

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA E DA RIBOFLAVINA NA
INATIVAÇÃO DA *Leishmania infantum chagasi* EM SANGUE
CANINO CONSERVADO EM BOLSAS PARA TRANSFUÇÃO

SORAYA REGINA SACCO

Botucatu – SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA E DA RIBOFLAVINA NA
INATIVAÇÃO DA *Leishmania infantum chagasi* EM SANGUE
CANINO CONSERVADO EM BOLSAS PARA TRANSFUSÃO

SORAYA REGINA SACCO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mary Marcondes

Nome do Autor: Soraya Regina Sacco

Título: AÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA E DA RIBOFLAVINA NA INATIVAÇÃO DA *Leishmania infantum chagasi* EM SANGUE CANINO CONSERVADO EM BOLSAS PARA TRANSFUSÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Hélio Langoni
Membro
Departamento de Higiene e Inspeção Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Regina Akemi Takahira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Cecília Braga Laposy
Membro
Departamento de Patologia Clínica Veterinária
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana
Membro
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP –
Jaboticabal

Data da Defesa: 18 de novembro de 2013.

*"Eu queria sair de tudo o que eu era,
para entrar num destino melhor."*

João Guimarães Rosa

Para meus grandes amores,

Cesar & Georgia

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente, a Deus que com sua sabedoria e bondade infinita guiou-me em todos os momentos, colocando todas estas pessoas maravilhosas em meu caminho.

Agradeço de maneira especial ao meu orientador Professor Raimundo Souza Lopes, que com sua experiência de vida e vivência acadêmica me orientou neste trabalho. Agradeço ao Sr. pela confiança, paciência, incentivo e pelos ensinamentos transmitidos desde a época da graduação, que me proporcionaram a conquista do título de Mestre e agora de Doutora, sempre me encorajando apesar das dificuldades.

Ao meu marido Cesar Rodrigo de Souza Surian, pela ajuda em todas as fases do projeto, desde a elaboração, colheitas e análises; além disto, por ser sempre tão companheiro, sendo de fundamental importância na obtenção deste título. Agradeço ainda pelo carinho, apoio, e por fazer me sentir especial e amada.

À minha filhinha Georgia Sacco Surian, que é um presente deste amor, por ter vindo completar as nossas vidas, nos fazendo ver como o mundo pode ser ainda mais maravilhoso.

À minha mãe, Viviane Teresa Sacco, pelo amor e dedicação, estando sempre ao meu lado em todos os momentos, com seu jeito meigo e forte, me fazendo ver que a vida é feita de grandes desafios e me dando força para enfrentá-los.

À minha tia, Valderes Sacco, que não mediu esforços em me ajudar, desde uma simples tradução até me fazer ir em frente, nunca desistindo dos meus sonhos.

Aos meus tios, Walkiria Regina Sacco Piedade e Vancley Sacco, e também aos meus primos Aline Regina Piedade, Patrícia Regina Piedade, José Antonio Piedade Júnior, Tiago Felipe Sacco e Maria Sílvia Sacco pelo carinho e auxílio em muitas ocasiões, sempre me estimulando a ser uma pessoa melhor.

A todos os meus familiares, que mesmo distantes, são fundamentais em minha vida. Agradeço também à família do meu marido, sua mãe Maria Rachel

de Souza, e suas tias Maria Thereza Marques, Maria Aparecida Dib e Ana Lúcia Costa pelo carinho comigo.

Às minhas amigas Maria Francisca Neves e Vanessa Zappa, por terem compartilhado comigo a mesma sala, momentos inesquecíveis e apoio nas dificuldades. Foi uma alegria trabalhar com pessoas tão especiais.

À diretora da Faculdade de Tecnologia de Itapetininga – FATEC, Isolina Maria Leite de Almeida, e ao coordenador do curso de Agronegócio da FATEC, Fábio Entelmann, por confiarem em minha capacidade profissional e terem me proporcionado a oportunidade de fazer o que eu mais gosto na minha vida: ser professora.

Às professoras da graduação e pós-graduação, Prof^a. Dr^a. Regina Kiomi Takahira e Prof^a. Dr^a. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram, auxiliando mais uma vez nesta etapa da minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Mary Marcondes, por partilhar a sua experiência, nos encaminhando ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba-SP, permitindo o estudo dos cães do grupo leishmaniose. Obrigada também aos seus alunos de iniciação científica e da pós-graduação, principalmente o aluno Acácio Duarte Pacheco, que foi muito prestativo ao nos atender quando fomos ao CCZ.

