

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

DANIELLE JORDANY BARROS COUTINHO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E MOLECULAR DAS
ALTERAÇÕES NA MEDULA ESPINHAL EM CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

DANIELLE JORDANY BARROS COUTINHO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E MOLECULAR DAS
ALTERAÇÕES NA MEDULA ESPINHAL EM CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Trabalho de Qualificação apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA – Campus Paulo VI.

Orientador(a): Alcina Vieira de Carvalho Neta

Co-orientador: Fernando Almeida de Souza

São Luís
2020

DANIELLE JORDANY BARROS COUTINHO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E MOLECULAR DAS
ALTERAÇÕES NA MEDULA ESPINHAL EM CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

BANCA DE QUALIFICAÇÃO

Profa. Dra. Alcina Vieira de Cravalho Neta
Orientadora PPGCA - UEMA

Profa. Dra. Andrea Pereira da Costa
Membro Interno PPGCA - UEMA

Profa. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos
Membro Externo UEMA

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma antroponose de caráter crônico progressivo que tem como agente etiológico o protozoário intracelular obrigatório *Leishmania infantum*. Os animais acometidos por esta doença podem apresentar-se assintomáticos ou sintomáticos, manifestando uma diversa gama de sinais clínicos. As formas amastigotas de *Leishmania* podem ter uma ampla distribuição em tecidos de cães, o que pode resultar em manifestações clínicas atípicas, como distúrbios neurológicos, decorrentes do envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC). Essas manifestações costumam ser resultantes de uma resposta inflamatória exacerbada frente à infecção, o que determina a deposição de imunocomplexos nesses órgãos, sugerindo que esses sinais sejam resultantes de um desequilíbrio da resposta imunológica do hospedeiro. Há poucos trabalhos na literatura que demonstram o envolvimento do SNC em cães com leishmaniose visceral. Com isso, o presente estudo objetiva caracterizar as alterações imunopatológicas teciduais ocorridas na medula espinhal de cães com LVC naturalmente infectados, determinando e caracterizando as possíveis alterações histopatológicas, dando ênfase nas características imuno-histoquímicas, histopatológicas e moleculares. Para tanto, foram coletados fragmentos da medula espinhal correspondentes às porções cervical, torácica e lombar de 20 cães de ambos os sexos, naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Macroscopicamente, não foram observadas lesões na medula espinhal em nenhum dos animais avaliados neste estudo. A análise histopatológica demonstrou alterações em tecidos de medula espinhal de 13 animais, sendo que as lesões observadas foram caracterizadas como discretas e multifocais e, a maioria, de natureza degenerativa, caracterizadas como cromatólise central, satelitose e vacuolização do neurópilo (degeneração Walleriana). Na imuno-histoquímica, foi possível detectar antígenos de *Leishmania* sp. na medula espinhal de 5 cães e, por meio da qPCR, foi detectado o DNA do parasito em, pelo menos, duas porções (cervical, torácica e/ou lombar) da medula espinhal de todos os animais analisados. Este trabalho demonstra que a medula espinhal de cães pode ser acometida durante a infecção por *Leishmania* e que as lesões, quando presentes, são microscópicas.

Palavras chave: LVC. Medula espinhal. SNC.

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a chronic anthroponosis of progressive character whose etiological agent is the obligate intracellular protozoan *Leishmania infantum*. Animals affected by this disease may be asymptomatic or symptomatic, manifesting a diverse range of clinical signs. Amastigote forms of *Leishmania* may have a wide distribution in dog tissue, which may result in atypical clinical manifestations, such as neurological disorders, resulting from central nervous system (CNS) involvement. These manifestations are usually the result of an exacerbated inflammatory response to infection, which determines the deposition of immune complexes in these organs, suggesting that these signals are the result of an imbalance of the host immune response. There are few studies in the literature demonstrating CNS involvement in dogs with visceral leishmaniasis. Thus, the present study aims to characterize the tissue immunopathological changes that occurred in the spinal cord of naturally infected dogs with CVL, determining and characterizing the possible histopathological changes that occurred in the spinal cord, emphasizing the immunohistochemical, histopathological and molecular characteristics. To this end, we collected fragments of the spinal cord corresponding to the cervical, thoracic and lumbar portions of 20 dogs of both sexes, naturally infected with *Leishmania infantum*. Macroscopically, no spinal cord injuries were observed in any of the animals evaluated in this study. Histopathological analysis showed alterations in spinal cord tissues of 13 animals, and the lesions observed were characterized as discrete and multifocal and, most of them, degenerative in nature, characterized as central chromatolysis, satellitosis and vacuolization of the neuropile (Wallerian degeneration). In immunohistochemistry, it was possible to detect *Leishmania* sp. in the spinal cord of 5 dogs and, through qPCR, parasite DNA was detected in at least two portions (cervical, thoracic and / or lumbar) of the spinal cord of the analyzed animals. This study demonstrates that dogs' spinal cord can be affected during *Leishmania* infection and that the lesions, when present, are microscopic.

Keywords: CVL. Spinal cord. qPCR. IHC

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sinais clínicos relacionados à LVC.	31
Figura 2 - Produtos de PCR separados por eletroforese e visualizados em gel de agarose 1,5%.	33
Figura 3 - Microscopia de luz, medula espinhal, cão..	35
Figura 4 - Imuno-histoquímica em tecido de medula espinhal de cães naturalmente infectado com LV.....	37
Figura 5 - Carga parasitária entre grupos sintomáticos e assintomáticos de cães com LV.....	39
Figura 6 - Carga parasitária por porção de medula espinhal em cães sintomáticos e assintomáticos para LV.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de iniciadores utilizados no diagnóstico diferencial.....	26
Tabela 2. Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real.....	28
Tabela 3. Frequência de sinais clínicos observados em cães positivos para Leishmaniose Visceral.....	30
Tabela 4. Resultados do teste sorológico e molecular.....	32

LISTA DE SIGLAS

BHE - Barreira Hematoencefálica

BSA - Barreira Sangue – Aracnoide

BSLCR - Barreira Sangue - Líquido Cefalorraquidiano

CEEA - Comitê de Ética e Experimentação Animal

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

DAB - Diaminobenzidina

DNA - Do inglês *Desoxyribonucleic acid*, traduzido como ácido desoxirribonucleico

ELISA - Do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*, traduzido como Ensaio Imunoenzimático

HE - Hematoxilina e Eosina

IFN- γ - Interferon Gama

IgG - Imunoglobulina G

IHQ - Imuno-histoquímica

IL – Interleucina

iNOS ou NOS2 - Enzima óxido nítrico sintase induzível

kDNA - DNA do cinetoplasto

LC - Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MS - Ministério da Saúde

NK – Do inglês *natural killer*

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PAHO - Do inglês *Pan American Health Organization*, traduzido como Organização Pan-Americana da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR - PCR em Tempo Real

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

SN - Sistema Nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

UEMA - Universidade Estadual do Maranhão

WHO - Do inglês *World Health Organization*, traduzido como Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Dados epidemiológicos mundiais sobre Leishmaniose	13
2.2 Leishmaniose Visceral Canina e aspectos imunológicos	15
2.3 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.....	17
2.4 Leishmania spp. no Sistema Nervoso Central	19
3. METODOLOGIA	24
3.1 Comitê de Ética	24
3.2 Animais e colheita de amostras	24
3.3 Histologia	26
3.4 Imuno-histoquímica	26
5 Extração de DNA	27
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	27
3.7 Quantificação da carga parasitária das amostras por qPCR	28
3.8 Extração de RNA	29
3.9 Síntese de cDNA	29
3.10 Expressão de citocinas por PCR em tempo real (qPCR).....	29
3.11 Análise Estatística	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Avaliação clínica, sorológica e molecular para diagnóstico de LVC	32
4.2 Lesões na medula espinhal de cães com LVC	36
4.3 Marcação de antígenos de Leishmania na medula espinhal	39
4.4 Detecção do DNA e quantificação da carga parasitária de L. infantum na medula espinhal	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias disseminadas no Velho e Novo Mundo com grande diversidade epidemiológica. São causadas por cerca de 20 espécies de parasitas do gênero *Leishmania*, protozoário transmitido pela picada de insetos vetores. Dentre as leishmanioses, a leishmaniose visceral canina (LVC), causada pela *Leishmania infantum*, é uma doença grave, muitas vezes fatal, comum na região do Mediterrâneo e na América Latina (BANETH et al., 2008).

A LVC caracteriza-se por ser uma doença parasitária sistêmica crônica que representa um grave problema de saúde pública, considerada uma zoonose de importância mundial (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A doença possui como agentes etiológicos os protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania*, que afetam células do sistema mononuclear fagocítico de mamíferos, sendo encontrados na forma amastigota meio intracelular (PITTA et al., 2009); e, como vetores biológicos, flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, do qual cerca de 90% das espécies ocorrem nas regiões tropicais e são consideradas patogênicas (TORRES-GUERRERO et al., 2017). A doença apresenta caráter heteroxeno, necessitando de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado para conclusão de seu ciclo. As interações entre o parasito, vetores e os hospedeiros vertebrados estão relacionadas ao mecanismo de transmissão da doença, o qual ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos, infectadas após repasto sanguíneo (DANTAS-TORRES et al., 2012; SHAW, 2003).

Nas regiões urbanas, os cães são considerados os principais reservatórios da leishmaniose visceral (OPAS, 2009; OLIVEIRA et al., 2017), fato que atribui a estes um papel crucial na cadeia epidemiológica da enfermidade (CHICHARRO et al., 2002). Porém, assim como os cães domésticos, canídeos silvestres são igualmente susceptíveis à infecção por *Leishmania* e podem vir a óbito pela LV, bem como gatos domésticos e outros animais sinantrópicos, os quais podem estar envolvidos com a transmissão da doença (DA SILVA et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2012).

O desenvolvimento dos sinais clínicos na LVC costuma ter um caráter crônico e progressivo, cursando com a disseminação do parasito por órgãos que compõem o sistema mononuclear fagocítico, tais como o baço, linfonodos, fígado e medula óssea (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008; GIUNCHETTI et al., 2008). Clinicamente, a LVC pode apresentar-se tanto de forma assintomática quanto de forma sintomática, na qual ocorre o envolvimento de órgãos como linfonodos, baço, fígado, pele e, até mesmo de olhos, levando a

um amplo espectro de sinais clínicos, que incluem linfadenomegalia superficial generalizada, hepatoesplenomegalia, oftalmopatias, dermatopatias caracterizadas por onicogribose, alopecia, descamação, úlceras cutâneas, principalmente no focinho e orelha, e hiperkeratose (ABREU-SILVA et al., 2008). Contudo, é preciso enfatizar que, tanto animais sintomáticos quanto assintomáticos infectados por *L. infantum*, são importantes fontes de infecção para os flebotomíneos e funcionam como reservatórios do parasito, logo, animais assintomáticos também participam, portanto, do ciclo de transmissão da doença (MOHAMMADIHA et al., 2012).

Tendo em vista a variação de sinais clínicos observados em cães portadores da LVC, a resposta imunológica do hospedeiro mostra-se como um elemento fundamental ao controle da infecção, eliminação do parasito ou diminuição da carga parasitária, resultando em um hospedeiro assintomático; ou a plena propagação do parasito e apresentação de manifestações clínicas variadas da doença, caracterizando o hospedeiro sintomático (ALBUQUERQUE, 2013; BRUNO et al., 2019).

Adicionalmente, formas amastigotas de *L. infantum* podem se distribuir amplamente no organismo do hospedeiro, resultando em manifestações clínicas atípicas (TAFURI et al., 2004), tais como nefropatias (COSTA et al., 2003), cardiopatias e pneumopatias (TORRENT et al., 2005), envolvimento do sistema genital (AMARA et al., 2009) e, também, desordens neurológicas (BLAVIER et al., 2001). Essas manifestações, geralmente, resultam de uma resposta imune exacerbada frente à infecção, que determina a deposição de imunocomplexos nesses órgãos causando nefrites, glomerulonefrites, insuficiência renal, hepatite crônica e insuficiência renal dentre outros sintomas (Ferrer, 1992; Noli, 1999)

Estudos da patogênese da LVC, acreditam ou sugerem, dessa forma, que estas lesões atípicas observadas no curso da infecção por *L. infantum* sejam resultantes de um desequilíbrio da resposta imunológica do hospedeiro (BANETH et al., 2008; PACIELLO et al., 2009; NARANJO et al., 2010).

