silvestres.
 Quais: _____

III- Teste de Shimer

Positivo () Negativo ()

Observações:

IV- Teste Fluoresceína

Positivo () Negativo ()

Observações:

Tratamento(s): () Sim () Não. Qual? _____

Vacinas: () Sim () Não. Qual : _____

Vermifugação: () Sim () Não. Qual? _____

Ectoparasitos: () Sim () Não. Qual? _____

Outras observações:

IV) Exames laboratoriais:

Sorologia para leishmaniose : () Sim () Não

DPP- _____

Cultura para *Leishmania*: () Sim () Não

Medula: () Sim () Não Linfonodo: () Sim () Não Não Biópsia de pele: () Sim () Não

Outros: _____

Resultados

RIFI - _____

ELISA - _____

Cultura - punção Medular - _____

Cultura - pele - _____

Cultura - linfonodo - _____

Observações:

8) Mosquito:

manhã tarde noite
 verão outono inverno primavera

9) Qual o número de moradores da casa? _____

10) Usa algum tipo de proteção contra insetos? (...)sim não. Qual? _____

12) A casa já foi dedetizada? sim não

13) Quando? _____ Quantas vezes? _____

14) Costuma viajar com frequência para algum lugar? sim não. Onde? _____

II. Exame clínico cão

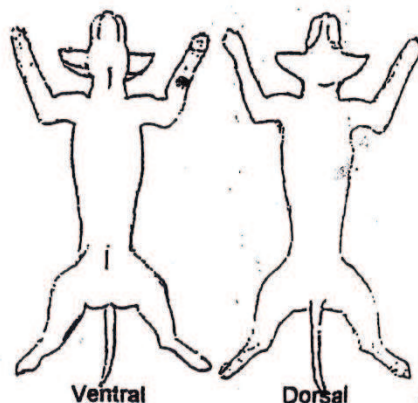
Queixa(s) principal(is):

apatia emagrecimento febre falta de apetite onicogribose
 epistaxes descamação Hepatoesplenomegalia linfadenopatia
 Alopecia. Onde? _____ Mucosas? _____

Lesões: sim não

ponta de orelha focinho ao redor dos olhos outras partes. Onde: _____

Outros:



Anexo 3- Sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís – MA

Animal	Alopécia	Caquexia	Onicogribose	Lesão de Pele	Linfoadenopatia	Hepatoesplenomegalia
01	X	X	X	X	X	
02	X	X	X	X	X	X
03	X	X	X	X	X	X
04	X	X	X	X	X	X
05	X	X		X	X	
06		X			X	X
07	X	X	X	X	X	X
08	X	X	X	X	X	X
09	X	X	X		X	
10	X	X	X		X	
11	X	X	X	X	X	X
12	X	X		X	X	
13		X			X	
14	X	X	X	X	X	
15				X	X	
16	X	X			X	
17		X		X	X	
18	X	X	X		X	
19	X	X		X	X	X
20	X	X	X		X	
21	X	X	X	X	X	X
22	X	X	X	X	X	
23	X	X	X	X	X	
24		X		X	X	X
25		X		X	X	X

Anexo 4 – Alterações histopatológicas encontradas na pálpebra, córnea, esclera, coróide, retina, coróide, retina, glândulas e músculo retroorbital de cães com leishmaniose visceral provenientes da localidade Cidade Operária, São Luís - MA

Animais	Pálpebra	Córnea	Esclera	Coróide	Retina	Glândula	Músculo
1	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso; Células de Mott e associações perivasculares; presença de parasito; Degeneração hialina.	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso com edema de córnea e presença de parasitos	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso com formas amastigotas	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado com presença de parasitos, desorganização do estroma	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso, edema, rabdomiólise segmentar, miócitos com amastigotas
2	Infiltrado inflamatório plasmocitário leve	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso	Infiltrado inflamatório plasmocitário leve	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado
3	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso com associação perivascular; Presença de parasito	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso com edema	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado
4	Infiltrado inflamatório plasmocitário leve; ectasia de vaso linfático com valva; Células gigantes e células de Mott	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado; presença de exudato em ducto de glândula	Sem alteração

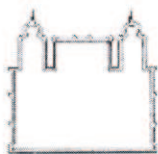
5	Infiltrado inflamatório plasmocitário leve	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
6	Edema; infiltrado inflamatório plasmocitário leve com associações perivasculares	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
7	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso e célula de Mott	Sem alteração	Hiperplasia	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso	Sem alteração	Intenso infiltrado neutrofílico ao redor da fibra muscular
8	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário leve
9	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado perivascular
10	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso; presença de parasito	Presença de exudato	Sem alteração	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso	Sem alteração	Sem alteração
11	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário	Sem alteração	Leve infiltrado inflamatório linfocitário focal