Ao Prof. Dr. Hélio Langoni, pela parceria no projeto, autorizando a utilização do Infectório do setor de Zoonoses para inoculação e manutenção dos hamsters. Agradeço também aos seus alunos Rodrigo Costa da Silva, Virgínia Richini Pereira, Gabriela Capriogli Oliveira e Giselle Souza da Paz pelo auxílio na realização dos exames de biologia molecular e nas sorologias.

Ao pesquisador Antonio Cláudio Tedesco, que nos encaminhou ao Laboratório de Fototerapia no Departamento de Química da Faculdade da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, para auxiliar no estabelecimento da metodologia. Agradeço ainda seus alunos e funcionários, por ter nos recebido com tanto carinho e atenção.

Ao Prof. José Carlos de Figueiredo Pantoja do Departamento Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Ao funcionário do Laboratório Clínico Veterinário desta Faculdade, Márcio José Figueira, pelo incentivo e pelo auxílio nas dosagens bioquímicas.

Às alunas da pós-graduação do Laboratório Clínico Veterinário desta Faculdade, Camila Martos Thomazini, Tatiana de Sousa Barbosa e Leizinara Lopes pela amizade e ajuda em alguns passos do projeto.

Aos membros da minha banca examinadora, que atenderam ao meu convite e ao do Professor Raimundo, auxiliando nas correções do trabalho para que este se torne ainda melhor.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Resultados da redução <i>in vitro</i> de alguns vírus, utilizando-se a associação da riboflavina com luz UV.....	17
TABELA 2 -	Resultados da redução <i>in vitro</i> de alguns parasitas, utilizando-se a associação da riboflavina com luz UV.....	17
TABELA 3 -	Resultados da eficácia da redução <i>in vitro</i> de algumas bactérias, utilizando-se a associação da riboflavina com luz UV.....	18
TABELA 4 -	Cálculo da dose de luz UV em função da distância, área e tempo de iluminação das bolsas de sangue.....	30
TABELA 5 -	Estatística descritiva para número de hemácias, determinação da hemoglobina e do hematócrito em bolsas de sangue conservadas por 21 dias, provenientes de cães hípidos (grupo controle - G _C) e de cães com leishmaniose visceral (G _L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1(imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).....	42
TABELA 6 -	Índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) dos cães do grupo controle (G _C) e do grupo leishmaniose (G _L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1(imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).....	45
TABELA 7 -	Contagem de plaquetas, leucócitos totais e determinação da proteína total plasmática dos cães do grupo controle (G _C) e do grupo leishmaniose (G _L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1(imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).....	48
TABELA 8 -	pH sanguíneo das bolsas dos cães do grupo controle (GC) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).....	52
TABELA 9 -	pH sanguíneo das bolsas dos cães do grupo leishmaniose (GL) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).....	52
TABELA 10 -	Determinação da concentração plasmática de sódio e potássio do sangue das bolsas dos cães do grupo controle (G _C) e do grupo leishmaniose (G _L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1(imediatamente após a colheita), M2	