Apesar de a LVC ser uma doença de grande destaque em saúde pública e na rotina veterinária, são escassos os estudos que abordam o aparecimento de sinais neurológicos como resultantes da infecção por *L. infantum*, indicando envolvimento do Sistema Nervoso Central. Mesmo na ausência de sintomas neurológicos, alterações histopatológicas no sistema nervoso de cães acometidos pela doença já foram descritas (SCHWARDT et al., 2012). Dentre elas, cita-se a ocorrência de leptomeningite, coroidite, congestão vascular, infiltrado de células inflamatórias, gliose, satellitose, neuronofagia e degeneração neuronal (GARCÍA-ALONSO et

al., 1996; NIETO et al., 1996). Nesse mesmo contexto, já foram demonstradas formas amastigotas de *Leishmania* sp. em células endoteliais, linfócitos e macrófagos do plexo coroide e em histiócitos nas meninges de cães acometidos pela doença, sendo estas lesões sempre relacionadas a respostas ou mecanismos de ação do sistema imunológico (NIETO et al., 1996; MÁRQUEZ et al., 2013).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as alterações ocorridas na medula espinhal de cães com LVC naturalmente infectados, determinando possíveis lesões e/ou alterações histopatológicas na medula e meninges, além de identificar antígeno *in situ* por meio da imuno-histoquímica, assim como detectar o DNA do cinetoplasto de *L. infantum* e quantificar a carga parasitária por meio da qPCR, para que ao confirmar a presença do parasito na medula e estabelecer o perfil de expressão de citocinas na medula espinhal de cães com LVC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dados epidemiológicos mundiais sobre Leishmaniose

A leishmaniose consiste em uma doença parasitária sistêmica de caráter crônico causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, considerado o patógeno mais comum do mundo (WILHELM, 2019), os quais são transmitidos através da picada de insetos vetores do gênero *Lutzomyia* (CARVALHO et al., 2019).

A doença pode se classificar de três formas clínicas: leishmaniose visceral (LV), comumente chamada de calazar, representa a forma mais grave, podendo ser letal na maioria dos casos quando não tratada, e se caracteriza por sintomas irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia; leishmaniose cutânea (ou tegumentar – LC ou LT), forma mais comum que causa lesões na pele do indivíduo acometido, como úlceras, levando a cicatrizes permanentes e sérias incapacidades; e a leishmaniose mucocutânea, que causa destruição parcial ou total de membranas mucosas, sobretudo do nariz, boca e garganta (ALMEIDA-SOUZA et al., 2016; WHO, 2018).

Com relação à sua ocorrência, a LV apresentava-se como uma doença eminentemente rural, no entanto, nos últimos tempos, expandiu-se para áreas urbanas (BRASIL, 2014). Acredita-se que a adaptação das espécies vetoriais ao meio urbano ocorreu devido à ocupação antrópica desordenada do espaço geográfico, contribuindo, assim, para a distribuição da Leishmaniose em diversas regiões do mundo (CARVALHO et al., 2019). Essa enfermidade apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que podem levar seus

hospedeiros a quadros irreversíveis, resultando em óbito (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A leishmaniose visceral é endêmica em mais de 60 países ao redor do mundo. Consiste em uma doença tropical negligenciada e representa um grave problema de saúde pública mundial, podendo ser encontrada em todos os continentes, exceto a Oceania. Sua ocorrência está vinculada, diretamente, à pobreza, deslocamentos populacionais, falta de saneamento básico, sistema imunológico enfraquecido e escassez de recursos para controle e tratamento da mesma (WHO, 2018; WILHELM, 2019).

Estima-se que, aproximadamente, 1 milhão de novos casos humanos ocorram por ano, dos quais 300.000 são viscerais e 1 milhão são cutâneos ou mucocutâneos, causando cerca de 30.000 mortes por ano em todo o mundo (ALMEIDA-SOUZA et al., 2016; SOUZA et al., 2019).

Recentemente, a Organização Pan-Americana de Saúde (*Pan American Health Organization* – PAHO, 2018) publicou uma estimativa que afirma que cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral documentados ocorrem em seis países, sendo eles o Brasil, Etiópia, Índia, Bangladesh, Sudão e Sudão do Sul. Em 2016, o número de casos confirmados de LV em humanos no Brasil girou em torno de 3.200. Dentre os Estados brasileiros, o Maranhão se destaca como endêmico para a enfermidade e, no ranking de mortalidade da doença, ocupa a segunda posição, precedido apenas pelo estado do Tocantins. Esse índice equivale à quantidade representada pelos anos de vida perdidos em decorrência de morte prematura devido à leishmaniose visceral (BEZERRA et al., 2018).

Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2017, foram registrados, no Brasil, 4.103 casos confirmados de LV, sendo 1.824 na região nordeste e, desse total, 714 no estado do Maranhão que, no ano anterior, havia registrado 645 casos da doença em humanos (BRASIL, 2018).

Com relação aos cães, no Brasil, a prevalência da LVC, em média, varia de 1,9 a 35% em áreas endêmicas, podendo alcançar até 53,4% em algumas regiões (BARATA et al. 2013; DANTAS-TORRES et al., 2006; FUJIMORI et al., 2016; LOPES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2010; PIMENTEL et al., 2015). AZEVEDO, 2019.

Localidades como Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Araçatuba, Santarém, Corumbá, Teresina, Natal, São Luís, Fortaleza, Camaçari, Três Lagoas, Campo Grande e Palmas, destacam-se pela ocorrência de surtos da doença (BRASIL, 2014; LOPES et al., 2010). A maior taxa de soropositividade é observada em cães jovens, o que pode estar associado à imaturidade imunológica (FIGUEIREDO et al., 2014). Um fator que auxilia no

risco de infecção por *Leishmania* é a proximidade da moradia dos cães a locais próximos de regiões com vegetações e que tenham desenvolvam quantidade de matéria orgânica presentes no ambiente (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Os cães domésticos, por conviverem diretamente com o homem, tornam-se os principais responsáveis pela manutenção da cadeia epidemiológica da doença, pelo perfil clínico apresentado, desde aparentemente saudáveis a severamente acometidos, o que pode estar relacionado cepa do parasito, genética e estado imunológico do animal (HANDMAN & BULLEN, 2002). O fato de, em alguns casos, os cães apresentarem aparentemente saudáveis, as vezes por longos períodos, pode ser considerado um dos principais impasses na erradicação da leishmaniose, dessa forma, estudos imunológicos são de grande valia para a compreensão da problemática da Leishmaniose (ROSÁRIO *et al.*, 2018)

2.2 Leishmaniose Visceral Canina e aspectos imunológicos

A leishmaniose visceral canina é uma antroponose de importância global, que afeta animais selvagens e domésticos. No Brasil, é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, que pode apresentar-se nas formas amastigotas e promastigotas (PITTA *et al.*, 2009; BRASIL, 2016). O protozoário pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e possui ciclo biológico do tipo heteroxeno (NEVES, 2016).

Os hospedeiros vertebrados podem ser encontrados tanto no meio silvestre quanto no meio urbano. Dentre os reservatórios silvestres, podem se destacar raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), marsupiais (*Didelphis albiventris*), primatas e alguns carnívoros e, no meio urbano, o principal reservatório é o cão (*Canis familiaris*), no entanto, o ser humano também é susceptível à doença (BRASIL, 2014).

Os flebotômíneos fêmeas, ao picarem o animal infectado, absorvem as formas amastigotas do sangue do reservatório e, em seu intestino, o parasito inicia um processo de transformação, no qual as amastigotas mudam para promastigotas pró-cíclicas e, depois, para promastigotas metacíclicas (VERA-IZAGUIRRE *et al.*, 2006). A infecção dos hospedeiros vertebrados ocorre por meio da transmissão do protozoário na forma metacíclica presente na saliva do flebotômíneo no momento do repasto sanguíneo (BRASIL, 2014). Esses vetores são dípteros pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, do qual várias espécies são consideradas patogênicas, podendo transmitir a LV (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Os parasitos e as lesões por eles causadas podem ser encontrados em todo o organismo do hospedeiro, sendo consideradas resultantes de reações inflamatórias proliferativas, causando um desequilíbrio imunológico. Nesse sentido, acredita-se que uma

resposta humoral exacerbada e leva à deposição de complexos imunes provavelmente são os fatores responsáveis pela patogênese. Assim, a geração de resposta imunológica torna-se crucial para a eliminação ou propagação do parasito, visto que há variações relacionadas à susceptibilidade da LV entre os indivíduos acometidos (BANETH et al., 2008; ALBUQUERQUE, 2013). Dessa forma, a diversidade de evidências clínicas e experimentais mostram o papel fundamental das células tipo Th1, que desenvolvem uma função protetora em relação às do tipo Th2.

É importante destacar que há dois tipos de respostas imune que podem ser demonstradas pelo organismo de um hospedeiro no momento de uma infecção, a saber: a imunidade inata, que consiste em uma resposta inespecífica para distinguir antígenos, e os mecanismos ativados são as barreiras químicas e físicas naturais que o hospedeiro possui, como mucosas e substâncias antimicrobianas existentes nela, bem como células fagocíticas do sistema imunológico, como macrófagos, neutrófilos e as *natural killer* - matadoras profissionais; e a imunidade adaptativa, que consiste em uma resposta específica, que, por sua vez, pode apresentar dois tipos de resposta no hospedeiro (ALMEIDA-SOUZA, 2018).

Com relação à imunopatologia da LV, após a ocorrência de coestímulos, inicia-se a produção de IL-12 por células dendríticas, que fagocitam os parasitos no sítio de inoculação e orientam a diferenciação de linfócitos T *naïves* em Th1, secretores de TNF- α que, juntamente com outras citocinas, são fontes produtoras de IFN- γ (BIRON e GAZZINELLI, 1995; SCHARTON-KERSTEN et al., 1995; ALEXANDER e BRYSSON, 2005). Respostas do tipo Th1 ocorrem a partir do contato inicial com o antígeno, podendo ser por exposição natural ou vacinação. Esse mecanismo aumenta o processo de fagocitose e induz à morte os microrganismos presentes nos fagolisossomas, culminando com a produção de anticorpos IgG, que opsonizam os microrganismos para a fagocitose (MESQUITA JUNIOR et al., 2010). O IFN- γ recruta macrófagos para eliminarem amastigotas intracelulares, pois ativa a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e induz a produção de óxido nítrico (DE FREITAS et al., 2010). Baneth et al. (2008) apontam que animais que apresentam padrão de resposta do tipo Th1 conseguem controlar a infecção, reduzir a carga parasitária e não manifestar sinais clínicos característicos da doença.

Respostas do tipo Th2 estão associadas à produção de anticorpos IgE, que atuam contra parasitos, e seu aumento está relacionado a problemas alérgicos. Estas imunoglobulinas recrutam eosinófilos e mastócitos para combater os agentes causadores desses problemas (CAMARA, 2013). Brachelente et al. (2005) evidenciaram em seu estudo que a elevada produção de citocinas do tipo Th2, influenciam na susceptibilidade da infecção por

Leishmania, pois está associada a sinais clínicos graves. Taxas elevadas de IL-4 e IL-13 culminam na promoção da doença, pois há uma maior propagação do parasito no organismo do hospedeiro e baixa resposta a tratamentos, refletindo em sinais clínicos variados (NOBENTRAUTH, 2003; ALBUQUERQUE, 2013).

De acordo com Ordeix et al. (2017), a diversidade de sinais clínicos é decorrente de mecanismos patológicos variados que ocorrem após inflamações, deposição de complexos imunológicos e produção de anticorpos.

Todavia, tanto os animais sintomáticos quanto os assintomáticos infectados por *L. infantum* atuam igualmente como reservatórios do patógeno e são considerados fontes de infecção para o vetor, dessa forma, possuem papel importante no ciclo da transmissão da doença (MOHAMMADIHA et al., 2012).

Os sinais clínicos podem aparecer em meses ou anos após a infecção (KOUTINAS e KOUTINAS, 2014). Na sintomatologia clássica, estão envolvidos lesões dermatológicas, como dermatite esfoliativa e/ou ulcerativa, onicogribose, hiperpigmentação da pele, despigmentação nasal, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia (ORDEIX et al., 2017), além de problemas oftálmicos, musculares e neurológicos, classificados como manifestações atípicas da LV (KOUTINAS e KOUTINAS, 2014).

2.3 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

O diagnóstico clínico da LVC é desafiador devido à apresentação de sinais clínicos inespecíficos e ao fato de cerca de metade da população canina afetada não apresentar sintomatologia (BRUNO et al., 2019; RIBEIRO et al., 2019).

Para a realização do diagnóstico, é necessário levar em consideração os dados clínicos, laboratoriais e os aspectos epidemiológicos, pois, os sinais clínicos podem se assemelhar aos de outras enfermidades infectocontagiosas, resultando em um diagnóstico clínico de difícil determinação (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BRASIL, 2018).

Desse modo, o suporte laboratorial adequado que envolva as técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares, se faz importante para avaliar e confirmar o diagnóstico (RIBEIRO et al., 2019). Vale ressaltar ainda que há, também, testes imunocromatográficos ou testes rápidos, que são realizados para a triagem e acompanhamento da doença (DANTAS-TORRES et al., 2017).

Os testes rápidos possuem vantagens como baixo custo, processamento rápido de amostras, análise de grande número de animais em curto prazo, obtenção de resultados imediatos sem necessidade de muitos procedimentos, viabilidade de realização em local de

coleta (campo), fora isso, podem ser aplicados em pesquisas epidemiológicas (GRIMALDI et al., 2012; WOYAMES PINTO et al., 2016). Dentre os testes rápidos mais utilizados, pode-se citar o Avaliação do teste rápido ALERE® Leishmaniose AC, Kalazar Detect, ELISA Bio-Manguinhos e DPP Bio-Manguinhos. Todos esses testes são disponíveis no mercado e mostram que o diagnóstico efetivo de LVC é extremamente importante tanto na rotina médica veterinária quanto na vigilância epidemiológica e nos programas de controle de Leishmaniose (BRASIL, 2014).