			leve					
12	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso com presença de macrófagos parasitados com formas amastigotas; eventuais neutrófilos e pus.	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso com edema; presença de formas amastigotas, intenso grau de necrose	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso, com formas amastigotas	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
13	Infiltrado inflamatório plasmocitário leve	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Leve infiltrado inflamatório plasmocitário
14	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso com presença de macrófagos parasitados com formas amastigotas; presença de exudato	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado	Sem alteração	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado	Edema, infiltrado inflamatório plasmocitário moderado
15	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário intenso
16	Intenso infiltrado plasmocitário com presença de	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração

	macrófagos								
17	Moderado infiltrado inflamatório plasmocitário focal com associação perivascular, presença de parasito	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Desorganização de estroma, presença de pus, Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado
18	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
19	Infiltrado inflamatório plasmocitário leve à moderado	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
20	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
21	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado intersticial
22	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
23	Infiltrado inflamatório plasmocitário moderado associado à alguns neutrófilos	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
24	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Infiltrado inflamatório plasmocitário leve
									Infiltrado inflamatório moderado linfoplasmocitário entre fibras
									Sem alteração

25	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	leve à moderado	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração

Anexo 5



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Oswaldo Cruz
 Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose
 Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz
 Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania*
 Av. Brasil, 4365, Pavilhão Leônidas Deane, salas 116 / 502 / 502-A / 509 / 509-A
 CEP: 21040-360 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
 Tel.: 55(21) 3865-8195/3865-8172/3865-8226, Fax.: 55(21) 3865-8195



RELATÓRIO DE ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* POR ELETROFORESE DE ENZIMAS

Solicitação (s) nº: 073/2013

Solicitante: Kátia da Silva Calabrese

Instituição: Instituto Oswaldo Cruz

Endereço Completo: Av Brasil 4365 pavilhão 108 Manguinhos Rio de Janeiro, RJ, CEP 21040-360

Data da entrada da amostra: 18/11/2013

Data da liberação do resultado: 29/01/2014

RE 004/2014

Amostra	Ordem de Entrada	Forma de recebimento	Resultado da caracterização	IOC-L
001 medula óssea	140/2013	cultura	<i>L. infantum</i>	3504
002 medula óssea	141/2013	cultura	<i>L. infantum</i>	3505
002 baço	142/2013	cultura	<i>L. infantum</i>	3506
03 baço	143/2013	cultura	<i>L. infantum</i>	3507
03 medula óssea	144/2013	cultura	<i>L. infantum</i>	3508
04 medula óssea	145/2013	cultura	<i>L. infantum</i>	3509
04 baço	146/2013	cultura	<i>L. infantum</i>	3510
07 baço	147/2013	cultura	<i>L. infantum</i>	3511
---		---	---	

Obs: ---

Enzimas ensaiadas:

<input type="checkbox"/> ME	<input type="checkbox"/> MDH	<input type="checkbox"/> ACP	<input checked="" type="checkbox"/> G6PDH	<input type="checkbox"/> PGM	<input checked="" type="checkbox"/> 6PGDH	<input type="checkbox"/> GPI	<input type="checkbox"/> FLIM	<input type="checkbox"/> MPL
<input checked="" type="checkbox"/> IDH	<input type="checkbox"/> IDH	<input type="checkbox"/> PEPD	<input type="checkbox"/> PEPD2	<input type="checkbox"/> PEPD3	<input type="checkbox"/> ACON	<input type="checkbox"/> HK	<input type="checkbox"/> NH	
<input checked="" type="checkbox"/> NADP	<input type="checkbox"/> NAD							

Método utilizado: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) seguindo protocolo descrito em
 Cupolillo et al 1994. Am. J. Trop. Med. Hyg.

Registro do ensaio:

Arquivo de ensaio isoenzimático: 42/2013; 47/2013

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

A CLIOC informa que a amostragem enviada e a veracidade das informações associadas são de total responsabilidade do depositante/cliente.

Responsável LRNTL/CLIOC

Rio de Janeiro, 30 de janeiro de 2014



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Oswaldo Cruz



Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC - WDCM 731
 Serviço de isolamento, cultivo, tipagem e doação de *Leishmania*

**RELATÓRIO DE ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE LEISHMANIA
 POR ELETROFORESE DE ENZIMAS**

Solicitação (s) nº: 059/2014; 060/2014

RE 033/2014

Solicitante: Kátia da Silva Calabrese

Instituição: Instituto Oswaldo Cruz

Endereço Completo: Av Brasil 4365 Pavilhão 108 Sala 45

Data da entrada da amostra na CLIOC: 01/10/2014 Data da liberação do resultado: 09/12/2014

Amostra	Ordem de Entrada CLIOC	Forma de recebimento	Resultado da caracterização	IOC-L
15H	068/2014	cultura	<i>L. infantum</i>	3553
17 baço	069/2014	cultura	<i>L. infantum</i>	3554
18 baço	071/2014	cultura	<i>L. infantum</i>	3555
18 medula	072/2014	cultura	<i>L. infantum</i>	3556
19 baço	073/2014	cultura	<i>L. infantum</i>	3557
21 baço	074/2014	cultura	<i>L. infantum</i>	3558
Poodle Fêmea	076/2014	cultura	<i>L. infantum</i>	3559
---		---	---	---
---		---	---	---

Obs: As amostras 15 baço (067/2014), 17 medula (070/2014) e 075/2014 (Poodle Macho) foram descartadas devido à presença de contaminação bacteriana.