	(3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).....	54
TABELA 11 -	Carga parasitária (/μL) (média e desvio padrão) das bolsas de sangue positivas na PCR convencional, determinada pela qPCR de amostras de bolsa três e cinco obtidas respectivamente de animal sintomático e assintomático em todos os momentos deste a colheita (M0) até 21 dias de refrigeração (M8) e também após a adição de riboflavina (RB) e dos protocolos de luz UV utilizados TT1 (30 minutos) e TT2 (45 minutos).....	57
TABELA 12 -	Evolução clínica dos hamsters (número de animais que desenvolveram ou não sintomas/número total de animais) após inoculação de sangue de cão com leishmaniose nos diferentes tratamentos (grupo leishmaniose - G _L , grupo riboflavina - G _{RB} , grupo tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV - G _{T30} e grupo tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV - G _{T45}).....	61
TABELA 13 -	Resultado do PCR convencional dos Hamsters do grupo leishmaniose: amostras de sangue e macerado de baço, fígado e medula óssea.....	67
TABELA 14 -	Resultado do PCR convencional dos hamsters do grupo riboflavina: amostras de sangue e macerado de baço, fígado e medula óssea.....	67
TABELA 15 -	Resultado do PCR convencional dos hamsters do grupo tratado I (RB associada a 30 minutos de luz UV): amostras de sangue e macerado de baço, fígado e medula óssea.....	68
TABELA 16 -	Resultado do PCR convencional dos Hamsters do grupo tratado II (RB associada a 45 minutos de luz UV) amostras de sangue e macerado de baço, fígado e medula óssea.....	69
TABELA 17 -	Estatística descritiva da carga parasitária (/μL) obtida pela qPCR da medula óssea nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	70
TABELA 18 -	Estatística descritiva da carga parasitária (/μL) obtida pela qPCR do baço nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	71
TABELA 19 -	Estatística descritiva da carga parasitária (/μL) obtida pela qPCR do fígado nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	72
TABELA 20 -	Estatística descritiva da carga parasitária (/μL) obtida pela qPCR do sangue nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Refrigerador vertical para banco de sangue.....	23
FIGURA 2 -	A) Triagem de animais: cão com leishmaniose visceral evidenciando presença de sintomas da doença. B) Forma amastigota da <i>Leishmania</i> no interior de monócito.....	24
FIGURA 3 -	Realização do teste Kalazar Detect®.....	25
FIGURA 4 -	Preparação para o procedimento de transferência do sangue para a bolsa satélite.....	26
FIGURA 5 -	Amostras aliqotadas (100mL) prontas para homogeneização e colheita.....	27
FIGURA 6 -	Espectro de absorbância da riboflavina 50 µM em solução PBS.....	28
FIGURA 7 -	Espectro de fluorescência da riboflavina 50 µM em solução PBS.....	29
FIGURA 8 -	Teste para medir a distância e o tempo de exposição à luz UV para que fosse fornecido 6,2J/mL.....	30
FIGURA 9 -	Espectro de transmitância das diferentes bolsas testadas das marcas avaliadas JP e FK, sendo He: hemácias, Pla.: plaquetas e Plasma: a bolsa satélite de plasma.....	31
FIGURA 10 -	Iluminador luz UV em 365 nm, tendo abaixo o homogeneizador com a bolsa em seu interior, durante o procedimento de fotoinativação nos períodos estipulados (30 e 45 minutos).....	33
FIGURA 11 -	Resultados da PCR em gel de agarose 1,5% do animal 3 do grupo leishmaniose, positivo em todos os momentos (M0 _{b3} , M1 _{b3} , M2 _{b3} , M3 _{b3} , M4 _{b3} , M5 _{b3} , M6 _{b3} , M7 _{b3} , M8 _{b3}), inclusive após a adição de riboflavina (RB) e do tratamento com luz durante ambos os tempos de exposição (TT1 e TT2). Controles positivo (C+) e negativo (C-) e padrão (P)...	34
FIGURA 12 -	Inoculação em hamster.....	35
FIGURA 13 -	Punção intracardiaca para colheita de sangue em hamster.	36
FIGURA 14 -	Média e erro padrão do número de hemácias, determinação da hemoglobina e do hematócrito dos cães do grupo controle (G _C) e do grupo leishmaniose (G _L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1(imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).....	37
FIGURA 15 -	Média e erro padrão do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) dos cães do grupo controle (G _C) e do grupo leishmaniose (G _L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1(imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).....	47
FIGURA 16 -	Média e erro padrão da contagem de plaquetas, leucócitos totais e determinação da proteína total plasmática dos cães	