Os métodos sorológicos, por sua vez, podem apresentar baixa sensibilidade e reações cruzadas com outros tripanossomatídeos. Rotineiramente, os testes mais utilizados para diagnosticar LVC no Brasil são Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e testes rápidos, apresentando variações em termos de sensibilidade e especificidade (FIOCRUZ, 2008; COURA-VITAL et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015). De acordo com Melo (2014), a RIFI apresenta sensibilidade variável de 90 a 100% e especificidade de, aproximadamente, 80% para amostras de soro. A técnica possui limitações como a presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos. O teste de ELISA, por sua vez, é de fácil execução e leitura, mais sensível e menos específico que a RIFI, desse modo, permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas, é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (GONTIJO e MELO, 2004).

Os diagnósticos parasitológicos são realizados com base na observação das formas amastigotas em órgãos como fígado, medula óssea, linfonodos e baço, e as técnicas mais frequentes são as histopatológicas e imuno-histoquímicas (TAFURI et al., 2001). Esses órgãos são comumente eleitos para colheita de amostras, visto que são de predileção do parasito.

Os métodos moleculares desempenham um papel importante na confirmação de diagnósticos e identificação de *Leishmania* spp. (TRONCARELLI et al., 2009; GRIMALDI et al., 2012; GRAMICCIA, 2011), pois possuem alta sensibilidade e especificidade. No mais, as informações obtidas tanto nas avaliações clínico-patológicas e testes sorológicos, quanto os exames parasitológicos e moleculares, devem ser realizados a fim de fornecer um diagnóstico preciso (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) preconiza como diagnóstico para LVC o uso do TR DPP®, que é um teste imunocromatográfico, como teste de triagem, e o ELISA como teste confirmatório (BRASIL, 2018). No entanto, vale ressaltar que a RIFI também é

um teste recomendado e autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e auxilia na confirmação dos cães reagentes ao teste de triagem.

2.4 *Leishmania* spp. no Sistema Nervoso Central

O Sistema Nervoso (SN) divide-se em dois tipos: o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Nervoso Periférico (SNP). O SNC é composto por órgãos como o encéfalo e a medula espinhal. Essas estruturas estão protegidas pela caixa craniana e canal vertebral e são envolvidas por membranas de tecido conjuntivo chamadas meninges (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

O SNC tem como função principal processar as informações enviadas pelos órgãos dos sentidos e elaborar respostas que resultam em ações do organismo, como contração muscular, secreção de glândulas, sensações, pensamentos, dentre outras. Esse sistema é composto por uma variedade de células que são responsáveis por realizar essas funções, tais como neurônios e células da glia, que incluem astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células endodimárias (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2006).

Os neurônios no SNC se comunicam por meio de sinais químicos e elétricos e regulam o microambiente iônico local através de sinapses e axônios que auxiliam na sinalização neural. As camadas de barreira existentes no SNC desempenham um papel importante nesse sistema (ABBOTT, 2006). Há duas camadas de barreiras que limitam e regulam a troca molecular nas interfaces entre o sangue e o tecido neural: a barreira hematoencefálica (BHE), formada por células endoteliais cerebrovasculares; e a barreira sangue - líquido cefalorraquidiano (BSLCR), constituída pelo plexo coroide, a membrana aracnoide com os vasos sanguíneos e o líquido cefalorraquidiano expelido pelo epitélio do plexo coroide nos ventrículos (ABBOTT et al., 2010; ROJAS et al., 2011).

Indivíduos com um SNC desenvolvido possuem uma BHE bem desenvolvida (ABBOTT, 2005). No cérebro e medula espinhal de mamíferos, a BHE é originada de células endoteliais que formam as paredes dos capilares e constituem uma interface importante para a troca de nutrientes no sentido sangue-cérebro. No entanto, é válido salientar que a permeabilidade nessa região é altamente seletiva, impedindo a passagem de substâncias nocivas ao tecido nervoso, como agentes químicos, toxinas, antibióticos e até agentes infecciosos (NAG e BEGLEY, 2005; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2006).

A regulação na BHE fornece um ambiente estável para a função neural e auxilia na combinação de canais e transporte de íons específicos, mantendo a composição iônica ideal para a função de sinalização sináptica (BRADBURY et al., 1963). Logo, torna-se um meio

eficiente de combinar as atividades da BHE aos requisitos do cérebro, seja para proteção contra agentes circulantes, ajuste do suprimento de nutrientes ou modificação para facilitar o reparo local, a fim de manter a saúde e auxiliar na recuperação de lesões ou infecções (ABBOTT et al., 2006).

Apesar dos mecanismos de regulação, podem ocorrer disfunções da BHE devido à abertura ligeira das junções oclusivas até a ruptura crônica da barreira (FÖRSTER, 2008), bem como do mau funcionamento dos mecanismos enzimáticos e de transporte. Esses problemas podem ser sinalizados pelo aumento de células da glia nos tecidos, presença de neutrófilos e leucócitos mononucleares circulantes, além de monócitos e macrófagos que atuam em uma resposta imune coordenada (BECHMANN et al., 2001; PERSIDSKY et al., 2006; KONSMAN et al., 2007). Portanto, a falha da BHE é um evento de caráter crítico, visto que o seu desenvolvimento pode progredir para a concessão de várias doenças cerebrais, incluindo acidente vascular cerebral, trauma, epilepsia, doenças neurodegenerativas, tumores e infecções (FÖRSTER, 2008).

A BSLCR consiste no plexo coroide, que também é formado por células endoteliais e tem como função secretar o Líquido Cefaloraquidiano (LCR). A secreção ocorre do plexo coroide para o sistema ventricular cerebral (BROWN et al., 2004). O plexo coroide é composto por uma camada de células epiteliais altamente vascularizadas conectadas por junções oclusivas. Macrófagos e leucócitos também podem ser encontrados no plexo coroide, sugerindo seu papel como porta de entrada para o tráfego de células imunológicas em resposta a doenças e traumas (PRAGER et al., 2017).

Em todas as barreiras, a função resulta em uma combinação de barreira física (junções entre células reduzindo o fluxo através da via intercelular ou paracelular), barreira de transporte (mecanismos de transporte específicos mediadores do fluxo de soluto) e barreira metabólica (enzimas metabolizando moléculas em transito). Entretanto, a função de barreira não é fixa, mas pode ser modulada e regulada, tanto em fisiologia como em patologia (ABBOTT et al., 2006).

Durante muito tempo, acreditava-se que o SNC não estava dentro da rota da infecção por *Leishmania*, em virtude de várias peculiaridades desse sistema e da existência de barreiras que promovem maior proteção aos órgãos que o compõem. Entretanto, Prasad e Sen (1996) descreveram pela primeira vez o envolvimento do SNC, com o desenvolvimento de meningite e a detecção de formas amastigotas de *Leishmania donovani* no LCR em um paciente humano com LV. A partir de então, o SNC passou a ser alvo de muitos estudos, a

fim de comprovar a capacidade das espécies de *Leishmania* em atravessar a BHE, causando alterações patológicas e o desenvolvimento de sinais clínicos neurológicos.

No mesmo ano, Garcia-Alonso et al. (1996) detectaram, pela primeira vez, anticorpos anti-*Leishmania* no LCR de cães positivos para LV. Nesse mesmo período, foi relatado um cão com leishmaniose apresentando coroidite caracterizada por infiltrado inflamatório de linfócitos e polimorfonucleares, além da detecção de formas amastigotas de *Leishmania* dentro de macrófagos revelados após impressão do plexo coroide em lâmina (NIETO et al., 1996). Nos últimos anos, estudos demonstraram alterações em tecidos do Sistema Nervoso Central de cães, nos quais foram descritas nodulações, massas ou granulomas associados à presença do parasito em medula espinhal de cães (FONT et al., 2004, CAUDURU et al., 2011, MÁRQUEZ et al., 2013, JOSÉ-LÓPEZ et al., 2014).

Em alguns relatos de casos, as alterações histopatológicas observadas no SNC de cães com LV foram caracterizadas principalmente por um infiltrado inflamatório composto de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos, em várias regiões do SN, como plexo coroide, meninges e parênquima cerebral, sem obrigatoriamente a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* no tecido nervoso e manifestação de sintomas neurológicos (IKEDA et al., 2007; MELO et al., 2009a; MELO et al., 2009b; MELO et al., 2011; MARQUEZ et al., 2012; MELO et al., 2013). Mesmo na ausência do parasito, lesões inflamatórias são comumente observadas, como leptomeningite e coroidite, com acúmulo de células mononucleares (VIÑUELAS et al., 2001; IKEDA et al., 2007). Especificamente em relação ao cérebro, Melo et al. (2015) observaram importantes alterações inflamatórias, com diferentes intensidades, variando de discretas a intensas, em cães portadores de LVC, os quais não apresentavam sintomatologia neurológica.

Alguns sinais neurológicos em uma cadela foram relatados por Font et al. (2004), que apontaram a presença de paraplegia aguda associada a vasculite, com extensa área de hemorragia no cordão espinhal, associada a presença de trombo e um infiltrado misto de células inflamatórias. Ikeda et al. (2007) observaram em um estudo minucioso com 39 cães alguns sinais neurológicos como convulsões, cegueira, sinais de envolvimento vestibular e cerebelar (cabeça inclinada, nistagmo, incoordenação motora, queda, tremor), paraparesia, tetraparesia, tetraplegia e mioclonias.

Bargui et al. (2017), em pesquisa envolvendo a medula espinhal de camundongos experimentalmente infectados com *Leishmania amazonenses*, demonstram a participação de moléculas relacionadas à inflamação, como TNF- α e fatores de transcrição gênica durante curso da doença no Sistema Nervoso Central. Esse perfil de citocinas pró-inflamatórias, tais

como IL-1 β , IFN- γ e TNF- α também já foram relatados pontualmente no cérebro de cães positivos para a leishmaniose (MELO et al., 2013). Oliveira et al. (2017), em um estudo feito com 48 cães infectados com LV, detectaram o agente *L. infantum* por meio de cultura parasitológica em 25% dos animais para amostras de LCR, medula espinhal e cérebro.

Contudo, já foi provado na literatura que o protozoário *L. infantum* pode atravessar a BHE e expandir-se através do LCR, causando infecções no cérebro e medula espinhal de cães naturalmente infectados, adicionalmente, pode causar encefalomielite granulomatosa não supurativa, uma condição que pode levar a sinais clínicos neurológicos com progressão da doença. Portanto, a medula espinhal é um importante local de infecção por *L. infantum* no SNC e deve ser investigada em casos de cães com e sem sinais clínicos neurológicos de áreas endêmicas para a doença (OLIVEIRA et al., 2017).

Enfim, pode-se observar que, apesar de toda a informação acerca da LVC, os estudos envolvendo o SNC e a infecção por *Leishmania* ainda não são suficientemente esclarecedores para a compreensão dos mecanismos de ação do agente nesse sistema e nos órgãos que o compõem, principalmente na medula espinhal. Os achados descritos anteriormente mostram que as lesões existem, no entanto, necessitam de mais estudos para melhorar a compreensão da infecção nesse sistema em seus aspectos parasitários e moleculares.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Caracterizar as alterações imunopatológicas ocorridas na medula espinhal de cães com LVC.

2.2. ESPECÍFICOS

- Determinar as lesões na medula espinhal e meninges de cães com leishmaniose visceral, naturalmente infectados;
- Caracterizar os tipos celulares encontrados nos tecidos de medula espinhal e meninges de cães com LV naturalmente infectados;
- Identificar antígenos *in situ* de *Leishmania* na medula espinhal de cães naturalmente infectados;
- Detectar o DNA do cinetoplasto da *L. infantum* na medula espinhal, bem como, quantificar a carga parasitária por meio da técnica de q-PCR
- Estabelecer o perfil de expressão de citocinas na medula espinhal de cães com LV naturalmente infectados.

3. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo seccional para verificar a ocorrência de *L. infantum* no SNC de cães por meio de seis técnicas de diagnóstico. Foram analisadas amostras de tecido de medula espinhal de cães provenientes da cidade de São Luís, área endêmica do estado do Maranhão, coletadas durante o período de Janeiro de 2018 a Maio de 2019. Foi estudada uma amostra de conveniência de 20 animais, sorologicamente positivos para infecção por *Leishmania* sp. nas técnicas de imunocromatografia (DPP®), RIFI ou ELISA. A seleção dos animais foi realizada mediante a análise das fichas fornecidas pelo Hospital Veterinário Universitário “Francisco Edilberto Uchôa Lopes” e Unidade de Vigilância em Zoonoses – UVZ da cidade de São Luís.

3.1 Comitê de Ética

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal/UEMA, CEEA nº 013/2018.