Enzimas ensaiadas:

ME	MDH	ACP	G6PDH	PGM	6PGDH	GPI	FUM	MPI
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IDH	IDH	PEPD	PEPD2	PEPD3	ACON	HK	NH	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
NADP	NAD							
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							

Método utilizado: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) seguindo protocolo descrito em Cupolillo et al 1994. Am. J. Trop. Med. Hyg.

Registro do ensaio:

Arquivo de ensaio isoenzimático 20, 22 e 23 (Nº) / 2014 (ANO)

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

A CLIOC informa que a amostragem enviada e a veracidade das informações associadas são de total responsabilidade do depositante/cliente.

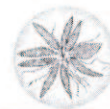
Responsável LRNTL/CLIOC

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2014

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos - Rio de Janeiro, RJ - CEP 21040-360 - Brasil
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar - salas 509,502: 1º andar - sala 116
 Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 - Fax: (0055) (21) 3865-819



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Oswaldo Cruz



Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC - WDCM 731
 Serviço de isolamento, cultivo, tipagem e doação de *Leishmania*

**RELATÓRIO DE ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*
 POR ELETROFORESE DE ENZIMAS**

Solicitação (s) nº: 061/2014; 062/2014

RE 034/2014

Solicitante: Kátia da Silva Calabrese

Instituição: Instituto Oswaldo Cruz

Endereço Completo: Av Brasil 4365 Pavilhão 108 Sala 45

Data da entrada da amostra na CLIOC: 07/10/2014 Data da liberação do resultado: 09/12/2014

Amostra	Ordem de Entrada CLIOC	Forma de recebimento	Resultado da caracterização	IOC-L
20M	077/2014	cultura	<i>L. infantum</i>	3560
23M	078/2014	cultura	<i>L. infantum</i>	3561
---		---	---	---
---		---	---	---
---		---	---	---
---		---	---	---
---		---	---	---
---		---	---	---
---		---	---	---

Obs: ---

Enzimas ensaiadas:

ME	MDH	ACP	G6PDH	PGM	6PGDH	GPI	FUM	MPI
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IDH	IDH	PEPD	PEPD2	PEPD3	ACON	HK	NH	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
NADP	NAD							
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							

Método utilizado: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) seguindo protocolo descrito em Cupolillo et al 1994, Am. J. Trop. Med. Hyg.

Registro do ensaio:

Arquivo de ensaio isoenzimático 20 e 23 (Nº) / 2014 (ANO)

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de *Leishmania* doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://clioc.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

A CLIOC informa que a amostragem enviada e a veracidade das informações associadas são de total responsabilidade do depositante/cliente.

Responsável LRNTL/CLIOC

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2014

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos - Rio de Janeiro, RJ - CEP 21040-360 - Brasil
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar - salas 509,502; 1º andar - sala 116
 Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 - Fax: (0055) (21) 3865-819

Anexo 6

LISTA DE SOLUÇÕES UTILIZADAS

Eosina alcoólica

Eosina 5 g

Água destilada 200 mL

Álcool absoluto 800 mL

Ácido acético glacial 5 mL

Dissolver a eosina na água e adicionar o álcool. Adicionar o ácido acético no momento do uso

Formol 10%

Formol 100 mL

Água destilada em quantidade suficiente para (qsp) 1000 mL

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina 5 g

Álcool absoluto 50 mL

Alúmen de potássio ou amônia 100 g

Óxido vermelho de mercúrio 2,5 g

Água qsp 1000 mL

Dissolver a hematoxilina no álcool. Dissolver o alúmen na água aquecendo sem ferver. Retirar do fogo e misturar os dois. Ferver por 1 minuto no máximo. Colocar o óxido lentamente, agitar bem e retornar ao fogo até a solução adquirir cor púrpura. Esfriar imediatamente na água fria.

Hematoxilina de Mayer

Hematoxilina 1 g

NaIO₃ 0,2 g

Alúmen de potássio ou amônio 50 g

Água destilada qsp 1000 mL

Dissolver a hematoxilina na água aquecendo suavemente. Acrescentar o iodato e o alúmen. Agitar até a completa dissolução.

Parafina histológica

Parafina purificada com 5% de cera de abelhas (56 a 58°C).

Solução estoque de eosina a 0,5%

Eosina Y amarela 1 g

Água qsp 200 mL.