	do grupo controle (G _C) e do grupo leishmaniose (G _L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).....	49
FIGURA 17 -	A) Aglomerados de eosinófilos em esfregaço sanguíneo proveniente de sangue estocado em bolsa para transfusão de cães hípidos (grupo controle). B) Aglomerados de linfócitos em esfregaço sanguíneo do grupo leishmaniose.	50
FIGURA 18 -	Medianas da fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) expressa como H50 ([NaCl] correspondente a 50% de hemólise dos grupos controle e leishmaniose, durante 21 dias de conservação do sangue sob refrigeração).....	51
FIGURA 19 -	Média e erro padrão do pH sanguíneo das bolsas dos cães do grupo controle (G _C) e do grupo leishmaniose (G _L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).....	53
FIGURA 20 -	Média e erro padrão dos valores plasmáticos de sódio (Na) e potássio (K) das bolsas dos cães do grupo controle (G _C) e do grupo leishmaniose (G _L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).	55
FIGURA 21 -	Porcentagem de lâminas positivas e negativas para <i>L. infantum chagasi</i> em “imprinting” dos órgãos linfoides (medula óssea, baço e fígado) dos hamsters dos grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	63
FIGURA 22 -	Porcentagem de lâminas positivas e negativas para <i>L. infantum chagasi</i> em “imprinting” de medula óssea dos Hamsters dos grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	64
FIGURA 23 -	Porcentagem de lâminas positivas e negativas para <i>L. infantum chagasi</i> em “imprinting” de baço dos Hamsters dos grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	65
FIGURA 24 -	Porcentagem de lâminas positivas e negativas para <i>L. infantum chagasi</i> em “imprinting” de fígado dos Hamsters dos grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	66
FIGURA 25 -	Média e erro padrão da carga parasitária (/μL) de <i>Leishmania</i> na medula óssea dos Hamsters nos diferentes	

	grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	71
FIGURA 26 -	Média e erro padrão da carga parasitária (μL) de <i>Leishmania</i> no baço dos Hamsters nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	72
FIGURA 27 -	Média e erro padrão da carga parasitária (μL) de <i>Leishmania</i> no fígado dos Hamsters nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	73
FIGURA 28 -	Média e erro padrão da carga parasitária (μL) de <i>Leishmania</i> no sangue dos Hamsters nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.....	74

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 Geral.....	5
2.2 Específicos	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1 Etiologia, patogenia, sinais clínicos e diagnóstico da leishmaniose visceral	7
3.2 Transmissão de patógenos através da transfusão sanguínea	11
3.3 Tecnologia de redução/inativação de patógenos	12
3.3.1 Riboflavina associada à luz UV	13
3.3.1.1 Mecanismo de ação	13
3.3.1.2 Toxicologia e segurança.....	14
3.3.1.3 Protocolo da associação riboflavina e luz UV para sangue total	14
3.3.1.4 Inativação de leucócitos	15
3.3.1.5 Alterações laboratoriais	15
3.3.1.6 Experiência no uso da riboflavina associada à luz UV	16
3.3.2 Experiência no uso da tecnologia de redução/inativação sobre <i>Leishmania</i> sp	18
3.4 Lesões de “estocagem”	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Conservação do sangue em bolsas para transfusão: primeira etapa.....	23
4.1.1 Colheita das amostras do grupo controle (G _C)	23
4.1.2 Colheita das amostras do grupo leishmaniose (G _L)	24
4.1.3 Análises laboratoriais	25
4.1.4 Análise estatística	27
4.2 Avaliação da eficácia da riboflavina sob ação da luz ultravioleta na inativação de <i>Leishmania infantum chagasi</i> em sangue canino conservado para transfusão: segunda etapa.....	27
4.2.1 Preparação da riboflavina.....	27
4.2.2 Determinação da metodologia.....	27
4.2.4 Inoculação em hamster	33
4.2.4.1 Análises laboratoriais	34
4.2.4.1.1 PCR convencional e PCR em tempo real.....	35
4.2.4.1.2 Métodos sorológicos.....	36
4.3 Análises estatísticas	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Conservação do sangue em bolsas para transfusão: primeira etapa.....	39
5.1.1 Análises hematológicas das bolsas de sangue	39
5.1.2 Teste de fragilidade osmótica.....	49
5.1.3 Determinação do pH	50
5.1.4 Determinação plasmática do sódio/potássio	52
5.1.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	54
5.1.6 Real-time PCR (qPCR).....	55

5.1.7 Sorologia	57
5.2 Avaliação da eficácia da riboflavina sob ação da luz ultravioleta na inativação de <i>Leishmania infantum chagasi</i> em sangue canino conservado para transfusão – segunda etapa	60
5.2.1 Sinais e sintomas clínicos observados nos hamsters e necropsia	60
5.2.2 <i>Imprinting</i> medula óssea, baço e fígado	62
5.2.3 PCR convencional	65
5.2.4 qPCR	68
6. CONCLUSÕES	7576
7. REFERÊNCIAS	7778
8. TRABALHOS CIENTÍFICOS	1