3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos neste estudo animais que apresentaram sorologia positiva no DPP®, RIFI ou ELISA. Além disso, outras características foram levadas em consideração como: animais positivos para Leishmaniose que apresentaram sintomatologia clínica (onicogrifose, alopecia local ou generalizada, alterações oculares, linfadenomegalia e, ainda, sinais neurológicos); cães positivos para Leishmaniose sem a apresentação de sintomas clássicos da doença para composição do grupo assintomático e; animais cuja causa da morte fossem traumas ou onconlogias, desde que não afetassem o SNC para compor o grupo negativo, no entanto, não foi possível forma-lo devido a não aquisição de animais nessas condições.

Como critério de exclusão: não inclusão de cães portadores de enfermidades que afetassem o SNC como cinomose, toxoplasmose entre outras.

3.3 Animais, Exame Clínico, colheita e acondicionamento de amostras

Foram utilizados 20 cães, sendo 13 machos e 7 fêmeas, os quais foram incluídos neste estudo no período de janeiro de 2018 a maio de 2019. Quatorze (14) desses cães eram mestiços, dois (2) eram da raça Poodle, um (1) era Pinscher, um (1) Shih Tzu, um (1) Pastor Alemão e um (1) Pit Bull. A idade dos cães variou de 7 meses a 12 anos e todos foram provenientes da Ilha de São Luís – MA, atendidos no Hospital Veterinário Universitário

“Francisco Edilberto Uchôa Lopes” e Unidade de Vigilância em Zoonoses – UVZ com suspeita clínica de Leishmaniose Visceral Canina.

Foi realizada a colheita de amostras de sangue armazenadas em tubos à vácuo com EDTA para obtenção de sangue total e sem EDTA para obtenção de soro, conservados em caixa de isopor com gelo e encaminhados para o Laboratório de Patologia Molecular (LPMol) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Após esses procedimentos, os animais foram eutanasiados mediante o protocolo de cada instituição parceira citada anteriormente. Vale ressaltar que os tutores autorizaram os procedimentos realizados, por meio da assinatura do Termo de Consentimento para Realização de Eutanásia e Doação do Cadáver.

Exames físicos foram realizados constituídos de inspeção de pele e de mucosas oral e ocular, palpação de linfonodos superficiais e órgãos abdominais. Foram considerados sinais clínicos de LVC: emagrecimento, alopecia geral ou localizada, apatia, lesões cutâneas como úlceras e descamação, onicogribose, aumento de linfonodos superficiais, do fígado ou do baço à palpação, sinais clínicos de anemia como mucosas hipocoradas, ceratoconjuntivite e paraparesia. Os cães foram classificados como sintomáticos ou assintomáticos de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos.

Durante a necropsia, a medula espinhal foi avaliada macroscopicamente e os fragmentos das porções cervical, torácica e lombar foram colhidos e, aqueles destinados para a técnica de qPCR para carga parasitária foram armazenados imediatamente em microtubos estéreis livres de nucleases e acondicionados a -20°C até a realização da técnica. Por sua vez, os fragmentos destinados para a histologia e imuno-histoquímica foram fixados em formalina tamponada a 10% durante 24 horas e mantidos em álcool a 70% até a realização do processamento. Os fragmentos destinados à qPCR para expressão gênica foram armazenados em microtubos estéreis livres de nucleases contendo solução de estabilização RNAlater™ acondicionadas em freezer a -20°C.

3.4 Testes sorológicos

Adicionalmente, foram realizados os testes sorológicos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para confirmação da parasitose, utilizando, para este último, kit comercial disponível (EIE – Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

A RIFI foi realizada conforme o protocolo descrito por Oliveira (2008). As

amostras de soro foram diluídas ao ponto de corte 1:40 preconizado pelo Ministério da Saúde. As lâminas utilizadas foram previamente sensibilizadas com antígenos, constituídos por formas íntegras de promastigotas de *L. infantum*, cepa CBT 153/USP, isolada de cães provenientes do Estado do Maranhão e preservada na Coleção Brasileira de Tripanossomátídeos (CBT) da Universidade de São Paulo - USP. Foram colocados 20µl de amostras testes sobre o antígeno nas lâminas e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. A seguir, foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 minutos, por três vezes consecutivas. Foram adicionados 10µl do soro IgG anti-cão conjugado marcado com isotiocianato de fluoresceína (KPL, EUA) diluídos a 1:200 em PBS contendo 1mg % de Azul de Evans e incubados a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. As lâminas foram lavadas novamente em PBS e secas à temperatura ambiente, cobertas com glicerina tamponada e lamínula e, examinadas em microscópio de luz. E, em todas as reações, os soros de referência foram incluídos como controle negativo e positivo.

3.5 Histologia

Os fragmentos de tecidos obtidos foram fixados em formalina tamponada a 10% durante 24 horas, e processados pelas técnicas histológicas de rotina, que incluem as etapas de desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina, no laboratório de Anatomopatologia da Universidade Estadual do Maranhão. Após o processamento, para confecção das lâminas histológicas, o material foi cortado na espessura de cinco micrômetros (5µm) com micrótomo rotativo HM 360 MICROM. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, utilizando-se xilol. Logo após, foram submetidas à hidratação em álcool, então coradas com hematoxilina e eosina (HE). Em seguida, as lâminas foram desidratadas em soluções crescentes de álcool, clarificação em xilol e, por fim, montadas com lamínulas de vidro, utilizando-se a resina natural Bálsamo do Canadá e, após secagem, foram observadas em microscopia de luz.

3.6 Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica para detecção de *Leishmania* sp. foi realizada de acordo com Tafuri et al. (2004) com modificações, utilizando-se como anticorpo primário o soro heterólogo hiperimune de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, diluído 1:50 em PBS. Secções (5µm) de tecido foram hidratadas e incubadas em peróxido de hidrogênio a 3% em PBS (0.01 M, pH 7.2) durante 30 minutos, e posteriormente, incubadas com 25mg/mL de leite desnatado por 30 minutos (solução bloqueadora que substitui o soro de cabra usado por

Tafari) e, então, incubadas com o anticorpo primário por 1 hora a 4°C em câmara úmida. Após a lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (Link-DAKO, LSAB2 Kit, Catálogo nº KO675-1; Carpinteria, Califórnia, EUA), conjugada com estreptavidina- complexo de peroxidase, por 20 min cada, à temperatura ambiente. A reação foi revelada pela diaminobenzidina (DAB) e, as lâminas, contraincoradas com hematoxilina de Mayer. Controles negativos consistiram de tecidos sabidamente livres de amastigotas e com substituição do anticorpo primário por PBS.

3.7 Extração de DNA

As amostras de sangue total obtidas foram coletadas em tubos à vácuo com EDTA e, posteriormente, aliquotados em microtubos estéreis livres de nucleases e armazenados a -20°C até o momento do procedimento. Já os fragmentos de medula espinhal das porções cervical, torácica e lombar foram coletados e armazenados em microtubos estéreis livres de nucleases e acondicionados a -20°C até a realização do procedimento de extração de DNA. Para ambas extrações, utilizou-se o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), conforme instruções do fabricante. A concentração e qualidade do DNA extraído foram determinadas por meio de leitura em espectrofotômetro e visualização em gel de agarose 1,5%.

3.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA extraído das amostras de sangue foi amplificado em termociclador utilizando os iniciadores RV1 (senso; 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAG-3') e o RV2 (anti-senso; 3'- CCACCTGGCCTATTTTACACCA-5'), previamente descrito por Lachaud et al. (2002), cujo alvo é uma região conservada do kDNA de *L. infantum*, e que produzem um fragmento de aproximadamente 145 pares de base. Cada reação teve um volume total de 25 µL, sendo: 12,5µL de Gotaq® PCR Master mix (Promega); 1,5 µL de cada primer (10pmol); 4,5 µL de água DNase e RNase free; e 5 µL de amostra de DNA extraído. Foram utilizados um controle positivo (cão sorologicamente e parasitologicamente positivo para *L. infantum chagasi*) e um controle negativo em cada reação. Os parâmetros utilizados para PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos; 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 segundos), anelamento (59 °C por 30 segundos), e extensão (72 °C por 30 segundos); e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,5%, utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (100 pb DNA ladder Promega®), programação na cuba de eletroforese de 100V, 100 mA e 50 minutos de corrida. Após, os

amplificados foram visualizados em transiluminador.

As amostras serão, ainda, submetidas à PCR convencional para diagnóstico diferencial de *Toxoplasma gondii* e *Trypanossoma cruzi*, utilizando os iniciadores descritos na tabela 1.

Tabela 1. Lista de iniciadores a serem utilizados no diagnóstico diferencial.

Sequência Alvo	Iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto	Referência
<i>Toxoplasma gondii</i>	CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG CGCTGCAGACACGTGCATCTGGATT	529 pb	Homan et al., 2000

3.9 Quantificação da carga parasitária das amostras por qPCR

Os procedimentos para a quantificação da carga parasitária e diagnóstico de LVC nos fragmentos de medula espinhal foram realizados por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real, na qual utilizou-se duplicatas de reações de 20 µL com amostras na concentração de 5ng/µL de DNA e amplificado em termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando os iniciadores KDNA3 F (senso: 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGC-3') e KDNA3 R (anti-senso: 3'-TACACCAACCCCCAGTTTGC- 5'), previamente descritos por Weirather et al. (2011) e cujo alvo é uma região conservada do cinetoplasto do parasito, e o GAPDH FW (senso: 5'-TTCCACGGCACAGTCAAG -3') e GAPDH REV (anti-senso: 3'-ACTCAGCACCAGCATCAC- 5') (GenBank nº AB038240.1), usado como gene endógeno da reação. A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas ao décimo de concentração conhecida de DNA de *Leishmania*, extraído de cultura *in vitro* de formas promastigotas de *L. infantum*, previamente caracterizadas pelo Laboratório de Referência Nacional para tipagem de *Leishmania* (CLIOC) do Instituto Oswaldo Cruz. As reações foram preparadas com a adição de 1,0 µL de cada iniciador a uma concentração de 2,5pmoles/µL, 10µL de Sybr Green PCR master mix (Applied Biosystems), 4µL de DNA a uma concentração de 5ng, e 4,0 µL de água DPEC para completar o volume final da reação de 20µL. Após a aplicação das amostras, a placa foi selada e colocada no equipamento para que

ocorresse amplificação, nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos; seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Os resultados foram analisados utilizando o programa 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems), no qual foram avaliadas a curva de dissociação formada e a quantificação do número de cópias de DNA conforme a curva padrão.

3.10 Extração de RNA

Para a extração de RNA, será seguido o protocolo preconizado pela Invitrogen; Carlsbad, CA, USA, no qual os tecidos coletados serão macerados e 1 mL de Trizol será adicionado (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) em microtubo livre de RNase. Em seguida, serão adicionados 200µL de clorofórmio, homogeneizado vigorosamente e incubado em temperatura ambiente por três minutos. As amostras serão centrifugadas a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C, para separação em três fases. A fase superior será transferida para outro microtubo e será adicionado 500µL de isopropanol para precipitação do RNA, seguida de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. O pellet será lavado com 1 mL de etanol 70%, homogeneizado em vórtex e centrifugado a 7.500 xg por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o RNA será dissolvido em 30µL de água livre de RNase.

3.11 Síntese de cDNA

O RNA (1,5 µg) será retrotranscrito em cDNA utilizando-se o kit comercial Super Script III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante para uma reação de volume final de 20µL. Para a síntese, serão utilizados 3,0µL de água DEPC, 1,0µL de Random Hexâmero (50µg/µL), 1,0µL de Annealing Buffer, 2,0µL de RNase OUTTM Enzyme Mix, 10,0µL de 2x First-Strand Reaction Mix. Os parâmetros utilizados para a síntese do cDNA serão: 65°C por 5 minutos, incubado em gelo por 1 minuto, 25°C por 10 minutos, 50°C por 50 minutos. Posteriormente o cDNA será armazenado a -20°C.

3.12 Expressão de citocinas por PCR em tempo real (qPCR)

A PCR quantitativa será realizada utilizando-se 2,5 µl de cDNA, 10 µM do par de primers específico para cada gene (Tabela 2) e 12,5 µl de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix – UDG with ROX, Invitrogen) em um volume final de 25 µl por reação. Os parâmetros utilizados para a PCR em tempo real serão: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1

minuto, utilizando um termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Será utilizado o método comparativo de Ct (*cycle threshold*) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para análise dos dados de expressão gênica, como descrito por (Livak e Schmittgen, 2001). Alterações relativas na expressão gênica serão calculadas em relação à expressão gênica dos respectivos genes nos tecidos dos animais controle não infectados.

Tabela 2 – Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real.

Sequência Alvo	Iniciadores (5'-3')
iNOS	AAGATCCCCATTCCGGATAC AGCCTGAAGATCCGACTCAA
IL-4	CATCGGCATTTTGAACGAGGTCA CTTATCGATGAATCAGGCATCG
IL-10	GCCTAACATGCTTCGAGATC TGATGTCTGGGTCTTGGTTC
IL-12	ACCTGCAGCTGAAGCCATTG GTCTTGTCCACGCAGAGTCT
IFN- γ	GGAAGACATGCTTGGCAAGTTC GGTGAGAGATCATTCACTTTGA
TNF- α	GCCGCAGTACAGTAGCAGCTCT GTTGACCTTTGTCTGGTAGGAGACGG
GAPDH	GAGAAGGCTGGGGCTCACTTG GCTGACAATCTTGAGGGTGTG
β -actina	GGCATCCTGACCCTGAAGTA CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT

3.13 Análise Estatística

Os dados da carga parasitária e expressão gênica serão normalizados com base na expressão de GAPDH para carga e β -actina e GAPDH para expressão. Todos os valores de Ct normalizados sofrerão transformação logarítmica e os dados obtidos serão submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias vão ser comparadas pelo teste t de Student (Graphpad Prism 5.0, USA). Diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Correlação de Pearson será utilizada para correlacionar os dados de expressão gênica e carga parasitária.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação clínica, sorológica e molecular para diagnóstico de LVC

Do total de 20 cães analisados, dez (10) apresentaram sintomatologia clínica compatível com LVC. Os principais sinais observados foram alterações dermatológicas, como onicogribose, alopecia localizada e generalizada, despigmentação e lesões ulcerativas no focinho, pelos opacos e úlceras cutâneas, além de esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenomegalia e alterações oftálmicas (Tabela 3; Figura 1). Adicionalmente, um dos animais do estudo apresentou paralisia dos membros pélvicos, sem alteração ortopédica associada. Dez (10) animais, por sua vez, não apresentaram qualquer sintomatologia relacionada à doença.

Tabela 3. Frequência de sinais clínicos observados em cães positivos para Leishmaniose Visceral.

Sinais Clínicos	Frequência	
	N	%
Linfadenomegalia	8	80
Alterações oculares ¹	5	50
Alterações dermatológicas ²	10	100
Anorexia	7	70
Esplenomegalia	6	60
Hepatomegalia	8	80
Sinais neurológicos	1	10

¹Inclui alterações como blefarite, úlceras de córnea, alopecia periocular e secreção ocular; ²Inclui alterações como onicogribose, alopecia, lesões ulcerativas e descamação epitelial.

Os sinais clínicos observados nos animais desse estudo, confirmam as descrições feitas por Feitosa et al. (2000) e Saridomichelakis et al. (2014) ao definirem a LVC como uma doença caracterizada por um espectro amplo e variável de sinais clínicos sendo as alterações dermatológicas, as lesões mais frequentes em cães. Da mesma forma, a distribuição das lesões nessa amostragem aleatória de cães foi semelhante a pesquisa de *L. infantum* no sistema nervoso central de 48 cães naturalmente infectados realizada por Oliveira et al. (2017) e estudos de Macau et al. (2017) que contabilizaram em percentuais, os principais sinais clínicos relacionados à LVC, tais como descamação furfurácea da pele, pelos opacos, linfadenomegalia regional e generalizada, úlceras cutâneas, esplenomegalia, hepatomegalia e

alterações oftálmicas. Essas variações clínicas ocorrem devido a mecanismos patológicos envolvidos no processo da doença como o desencadeamento de processos imunológicos resultando em reações inflamatórias decorrentes da destruição de células e tecidos pela presença do parasito e/ou formação dos imunocomplexos (BITTENCOURT et al., 2012; BRUNO et al 2019).

Por outro lado, a ausência de sintomas em animais positivos sorologicamente, conforme ocorrido em parte do grupo experimental deste estudo, também é descrita na literatura como uma possibilidade, com base na dicotomia e/ou diferentes respostas imunológicas que os cães podem desenvolver frente à infecção. Nesse sentido, os animais assintomáticos incluídos nesse estudo confirmam a hipótese já bem estabelecida por Baneth et al. (2008) que descrevem a apresentação de sinais clínicos durante a LVC, diretamente relacionada ao tipo de resposta imunológica manifestada pelo hospedeiro.

Figura 1. Manifestação de sinais clínicos relacionados à LVC.



Em **A**: Animal apresentando alopecia periocular (seta), lesões ulcerativas em ponta de orelha e focinho (asteriscos). Em **B**: Blefarconjuntivite purulenta unilateral (cabeça de seta). Em **C**: Onicogrifose. Fonte: Autor, 2018.

Somente um animal deste estudo apresentou sinal clínico neurológico, no qual foi observada paralisia dos membros pélvicos. Esse fato, também foi pouco observado nos trabalhos de Feitosa et al. (2000) no qual analisaram um total de 215 cães cronicamente infectados por LV e somente 4% (cerca de 8 animais) apresentaram queixas neurológicas e, também, Gianuzzi et al. (2017) observaram que, de um total de 54 cães afetados por LV, somente 10 (18%) apresentaram sinais neurológicos. A escassez de sinais neurológicos em

cães acometidos por LV, segundo Solano-Gallego et al. (2009) se deve ao fato de o envolvimento do SN durante a infecção por *Leishmania* ser raro. Quando os sinais se fazem presentes, são resultantes de respostas inflamatórias exacerbadas frente à infecção (MÁRQUEZ et al., 2013).

Foram realizados os testes RIFI e PCR convencional a partir de amostras de soro e sangue total, respectivamente, para confirmação do diagnóstico de LVC nos animais estudados (Tabela 4; Figura 2). Dezesete (17) animais do grupo experimental foram reagentes no teste sorológico e três (3) cães apresentaram sorologia negativa. Nos ensaios de PCR, dezenove (19) animais foram considerados positivos para a presença do DNA do parasito. O teste ELISA ainda encontra-se em andamento e serão apresentados na versão final deste estudo.

Tabela 4. Resultados do teste sorológico e molecular.

Animal	PCR Sangue	RIFI
1	P	R
2	N	R
3	P	R
4	P	R
5	P	R
6	P	N
7	P	R
8	P	R
9	P	R
10	P	R
11	P	R
12	P	N
13	P	R
14	P	R
15	P	N
16	P	R
17	P	R
18	P	R
19	P	R
20	P	R

Legenda: P = Positivo; N = Negativo; R = Reagente; NR = Teste Não Realizado.

Figura 2. Imagem representativa de produtos de PCR separados por eletroforese e visualizados em gel de agarose 1,5%.



PCR de DNA extraído de sangue total de 9 cães. PM: marcador de peso molecular 100pb. CN: controle negativo; CP: controle positivo; canaletas 1-9: amostras de sangue dos animais. Autor, 2019.

Contudo, os três (30%) animais, negativos no teste sorológico, foram positivos na PCR convencional, sendo detectado o DNA do parasito no sangue, e uma única amostra positiva sorologicamente mostrou-se negativa na PCR (Tabela 3). Semelhante a este estudo, Quaresma (2007) em um estudo realizado com 217 cães provenientes de Belo Horizonte, 73 eram assintomáticos e 33 (45%) deles apresentaram sorologia negativa para *Leishmania* e, 31 (93%) foram positivos na PCR. Resultados nessas características, podem ocorrer devido a alguns fatores, como a permanência de anticorpos circulantes no sangue periférico, mesmo após a eliminação do parasita; a baixa quantidade de parasita circulante no sangue no momento da coleta; inibidores da PCR presentes no sangue (proteínas, heme, etc.) ou ainda devido a reações cruzadas da sorologia com outros agentes como outros tripanossomatídeos, bactérias, vírus, etc. (CABRAL, 2007). Por outro lado, alguns cães podem apresentar-se imunodeficientes ao não produzirem quantidades suficientes de anticorpos, fato que pode ser atribuído aos três resultados positivos pela PCR dos casos que reagiram negativos pela RIFI, tal discrepância, também foi reportada por Reale et al. (1999) em um estudo com 124 cães onde compararam resultados dos testes sorológicos e PCR e Berrahal et al. (1996) que, também, realizaram um estudo comparativo entre PCR e teste sorológico com amostras de cães.

Logo, testes sorológicos mostram que os animais infectados desenvolvem uma resposta específica de anticorpos. Animais assintomáticos apresentam uma baixa resposta humoral que, geralmente, coloca seus níveis de anticorpos abaixo da linha de corte ou no limiar de detecção (CABRAL 2007).

Visto que sete dos dez animais assintomáticos foram positivos na RIFI, leva-se em consideração a explicação, previamente demonstrada por Ikeda et al. (2007) a qual afirma

que, um resultado positivo pela RIFI, nem sempre pode ser conclusivo de doença ativa, da mesma forma que cães infectados podem ser soronegativos. Além disso, pode ocorrer falha diagnóstica em estágios iniciais da doença, quando anticorpos da classe IgG ainda não são detectáveis por estes testes sorológicos (TRONCARELLI, 2008). Dessa forma, um resultado positivo em técnicas imunológicas não, necessariamente, representa uma infecção ativa e pode apenas indicar uma exposição prévia ou um contato com a *Leishmania*, o que é particularmente comum em áreas endêmicas, adequando-se à localidade de origem dos indivíduos desta pesquisa, bem como, um resultado negativo não descarta a infecção, principalmente nas formas ocultas (RIERA et al, 2003). Devido a esses fatores, é interessante que os diagnósticos sejam acompanhados de testes moleculares.

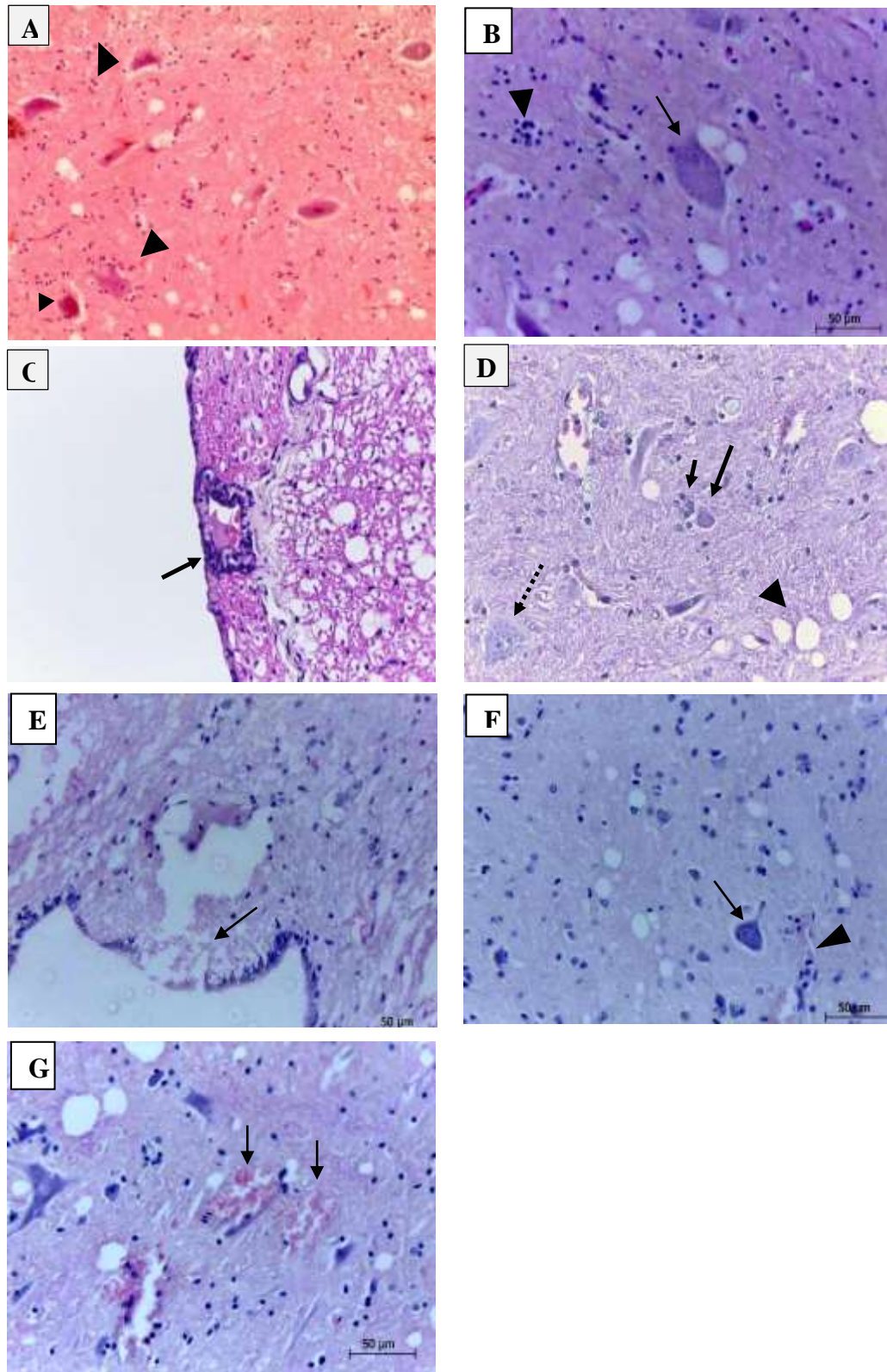
A positividade em dezenove (95%) cães para *L. infantum* nesta amostragem, demonstra que a PCR tem maiores condições e probabilidades de detecção de DNA de agentes infecciosos em amostras biológicas mesmo em baixas concentrações de acordo com Maia et al. (2015).