SACCO, S. R. **Ação da luz ultravioleta e da riboflavina na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado em bolsas para transfusão.** Botucatu, 2013. 134p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

É de extrema importância para a medicina transfusional que haja segurança no procedimento de transferência de hemocomponentes, minimizando a ocorrência da transmissão de patógenos. O presente trabalho visa caracterizar as possíveis alterações hematológicas e bioquímicas, ocorridas durante o período de 21 dias de armazenamento das amostras de sangue canino colhidas em bolsas plásticas para transfusão, investigando ainda a eficiência do tratamento destas bolsas com luz ultravioleta e riboflavina na inativação de *Leishmania infantum chagasi*. Para isto, realizou-se hemograma, teste de fragilidade osmótica, determinação da concentração sérica de sódio e potássio, testes sorológicos e moleculares, comparando-se um grupo de bolsas de sangue colhidas de cães parasitados com *L. infantum chagasi*, com um grupo de bolsas de sangue obtidas de cães hígidos. Após as análises laboratoriais *in vitro*, o sangue canino parasitado foi submetido ao tratamento com riboflavina e luz UV por 30 e 45 minutos e inoculado em hamsters. O sangue de cães com leishmaniose armazenado em bolsas para transfusão demonstrou: anemia, hiperproteinemia, trombocitopenia, hipercalemia, diminuição do pH, 100% das RIFIs positivas (título 1:640) e PCR convencional positiva em 20% dos animais, demonstrando a importância do hemograma, exames bioquímicos e dos testes laboratoriais de diagnóstico da leishmaniose na seleção dos doadores. O sangue parasitado não perdeu a capacidade de produzir a infecção após o período de armazenamento. Os hamsters inoculados com sangue tratado com riboflavina e luz UV por 30 e 45 minutos apresentaram PCR positiva, apesar de não apresentarem sinais e sintomas clínicos da enfermidade. Na qPCR pode-se identificar que a associação da riboflavina com a luz UV reduziu o número de leishmanias, diminuindo a carga parasitária, porém não eliminou completamente os parasitas.

Palavras-chave: cão, leishmaniose, luz UV, vitamina B₂, sangue total.

SACCO, S. R. **Action of ultraviolet light and riboflavin in the inactivation of *Leishmania infantum chagasi* in canine blood stored in bags for transfusion.** Botucatu, 2013. 134p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Providing safety during the transfusion of blood products is of major importance in transfusion medicine; this requires a proper blood to minimize the occurrence of pathogen transmission. The present work aims to characterize the possible hematological and biochemical changes that occur during the 21 days of storage of canine blood samples collected in plastic bags for transfusion and to investigate the treatment efficiency of these bags with ultraviolet light and riboflavin in inactivating *Leishmania infantum chagasi*. Total blood count, osmotic fragility test, determination of serum sodium and potassium, serological and molecular tests were performed comparing a group of bags of blood taken from dogs infected with *L. infantum chagasi*, with a group of bags of blood obtained from healthy dogs. After this, the parasitized canine blood was subjected to the treatment with riboflavin and UV light for 30 to 45 minutes and inoculated in hamsters. The blood of dogs with leishmaniasis stored in bags for transfusion showed anemia, hyperproteinemia, thrombocytopenia, hyperkalemia, decreased pH, 100 % of RIFs positive (1:640 titer) and conventional PCR positive in 20% of animals, demonstrating the importance of blood count, biochemical tests and laboratory tests for the diagnosis of leishmaniasis in blood donor selection. The parasitized blood has not lost the ability to produce infection after the storage period. Hamsters inoculated with blood treated with riboflavin and UV light for 30 and 45 minutes were PCR positive, although not presenting clinical signs and symptoms of the disease. The qPCR can identify that the combination of riboflavin with UV light reduced the number of *Leishmania*, reducing the parasitic load, but did not completely eliminate parasites

Keywords: dog, leishmaniasis, UV light, vitamin B₂, whole blood.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) ocorre em 66 países localizados em regiões tropicais e subtropicais (DESJEUX, 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2011), sendo que 90% dos casos são provenientes de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (ALVAR et al., 2012). Na América Latina, a doença foi descrita em pelo menos 12 países, distribuídos desde o México até o norte da Argentina, sendo 95% dos casos de ocorrência no Brasil (BRASIL, 2003; LAINSON e RANGEL, 2005; ALVAR et al., 2012).