4.2 Lesões na medula espinhal de cães com LVC

Não foram observadas lesões macroscópicas na medula espinhal dos cães. Em relação às análises microscópicas, 14 (70%) animais apresentaram lesões em pelo menos uma porção da medula espinhal avaliada, destes, oito, eram sintomáticos. Foram observadas, principalmente, alterações degenerativas, como gliose (Figura 3A), discreta satellitose, cromatólise (Figura 3B) vacuolização de neurópilo (Figura 3D), astrocitose, retração de neurônio (Figura 3F), e necrose (Figura 3E). Além disso, em dois deles foi possível detectar lesões inflamatórias, como discreto manguito perivascular linfocítico localizado (Figura 3C) e infiltrado inflamatório com congestão, além de líquido hemorrágico e hemorragias (Figura 3C). As lesões inflamatórias foram observadas na medula espinhal de cães sintomáticos. Não foram observadas alterações histopatológicas nas três porções da medula espinhal do cão que apresentava paralisia dos membros pélvicos, o que nos impossibilita de afirmar se a paralisia possuía alguma relação com a LVC. Vale ressaltar que nem todas as porções foram avaliadas, tendo em vista que alguns tecidos precisam ser reprocessados. Dessa forma, não foi possível realizar *score* das lesões.

Quanto à localização das lesões, as frequências de acometimento das porções da medula espinhal foram de oito animais (40%) para a porção cervical, dez animais (50%) para a porção torácica e nove animais (45%) para a porção lombar.

Figura 3. Microscopia de luz, medula espinhal, cão.



Em **A**, porção cervical da medula espinhal apresentando discreta gliose (cabeça de seta). **B**, cromatólise de corpo celular de neurônio na substância cinzenta (seta) e satellitose (cabeça de seta) **HE, 40x**. **C**, manguito perivascular linfocítico focal e discreto em porção torácica da medula espinhal (seta). **D**, satellitose discreta ao redor de neurônio necrosado, presença de gemistócito (setas e seta tracejada) e vacuolização do neurópilo (cabeça de seta). **E**, Necrose no canal endimário (seta). **F**, retração de neurônio (seta) e congestão vascular (cabeça de seta). **G**, hemorragia focal na substância cinzenta (setas). **HE, 40x**. Fonte: Autor, 2019.

Os achados desta pesquisa foram semelhantes em um estudo realizado por Ikeda et al. (2007) em 39 cães acometidos por leishmaniose visceral com e sem sinais neurológicos, onde as alterações observadas foram manguito perivascular, infiltrado inflamatório, gliose, satelitose, degeneração de neurônios, vacuolização, congestão vascular e hemorragias, no entanto, essas análises foram feitas em encéfalo.

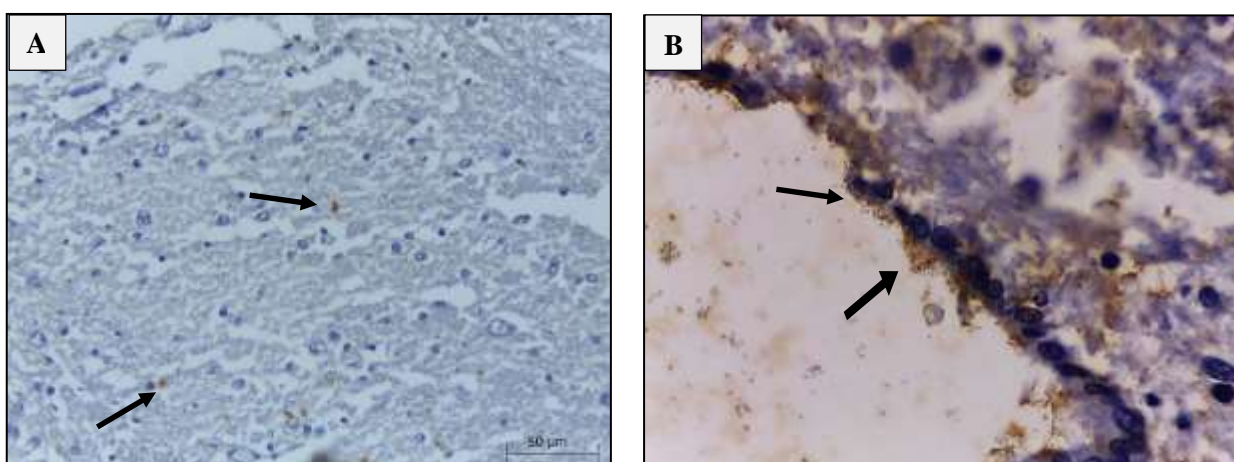
Da mesma forma, Macau et al. (2017) também observaram a presença de gliose e cromatólise no SNC em encéfalo de cães. Segundo Márquez et al. (2013) alterações degenerativas, como essas, são comumente associadas às lesões inflamatórias observadas em cães com LV. As lesões inflamatórias encontradas neste estudo foram manguito perivascular linfocítico focal discreto e infiltrado inflamatório na granulomatoso e não supurativo, assim como no estudo desenvolvido por Oliveira et al. (2016) em uma avaliação em 50 cães com LV, apenas um (7%) animal apresentou manguito perivascular linfocítico. Feitosa et al. (2008) colocam que reações por células linfocitárias são frequentes em doenças que acometem o sistema neurológico, por se tratar de células da fase inflamatória subaguda, que no entanto, podem aparecer em quadros citológicos crônicos. Contudo, as alterações mais, frequentemente, observadas na medula espinhal dos animais deste estudo foram alterações degenerativas discretas, não se observando a presença de estruturas sugestivas de *Leishmania* ou lesões inflamatórias, sugerindo-se pouco acometimento desta porção do Sistema Nervoso Central.

Apesar das lesões encontradas, não se observou a presença de formas amastigotas do parasito por meio da análise histopatológicas nos tecidos de medula espinhal. De modo semelhante, outros autores, apesar de observarem alterações histopatológicas no SNC de cães durante a infecção, não verificaram a presença de amastigotas de *Leishmania* (IKEDA et al., 2007; BARROS e MAGALHÃES, 2011; MÁRQUEZ et al., 2013). A ausência de amastigotas, segundo Ikeda et al. (2007) e Melo e Machado (2009) estão associados com a cronicidade da doença, pois a presença das formas esta associada à infecção precoce em cães. De acordo com Faria et al. (2012), embora seja possível a visualização do parasito e alcance em certos casos até 100% de especificidade, a análise histopatológica apresenta sensibilidade variada, devido à distribuição do parasito pelos tecidos não ocorrer de forma homogênea. Além disso, a sensibilidade desta técnica varia de acordo com o tecido estudado (tropismo do parasito) e a fase da doença em que o animal se encontra (MOREIRA et al., 2007).

4.3 Marcação de antígenos de *Leishmania* na medula espinhal

Até o momento, foi realizada a imuno-histoquímica de quatorze (14) animais, havendo marcação positiva para antígenos específicos de *Leishmania* sp. na medula espinhal de cinco diferentes animais, dentre as três porções estudadas. Três, dos cinco (5) animais positivos nesta técnica, apresentaram alterações discretas na análise histopatológica, mas não foi possível detectar as formas amastigotas no tecido as quais só puderam ser demonstradas por meio da IHQ (Figura 4). Até o momento, somente um, dos cinco animais com marcação positiva, pertence ao grupo assintomático.

Figura 4. Imuno-histoquímica em tecido de medula espinhal de cães naturalmente infectado com LV.



Em **A**: Marcação de antígenos de *Leishmania* sp. pela reação imuno-histoquímica (setas), localizadas na substância cinzenta **40x**. **(B)** Marcação positiva de antígenos de *Leishmania* sp. no canal endimário (setas). **100x**. Fonte: Autor, 2018.

Apesar de em alguns estudos reportarem que a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em diferentes sítios do SNC, esta associada à presença de alterações inflamatórias (VIÑUELAS et al., 2001; MÁRQUEZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2017), este estudo apresentou marcação positiva na IHQ, mesmo não sendo possível detectar amastigotas por meio da histopatologia.

Ikeda et al. (2007) e Barros e Magalhães (2011) da mesma forma, não conseguiram evidenciar a presença de formas amastigotas do parasito na medula cervical, torácica e lombar e nem em outras secções do SNC de cães com e sem sintomas neurológicos naturalmente infectados por *L. infantum*; no entanto, os autores mostraram marcação de antígeno nas paredes dos vasos sanguíneos e, por isso, passaram a sugerir a presença de antígenos parasitários circulantes.

Diferentemente da técnica histopatológica, a imuno-histoquímica, apesar de basear-se na detecção direta do parasito, demonstra maior sensibilidade fornecendo resultados consistentes do diagnóstico em cães (MELO e MACHADO, 2009).

4.4 Detecção do DNA e quantificação da carga parasitária de *L. infantum* na medula espinhal

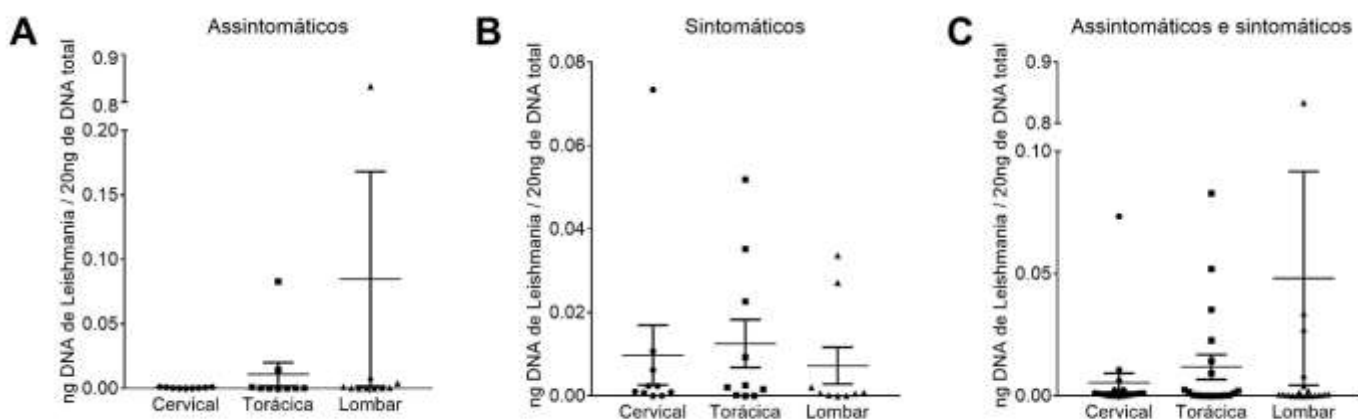
Dezessete (85%) dos vinte animais apresentaram positividade para *L. infantum* em todas as porções da medula espinhal (cervical, torácica e lombar) e somente três (15%) apresentaram em duas porções (Apêndice 1). De modo geral, todos os animais deste estudo se mostraram positivos para *L. infantum* em, pelo menos, duas porções da medula espinhal avaliadas.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos de Oliveira (2016) que também relatou em seu estudo a presença de *L. infantum* em 50 amostras de medula espinhal provenientes de cães naturalmente infectados, as quais grande parte das amostras (96%) mostraram positividade para o agente. Neste estudo um animal obteve média de 0,833 parasitos/ngDNA valor aproximado ao obtido por Oliveira et al. (2017), em estudo sobre a ocorrência de *L. infantum* no SNC de cães naturalmente infectados, detectaram o DNA do parasito em amostras de medula espinhal por meio da PCR quantitativa em tempo real, com carga parasitária neste tecido superior à encontrada no cérebro, apresentando média de 0,823 e -2, respectivamente. Achados feitos por Cardinot (2013) em um estudo para a detecção de *Leishmania* em encéfalos de 24 cães, 23 mostraram-se positivos na qPCR de carga parasitária.

Analizando os grupos deste estudo separadamente, pode-se observar que no grupo assintomático houve pouca dispersão entre os valores médios nas porções, todavia, um (1) animal manifestou-se com um valor médio de carga parasitária elevado na porção lombar (Figura 5A). Já no grupo sintomático, a dispersão mostrou-se maior. Um animal obteve a quantidade de carga elevada na porção cervical e, alguns, nas porções torácica e lombar mostraram-se um pouco acima da média (figura 5B). Ao comparar a quantificação de forma geral para ambos os grupos, observa-se que houve pouca dispersão nas porções cervical e lombar, porém, a porção torácica apresentou-se com uma média alta com relação às outras. A porção torácica destaca-se com a maior dispersão entre as demais (Figura 5C). Apesar disso, as diferenças observadas não se mostraram significativas estatisticamente para ambos os grupos.

Vale lembrar que as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os valores medianos obtidos neste estudo não se mostraram significativos estatisticamente, visto que os resultados foram maiores que $p < 0,05$.

Figura 5. Carga parasitária entre grupos sintomáticos e assintomáticos de cães com LV.