Segundo dados do Ministério da Saúde, no ano de 2011, dos 27 estados brasileiros, 25 já notificaram casos autóctones da enfermidade, principalmente nas regiões norte, sudeste e nordeste (BRASIL, 2012).

A leishmaniose visceral no Estado de São Paulo, até 1998, era conhecida pela detecção de casos importados, oriundos de outras regiões endêmicas do país. A partir daquele ano registrou-se pela primeira vez um caso autóctone de leishmaniose visceral canina (LVC) em Araçatuba, região noroeste do Estado, com posterior registro do primeiro caso humano no ano de 1999 (GALIMBERTTI et al., 1999; FEITOSA et al., 2000).

Até recentemente a leishmaniose visceral era considerada uma doença de zonas rurais e de ambientes silvestres, mas atualmente está presente em zonas suburbanas e urbanas (BRASIL, 2006; BRASIL, 2012).

As leishmanias são parasitos intracelulares obrigatórios que se reproduzem dentro do sistema fagocítico mononuclear dos mamíferos suscetíveis (BADARÓ e DUARTE, 1996). No Brasil o principal vetor da LV é a *Lutzomyia longipalpis* (BAUZER et al., 2007). Apesar de a transmissão vetorial por flebotomíneos ser a mais importante na epidemiologia da leishmaniose, tem-se relatado outras vias de infecção. Carrapatos e pulgas têm sido estudados, experimentalmente, como possíveis transmissores da leishmaniose visceral canina (COUTINHO et al., 2005; COUTINHO e LINARDI, 2007). Shaw (2007) e Solano-Gallego et al. (2011) também relatam a transmissão de leishmaniose visceral através de transfusão sanguínea e transplante de órgãos.

Mathur e Samantaray (2004) demonstraram a sobrevivência da *Leishmania* no sangue e seus derivados quando em condições de armazenamento em bancos de sangue humanos. Além disto, anticorpos anti-

Leishmania foram encontrados em 11 dos 1449 doadores de sangue do distrito de Agrigento, na Sicília, Itália (0,75% dos casos) (SCARLATA et al., 2008) e em 44 de 1437 doadores (3,1%) de Baleares, na Espanha (RIERA et al., 2008). No entanto, a sorologia para Leishmaniose visceral não é realizada rotineiramente entre os doadores de sangue.

A segurança e a eficácia da transfusão requerem que o sangue seja obtido de um doador de baixo risco, e que este seja adequadamente manuseado e armazenado, de forma a preservar sua função, com a finalidade de se administrar os componentes sanguíneos com menor risco de transmissão de doenças e de reações adversas (KRISTENSEN e FELDMAN, 2005; KESSLER et al., 2010).

Ao contrário da medicina humana, que tem como foco a prevenção de transmissão de agentes virais, a maior preocupação com os doadores caninos são os protozoários, devido ao longo período de incubação, persistência subclínica em animais infectados e a probabilidade de permanecerem viáveis na bolsa de sangue. A transmissão de babesiose e leishmaniose visceral durante transfusão sanguínea em cães foi documentada por Owens et al. (2001), Stageman et al. (2003) e por Freitas et al. (2005).

Existem maneiras de se evitar a transmissão de agentes patogênicos, ou de se inativar os patógenos envolvidos nas infecções transmitidas por transfusão sanguínea. Uma das técnicas promissoras para o estabelecimento da inativação dos agentes patogênicos é a utilização da riboflavina associada à luz ultravioleta (UV).

Desta forma, o presente trabalho investigou a eficácia do tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado para transfusão, evitando que este agente patogênico possa ser transmitido em procedimentos de terapia pelo sangue.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a eficácia do tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado, evitando que este agente patogênico possa ser transmitido em procedimentos de transfusão.

2.2 Específicos

Determinar as possíveis alterações nos exames hematológicos e bioquímicos, e dos resultados dos testes laboratoriais de diagnóstico da leishmaniose no sangue canino, obtido de animais hígidos e de cães parasitados com *Leishmania infantum chagasi*, quando conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, durante 21 dias.

Verificar se o sangue parasitado tratado com riboflavina e luz ultravioleta é capaz de causar a doença em animais suscetíveis (hamster).

Avaliar a eficácia do tratamento com riboflavina e luz ultravioleta na inativação, redução ou completa eliminação dos parasitas intracelulares *Leishmania infantum chagasi*.

Revisão de Literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Etiologia, patogenia, sinais clínicos e diagnóstico da leishmaniose visceral

As espécies causadoras de leishmaniose visceral pertencem ao subgênero *Leishmania*, complexo *Leishmania donovani*. Neste complexo incluem-se as espécies *Leishmania donovani*, causadora do calazar na Índia, Paquistão, Bangladesh e em países da África Oriental; *Leishmania infantum* responsável pelo calazar no Mediterrâneo, África Central e Ocidental, Oriente Médio e China. Nas Américas, a leishmaniose visceral é causada por *Leishmania infantum chagasi* (REY, 2001; PRATA e SILVA, 2005).

Alguns autores por meio de pesquisas imunológicas e genéticas têm demonstrado não haver diferenças significativas entre *L. infantum* e *L. chagasi* aliando a isso a introdução do calazar nas Américas por cães ou pacientes vindos da Bacia do Mediterrâneo e adaptação a um ecossistema onde o cão, o homem e flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* mantêm o ciclo parasitário (MAURICIO et al., 2000; REY, 2001). Shaw (2007) também evidencia semelhanças entre as espécies por meio de estudos moleculares, permitindo a denominação *L. infantum chagasi*.

As leishmanias são protozoários pleomórficos com formas promastigotas e paramastigotas que se desenvolvem no trato alimentar de um inseto hospedeiro, e formas amastigotas que vivem e se multiplicam no interior de células do sistema mononuclear fagocitário de um hospedeiro vertebrado (RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; SLAPPENDEL e FERRER, 1998).

No ambiente doméstico o cão é considerado o principal reservatório epidemiológico, o que gera dificuldades no controle da doença (MARZOCHI et al., 1985; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; FEITOSA et al., 2000).

Segundo Pinelli et al. (1994), os cães infectados apresentam imunidade celular diminuída e desenvolvem potente resposta humoral, que não é eficaz para eliminação do protozoário. Com a progressão da doença, há uma redução nas células CD4+ e CD8+, mas isso não ocorre de maneira proporcional, o desbalanço dessas populações e de citocinas exacerba a resposta imune

humoral, aumentando a disseminação parasitária em órgãos linfóides (PINELLI et al., 1994; REIS et al., 2006).

As células CD4⁺ são mais importantes nas duas primeiras semanas após a infecção, quando a multiplicação parasitária ainda está ocorrendo, principalmente na formação de granulomas hepáticos, porém posteriormente, essa população de células se reduz e é substituída por células CD8⁺, no momento em que o progresso da infecção é controlado (GOTO e LINDOSO, 2004).

Estudos com modelos murinos têm mostrado que a resposta mediada por células Th1 é responsável pela resolução da infecção e que a proliferação de células Th2 exacerba a infecção, caracterizando uma infecção com resposta polarizada (ROGERS et al., 2002). A leishmaniose canina, assim, exhibe polarização, visto que cães com infecção crônica, tanto natural quanto experimental, podem apresentar sintomatologia específica, com doença progressiva e fatal (susceptíveis) ou serem assintomáticos, apresentando resistência à infecção (PINELLI et al., 1994).

Os macrófagos ativados em função da interação com o parasito ou através das citocinas secretadas pelas células efectoras Th1 passam a produzir óxido nítrico (NO) o qual é requerido para uma efetiva destruição de um elevado número de patógenos (SHIN et al., 2000).

Desta forma, a resposta imune direcionada por Th1, mediada por Interferon- γ e TNF- α , predominante nos cães assintomáticos tem sido relacionada à resistência à doença, enquanto que a resposta imune mediada por Th2, com produção de IL-4 e IL-10, é relatada nos casos sintomáticos (FREITAS e PINHEIRO, 2010).

As manifestações clínicas da leishmaniose são similares em cães e nos humanos, exceto pelas alterações dermatológicas, frequentes em cães e não verificada em humanos, e incluem febre por longos períodos, anemia, perda de peso progressiva e caquexia nos estágios finais da doença. Nos órgãos linfóides, a proliferação de linfócitos B, plasmócitos, histiócitos e macrófagos podem resultar em linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia generalizadas (IKEDA-GARCIA et al., 2003). As lesões dermatológicas são muito frequentes nos animais com leishmaniose visceral e podem ocorrer na ausência de outros

sinais clínicos (FEITOSA et al., 2000; IKEDA-GARCIA et al., 2003; IKEDA-GARCIA, 2004).