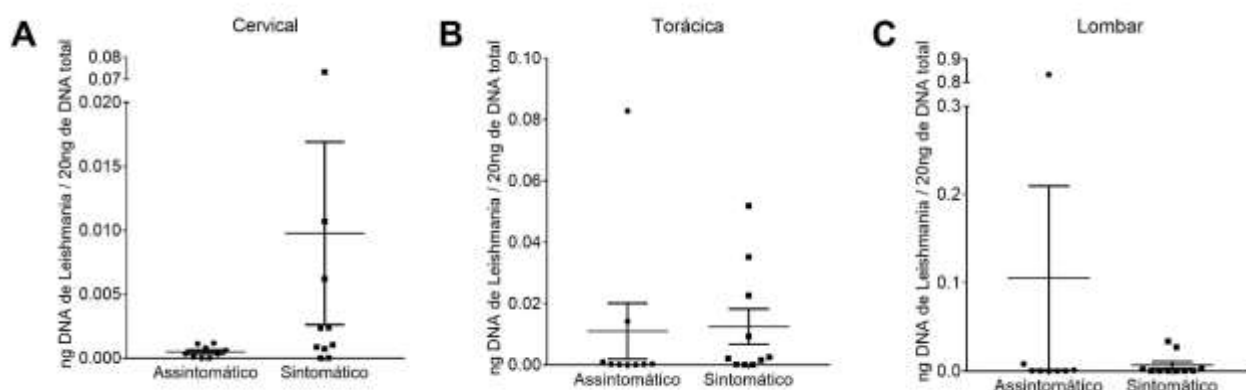


Em **A**, valores de média de parasitos por porção da medula espinhal no grupo assintomático, média da porção lombar elevada, sem apresentar dispersão entre as porções. Em **B**, valores da média de parasitos por porção da medula no grupo sintomático, com maior dispersão na porção torácica e animal com valor de carga parasitária elevado na porção cervical. Em **C**, valores de ambos os grupos para todas as porções da medula espinhal, maior dispersão na porção torácica e média elevada na porção lombar.

De acordo com esses resultados, pode-se inferir que a presença do parasito pode ser detectada em qualquer porção da medula espinhal, visto que as diferenças não foram estatisticamente relevantes quanto à quantidade de parasitos encontrados nos animais em ambos os grupos.

Com relação às porções da medula espinhal, percebeu-se que há uma leve variação da quantificação da carga parasitária entre as porções para ambos os grupos. As porções torácica e lombar não apresentam diferenças entre si tanto em sintomáticos quanto em assintomáticos, no entanto, a região cervical possui certa tendência à presença de parasitos, já que apresentou um valor de $p=0,0535$, aproximado do estimado para diferença estatisticamente significativa (Figura 6). Logo, a porção cervical possui uma maior probabilidade de apresentar diferenças na quantificação de carga parasitária entre os grupos.

Figura 6. Carga parasitária por porção de medula espinhal em cães sintomáticos e assintomáticos para LV.



Em **A**, porção cervical apresentando valor médio de parasitos elevado. Em **B** e **C**, não houve diferenciação entre a quantidade media de parasitos.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que relatam diferenças da carga parasitária entre as porções da medula espinhal. Estudos existentes realizaram *pool* das porções (cervical, torácica e lombar) ou utilizaram a porção cervical da medula (OLIVEIRA, 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Logo, até onde se tem conhecimento, este é um trabalho pioneiro neste tipo de relato.

A existência de parasitos no SNC pode estar relacionada aos danos causados na infecção por *Leishmania*, onde a barreira hematoencefálica pode ser danificada, resultando em uma disfunção, permitindo que o protozoário *L. infantum* atravesse e espalhe-se através do LCR, causando infecção no cérebro e medula espinhal de cães naturalmente infectados (MASOCHA e KRISTENSSON, 2012; OLIVEIRA et al., 2017).

No presente estudo, dezenove (19) animais positivos na qPCR de medula espinhal não apresentavam sinais clínicos neurológicos. Provavelmente, essa ausência de sinais está relacionada à evolução da infecção por *Leishmania* sp. nos mesmos, visto que o aparecimento destes sinais pode demorar mais tempo para ocorrer, devido a ação de células imunes, mediadores inflamatórios, componentes do parasito e, não necessariamente, pelo próprio protozoário (GRANO et al., 2014). Adicionalmente, o resultado da carga parasitaria do animal que apresentou paralisia dos membros pélvicos não se mostrou alto apresentando médias baixíssimas de parasitos/ngDNA.

De maneira complementar, Giannuzzi et al. (2017) sugerem que as complicações neurológicas podem ser devidas a cinco principais mecanismos presuntivos e/ou conhecidos: (1) o efeito direto dos parasitos no SN; (2) lesões imunomediadas relacionadas à infecção por

Leishmania; (3) complicações vasculares causadas pelos efeitos indiretos da leishmaniose; (4) complicações decorrentes da imunossupressão induzida pelo parasito; e (5) complicações suspeitas de estarem relacionadas ao tratamento farmacológico. Entretanto, é difícil incluir todos os mecanismos patogênicos em uma classificação rígida e também é provável que alguns deles atuem em diferentes estágios da doença ou que mais de um ocorra durante a determinação de lesões neurológicas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo, até o momento, permitem inferir que os testes de diagnósticos aplicados se mostraram eficientes na detecção da infecção por *Leishmania* nos tecidos de medula espinhal dos cães avaliados. Independente de cães naturalmente infectados apresentarem sintomatologia, o DNA de *L. infantum* pode ser detectado na medula espinhal.

Todos os animais foram positivos na qPCR para a carga parasitária de *L. infantum*, não apresentando variações estatisticamente significativas entre os grupos sintomáticos e assintomáticos, além disso, nas análises das porções entre os grupos, a porção cervical mostrou-se uma importante região para se obter dados sobre carga parasitária entre animais sintomáticos e assintomáticos, visto que o valor de p se mostrou próximo do significativo estatisticamente.

Podem haver lesões inflamatórias e degenerativas nas três porções da medula espinhal de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Adicionalmente, antígenos de *L. infantum*, através da imuno-histoquímica, podem ser detectados, associados ou não a processos inflamatórios na medula espinhal de cães naturalmente infectados.

As análises do teste sorológico ELISA estão em andamento. Os procedimentos de imuno-histoquímica também terão continuidade. Já os ensaios de qPCR para a expressão gênica serão iniciados, afim de buscar uma melhor compreensão da resposta imunológica do hospedeiro nessa região do SNC.

Contudo, é possível afirmar que os procedimentos propostos inicialmente poderão ser cumpridos dentro dos prazos e apresentados na versão final deste estudo.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N. J. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. **Neurochemistry International**, v. 45, p. 545–552, 2005.
- ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 41–53, 2006.
- ABBOTT, N. J.; PATABENDIGE, A. A.; DOLMAN, D. E.; YUSOF, S. R.; BEGLEY, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiology of Disease**, v. 37, p. 13-25, 2010.
- ABREU-SILVA, Ana Lúcia; LIMA, Tiago B.; DE MACEDO, Auricélio A.; MORAESJÚNIOR, Felipe de Jesus; DIAS, Elaine L.; BATISTA, Zulmira da S.; CALABRESE, Katia da S.; MORAES, Jorge Luiz P.; REBÊLO, José Manuel M.; GUERRA, Rita Maria S.N. de C. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 197-203, 2008.
- AKHOUNDI, Mohammad; KUHLS, Katrin; CANNET, Arnaud; VOTÝPKA, Jan; MARTY, Pierre; DELAUNAY, Pascal; SERENO, Denis. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALBUQUERQUE, T. D. R. **Correlação entre a resposta imunológica e as manifestações clínicas na Leishmaniose Visceral Canina**. Dissertação (Mestrado) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology letters**, v.99, n.1, p.17-23, 2005.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p.1–88, 2004.
- ALMEIDA, A.B.P.F *et al.* Inquérito soro epidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária Tropical**, v.42, n.2, p.156-159, mar./abr. 2009.
- ALMEIDA-SOUZA, Fernando; TANIWAKI, Noemi Nosomi, AMARAL, Ana Cláudia Fernandes; DE SOUZA, Celeste da Silva Freitas de Souza, CALABRESE, Kátia da Silva ABREU-SILVA, Ana Lúcia. Ultrastructural changes and death of *Leishmania infantum* promastigotes induced by *Morinda citrifolia* Linn. fruit (Noni) juice treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.
- ALMEIDA-SOUZA, Fernando. **Imunologia Básica**. Instituto Oswaldo Cruz. 2018.
- AMARA, A. et al. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 160, n. 1, p. 54-60, 2009.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.; SOLANO-GALLEGU, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n.7, p.324–330, 2008.

BECHMANN, I.; PRILLER, J.; KOVAC, A.; BÖNTER, M.; WEHNER, T.; KLETT, F. F.; BOHSUNG, J.; STUSCHKE, M.; DIRNAGL, U.; NITSCH, R. Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 1651-1658, 2001.

BEZERRA, J. M. T.; DE ARAÚJO, V. E. M.; BARBOSA, D. S.; MARTINS-MELO, F. R.; WERNECK, G. L.; CARNEIRO, M. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 9, 2018.

BLAVIER, A., et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.

BIRON, C. A.; GAZZINELLI, R. T. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. **Current opinion in immunology**, v.7, n.4, p.485-496, 1995.

BORGHI, Sergio M.; KENJI Victor Fattori; RUIZ-MIYAZAWA, W; MIRANDA-SAPLA, Milena M; CASAGRANDE, Rúbia; PINGE-FILHO, Phileno; PAVANELLI; Wander R. VERRI JR, Waldiceu A. *Leishmania (L.) amazonensis* induces hyperalgesia in balb/c mice: Contribution of endogenous spinal cord TNF α and NF κ B activation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 268, p. 1-12, 2017.

BRACHELENTE, C. et al. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Vet Pathol**, v. 42, n. 2, p. 166-75, Mar 2005.

BRADBURY, M.W., STUBBS, J., HUGHES, I.E., PARKER, P. The distribution of potassium, sodium, chloride and urea between lumbar cerebrospinal fluid and blood serum in human subjects. **Clin. Sci.** 25, 97–105, 1963.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, p.9-18, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral /** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**: [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2017**. 2018. Disponível em: <

<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniosevisceral/11334situacao-epidemiologica-dados> >. Acesso: 08 dez 2018.

BROWN, P. D.; DAVIES, S. L.; SPEAKE, T.; MILLAR, I. D. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. **Neuroscience**, v.129, p. 957–970, 2004.

BRUNO, Barbara et al. Serum indirect immunofluorescence assay and real-time PCR results in dogs affected by *Leishmania infantum*: evaluation before and after treatment at different clinical stages. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 31, n. 2, p. 222-227, 2019.

CAMARA, Brunno. **Linfócitos T CD4: Th1 e Th2**. Biomedicina Padrão. 2013. Disponível em: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2010/10/linfocitos-th1-e-th2.html>. Data de acesso: 08/09/2019.

CARVALHO, Amanda G. et al. Factors associated with *Leishmania* spp. infection in domestic dogs from an emerging area of high endemicity for visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil. **Research in Veterinary Science**, 2019.

CAUDURO, A.; FAVOLE, P.; LORENZO, V.; SIMONETTO, L.; BARDA, B.; CANTILE, C. ; ASPERIO, R. M. Paraparesis caused by vertebral canal leishmaniotic granuloma in a dog. **J Vet Intern Med**, v. 25, p. 398–399, 2011.

CHICHARRO, C.; MORALES, M. A.; SERRA, T.; ARES, M.; SALAS, A.; ALVAR, J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, sup. 1, p. 93-99, 2002.

COSTA, L. B.; BERTÚLIO, M. A.; RODRIGUES, H.; MACIEL, G. B.; FILHO, V. C.; RAMOS, S. R.; SOUZA, C. O.; SILVA, A. M.; BARROS, I. M. Ocorrência de Flebotomíneos Vetores da Leishmaniose Visceral nos Municípios do Estado de Mato Grosso. Congresso de Saúde Coletiva, Brasília, Distrito Federal. **Revista Abrasco** 8 (supl 2): 639, 2003.

COURA-VITAL, W., KER, H.G., ROATT, B.M., AGUIAR-SOARES, R.D.O., LEAL, G.G.A., MOREIRA, N.D., OLIVEIRA, L.A.M., DE MENEZES MACHADO, E.M., MORAIS, M.H.F., CORRÊA-OLIVEIRA, R., CARNEIRO, M., REIS, A.B., 2014. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS One** 9, e91009.

DA SILVA, S. M.; RABELO, P. F. B.; GONTIJO, N. F.; RIBEIRO, R. R.; MELO, M. N.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S. M. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 150-154, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGÓ, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; CAVALCANTI, M. P.; OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGÓ, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; CAVALCANTI, M. P.; OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DE FREITAS, José CC; PINHEIRO, Diana CSN. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências veterinárias**, v. 109, n. 55, p. 11-20, 2010.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina: grandes avances tecnológicos y baja aplicación práctica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com Leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **La Clinica Veterinaria**, v. 28, p. 36 – 44. 2000.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D. *Kirk's Current Veterinary Therapy XI*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992, p. 266-270.

FIGUEIREDO, M.J.F.M. *et al.* Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.15, n.1, p.102-106, jan./mar. 2014.

FIOCRUZ. EIE - **Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos**. Fiocruz. Disponível em:http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/manuais/leishmaniose/BM_014_08Bk_EIEleish_can.pdf. Fiocruz, 2008.

FONT, A. et al. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. **Journal of small animal practice**, v. 45, n. 4, p. 199-201, 2004.

FÖRSTER, C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, p. 55–70, 2008.

GALLUZZI, Luca et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, 2018.

GARCÍA-ALONSO, M.; NIETO, A. G.; BLANCO, A.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunology**, v. 18, n. 11, p. 539-546, 1996.

GIANNUZZI, A. P.; RICCIARDI, M.; DE SIMONE, A.; GERNONE, F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. **Journal of Small Animal Practice**, v. 58, n. 3, 125-138, 2017.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C. M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Res vet sci**, v. 84, p. 269–277, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRAMICCIA M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Vet Parasitol**, 181(1): 23- 30, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.019>. PMID:21570192.

GRANO, F. G.; MELO, G. D.; BELINCHÓN-LORENZO, S.; GOMEZ-NIETO, L. C.; MACHADO, G. F. First detection of *Leishmania infantum* DNA within the brain of naturally infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 376-380, 2014.

GRIMALDI, G.J.R., TEVA, A., FERREIRA, A.L., DOS SANTOS, C.B., PINTO, I., DE-AZEVEDO, C.T., FALQUETO, A., 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on dual-path platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 106, 54–59, 2012.

IKEDA, F. A.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; FEITOSA, M. M.; MACHADO, G. F.; PERRY, S. H. V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 5–11, 2007.

JAVIER, L.; MENESES, A. C. O.; ROCHA, A.; FERREIRA, M. S.; MARQUEZ, J. O.; CHAPADEIRO, E.; LOPES, E. R. Chagasic meningoencephalitis in the immunodeficient. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, p. 93–97, 1998.

JOSÉ-LÓPEZ, Roberto et al. Intramedullary spinal cord mass presumptively associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 2, p. 200-204, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. pp. 150, 167-168

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. pp. 155 - 171)

KONSMAN, J. P.; DRUKARCH, B.; VAN DAM, A. M. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. **Clinical Science**, v. 112, p. 1-25, 2007.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527–538, 2014.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 210-215, 2002.

LIMA, Wanderson Geraldo *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta tropica**, Basel, v. 92, n. 1, p. 43-53, Sep. 2004.

LIVAK, J.; SCHMITTGEN, D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $\Delta\Delta$ Ct Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001

MACAU, W. L.; DE SÁ, J. C.; DA SILVA, A. P. D. C.; ROCHA, A. L.; MONDÊGO-OLIVEIRA, R.; DE ANDRADE, F. H. E.; ABREU-SILVA, A. L. Main lesions in the central nervous system of dogs due to *Leishmania infantum* infection. **BMC veterinary research**, v. 13, n. 1, p. 255, 2017.

MAIA, C. S. F.; MONTEIRO, M. C.; GAVIOLI, E. C.; OLIVEIRA, F. R.; OLIVEIRA, G. B.; ROMÃO, P. R. T. Neurological disease in human and canine leishmaniasis – clinical features and immunopathogenesis. **Parasite Immunology**, v. 37, p. 385 – 393, 2015.

MARCONDES, M. Envolvimento do sistema nervoso central na leishmaniose visceral canina. 2009. 154 f. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Odontologia. Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

MÁRQUEZ, M.; PEDREGOSA, J. R.; LÓPEZ, J.; MARCO-SALAZAR, P.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, p. 142–146, 2013.

MASOCHA, W.; KRISTENSSON, K. Passage of parasites across the blood–brain barrier. **Virulence**, v. 3, p. 202–212, 2012.

MASOCHA, W.; ROTTENBERG, M. E.; KRISTENSSON, K. Migration of African trypanosomes across the blood–brain barrier. **Physiology & Behavior**, v. 92, p. 110–114, 2007.

MELO, G. D.; MACHADO, G. F. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral Leishmaniasis: a histopathological investigation. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 2, p. 69 – 74, 2009.

MELO, G. D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R. O.; MACHADO, G. F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 162, p. 248–256, 2009.

MELO, G. D.; MACHADO, G. F. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres. **Cell Tissue Res**, v. 346, p. 293–304, 2011.

MELO, G. D.; SERAGUCI, T. F.; SCHWEIGERT, A.; SILVA, J. E. S.; GRANO, F. G.; PEIRÓ, J. R.; LIMA, V. M. F.; MACHADO, G. F. Pro-inflammatory cytokines pre-dominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis. A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 57–66, 2013.

MELO, G. D. de et al. Compartmentalized gene expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 in the brain and peripheral lymphoid organs during canine visceral leishmaniasis. **Par. Immun.**, v. 36, n. 12, p. 726-731, 2014.

MELO, G. D.; SILVA, J. E. S.; GRANO, F. G.; SOUZA, M. S. B.; MACHADO, G. F. *Leishmania* infection and neuroinflammation: specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally-infected dogs. **Journal of Neuroimmunology**, v. 289, p. 21-29, 2015.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

MOHAMMADIHA, A.; HAGHIGHI, A.; MOHEBALI, M.; MAHDIAN, R.; ABADIE, A. R.; ZAREIB, Z.; YEGANEHF, F.; KAZEMIA, B.; TAGHIPOURA, G. N.; AKHOUNDIB, B.; BARATIB, M.; MAHMOUDIA, M. R. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, 2012.

MOREIRA, M.; LUVIZOTTO, M.; GARCIA, J.; CORBETT, C.; LAURENTI, M. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, p. 245-52, 2007.

NAG, S.; BEGLEY, D. J. Pathology and Genetics. **Cerebrovascular Diseases**. 2005.

NARANJO, C.; FONDEVILLA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; PEÑA, T. Detection of *Leishmania* spp. and associated inflammation in ocular-associated smooth and striated muscles in dogs with patent leishmaniosis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 3, p. 139-143, 2010.

NEVES, David Pereira. MELO, Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marcos; VITOR, Ricardo W. **Almeida. Parasitologia Humana**. Editora Atheneu Rio, 2016.

NIETO, C. G.; VIÑUELAS, J.; BLANCO, A.; GARCIA-ALONSO, M.; VERDUGO, S. G.; NAVARRETE, I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Veterinary Record**, v. 139, p. 346-347, 1996.

NOBEN-TRAUTH, N. et al. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. **Journal of immunology**, v. 170, n.10, p. 5152-5158, 2003.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

NUNES, C. M. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

OLIVEIRA, Valéria da Costa et al. **Ocorrência de *Leishmania infantum* em sistema nervoso central de cães naturalmente infectados: lesões associadas e isolamento parasitológico de tecidos e líquido**. 2016. Tese de Doutorado.

OLIVEIRA, V.; BOECHAT, V.; MENDES JUNIOR, A.; MADEIRA, M.; FERREIRA, L. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **Plos One**, v. 12, n. 4, 2017.

ORDEIX, Laura et al. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 121, 2017.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **Encuentro sobre vigilancia, prevención y control de leishmaniasis visceral (LV) en el Cono Sur de Sudamérica**. Foz do Iguazú, Brasil. 2009. Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16961&Itemid=>>. Acesso em: 28 jan. 2017.

PACIELLO, O.; OLIVA, G.; GRADONI, L.; MANNA, L.; MANZILLO, V. F.; WOJCIK, S.; TRAPANI, F.; PAPPARELLA, S. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, n. 2, p. 124-130, 2009.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas**. Leishmaniasis Report, n. 6, 2018. Disponível em:

<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34856/LeishReport6_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 21 out 2018.

PEIXOTO, M.H., OLIVEIRA, M.R.F., ROMERO, G.A.S., 2015. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Trop. Med. Int. Health** 20, 334–352, 2015.

PERSIDSKY, Y., RAMIREZ, S.H., HAORAH, J., KANMOGNE, G.D. Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. **Journal of NeuroImmune Pharmacology**, v. 1, p. 223–236, 2006.

PETERSEN. C. A.; BARR, S. C. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1065–1074, 2009.

PITTA, M. G.; ROMANO, A.; CABANTOUS, S.; HENRI, S.; HAMMAD, A. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n.8, p. 2379-87, 2009.

PRAGER, O.; FRIEDMAN, A.; NEBENZAHL, Y. M. Role of neural barriers in the pathogenesis and outcome of *Streptococcus pneumoniae* meningitis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 13, n. 3, p. 799-809, 2017.

PRASAD, Lala SN; SEN, Sandeep. Migration of *Leishmania donovani* amastigotes in the cerebrospinal fluid. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 6, p. 652-654, 1996.

QUARESMA, Patrícia Flávia. **Diagnóstico molecular da Leishmaniose visceral canina e quantificação da carga parasitária através da reação em cadeia da polimerase**. Tese de Doutorado, p. 1 - 118, 2007.

RIBEIRO, Vitor Márcio; MIRANDAC, Julia Bahia; MARCELINOD, PAIN; Andreza, DE ANDRADE; MONTEIRO, Héliida; REIS, Ilka Afonso; CARDOSO, Mariana Santos, GONTIJO, Célia Maria Ferreira; PAZ, Gustavo Fontes. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary parasitology**, 2019.

RODRIGUES, A.; FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SCHILD, A. L.; BARROS, C. S. L. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 251–258, 2009.

ROJAS, H.; RITTER, C.; DAL PIZZOL, F. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 222-227, 2011.

SARIDOMICHELAKIS M. N.; KOUTINAS A. F. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Vet Dermatol**; 25:61–71, 2014.

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is a required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **Journal of immunology**, v. 154, n.10, p. 5320-5330, 1995.

SCHWANKE, K., DA SILVA, A. M., PACHECO, A., BAHIA, M., SILVEIRA, F. T., SCOFIELD, A., & GÓES-CAVALCANTE, G. Diagnóstico molecular e frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em cães do município de Belém, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.3, p. 255-260, 2014.

SCHWARDT, T. F.; VIDES, J. P.; PACHECO, A. D.; LANGONI, H.; GENEROSO, D.; MACHADO, G. F.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M. Estudo da imunopatogenia das lesões no sistema nervoso central de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 442-451, 2012.

SHAW, J.J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. In: FARREL J., ed., *World Class Parasites: Leishmania*, v.4, Kluwer Academic Publishers. Boston, Dordrecht, London, 2003.

SILVA, R. C.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; KIKUTI, M.; MARSON, P. M.; LANGONI, H. Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. **Veterinary Quarterly**, v. 37, n. 1, p. 23–30, 2017.

SOLANO-GALLEGÓ, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1–18, 2009.

SOLANO-GALLEGÓ, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. F.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 86, 2011.

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

SOUZA, Celeste da Silva Freitas de; SILVA, Valmir Laurentino; LABARTHE, Norma. Evaluation of DPP® and SNAP® Rapid Tests for diagnosis of *Leishmania infantum* canine infections. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n. 5, p. 951–958, 2002.

TAFURI, W. L.; DE LIMA SANTOS, R.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of immunological methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniosis: A remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 203–212, 2001.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p.

TORRENT, E. et al. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, New York, v. 46, n.11, p. 549-552, 2005.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review [version 1; referees: 2 approved]. **F1000 Research**, v.6, n. 750, 2017.

TRONCARELLI, M. Z. **Infecção por *Leishmania* spp. e/ou por *Trypanosoma cruzi* em cães provenientes de área endêmica e não endêmica para Leishmaniose Visceral Canina**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2008.

VERA-IZAGUIRRE, D. S.; VEGA-MEMIJÉ, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; ARENAS, R. Leishmaniasis revisión. **Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica**, v. 4, n. 4, p. 252–260, 2006.

VIÑUELAS, J.; GARCIA-ALONSO, M.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRÓN, C.; CARCELÉN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 23–27, 2001.

WEIRATHER, J.L.; JERONIMO, S.M.B.; GAUTAM, S.; SUNDAR, S.; KANG, M.; KURTZ, M.A.; HAQUE, R.; SCHRIEFER, A.; TALHARI, S.; CARVALHO, E.M.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. 2011. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **J. Clin. Microbiol.** 49, 3892-3904, 2011.

WILHELM, T. J. Viszerale Leishmaniose. **Der Chirurg**, p. 1-5, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The leishmaniasis: timeline of facts and the formidable quest for disease control**. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/news/Leishmaniasis-timeline-of-facts-and-the-quest-disease-control/en/>. Acesso em: 21 out 2018.

WOYAMES PINTO, A.J., RIBEIRO, V.M., TAFURI, W.L., 2016. The immunochromatography use in canine visceral leishmaniasis in Brazil: a “quick solution” of a complex diagnostic? Rapid test in dogs with leishmaniasis. **Ann. Clin. Cytol. Pathol.** 2, 2016.