Por ser uma doença de notificação compulsória, o diagnóstico da leishmaniose visceral deve ser realizado da forma mais precisa possível, e para isso é importante que se conheça o método utilizado, suas limitações e sua interpretação clínica (FERRER, 1999; BRASIL, 2003). Existem basicamente três categorias de provas utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose visceral: os métodos parasitológicos, os métodos sorológicos e os métodos moleculares (FERRER, 1999).

A forma mais segura de diagnóstico de leishmaniose visceral é a observação direta de formas amastigotas do parasita em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos (KONTOS e KOUTINAS, 1993; FERRER, 1999; IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2007). A especificidade deste método é virtualmente 100%, mas dependendo do tempo despendido procurando o parasita a sensibilidade passa a ser de no máximo 80% em cães sintomáticos e menor em cães assintomáticos (SLAPPENDEL e FERRER, 1998).

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes utilizando técnicas sorodiagnósticas constitui um instrumento essencial no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (FERRER, 1999; CIARAMELLA e CORONA, 2003). Em cães a soroconversão ocorre, em média, cinco meses após a infecção, podendo ocorrer entre um e 22 meses (PALTRINIERI et al., 2010). E de acordo com Ferrer (2002) os títulos permanecem elevados por, pelo menos, dois anos.

Os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* obtidos por meio de exames sorológicos nem sempre estão associados com a severidade dos sintomas e devem ser interpretados com cautela. Títulos baixos geralmente são observados em cães infectados assintomáticos e em cães provenientes de áreas endêmicas e expostos ao parasita (PALTRINIERI et al., 2010).

Animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania* (FERRER, 1999; FERRER, 2002). Até meados de novembro de 2011, as técnicas sorológicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para o inquérito canino eram a imunofluorescência indireta (RIFI) e o ELISA, contudo, esses métodos estão

sendo substituídos gradualmente pela utilização de um teste rápido de imunocromatografia (DPP® - Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) como técnica de triagem e pelo ELISA como teste confirmatório da doença (BRASIL, 2011).

Os testes comerciais de imunocromatografia utilizam como antígeno o rK39 e têm sido úteis no diagnóstico de LV tanto em seres humanos quanto em cães, suas vantagens são simplicidade de uso, rapidez e praticidade, além da ausência de reação cruzada entre *Trypanossoma cruzi* e *L. infantum chagasi* (ZANETTE, 2006; SILVA et al., 2012).

Segundo Assis et al. (2008), a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se amostras de sangue pode ser de grande valia no diagnóstico da leishmaniose, confirmando casos positivos e inconclusivos pelo método sorológico da reação de imunofluorescência indireta. A escolha do tecido onde será realizada a pesquisa do DNA do parasita influencia a sensibilidade da reação. Nas amostras de sangue a sensibilidade é menor (NUNES et al., 2007), principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodos, pele e medula óssea (MIRÓ et al., 2008, PALTRINIERI et al., 2010).

Segundo Mortarino et al. (2004) a técnica de PCR em tempo real (qPCR) é um método avançado que pode detectar níveis extremamente baixos de parasitas, baseando-se na detecção e quantificação em tempo real da fluorescência emitida proporcionalmente à síntese do produto de PCR, sendo um método mais sensível do que a PCR convencional, com menor risco de contaminação, uma vez que o sistema é fechado.

De acordo com Paltrinieri et al. (2010) a técnica de PCR realizada no sangue periférico é mais eficaz para detectar estágios iniciais da infecção, enquanto a sorologia é melhor para os estágios mais avançados. No entanto a sensibilidade da PCR se eleva quando a pesquisa é realizada em órgãos linfoides como baço e fígado.

Ramos et al. (2012) compararam as técnicas de PCR convencional e tempo real utilizando amostras de medula óssea (MO), linfonodos e baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum chagasi*, sintomáticos e assintomáticos, observando que a qPCR amplificou o DNA das leishmanias de

100% das amostras dos animais sem sintomas, enquanto a PCR convencional detectou o parasita em apenas 20% destes animais.

Francino et al. (2006) relataram que a PCR convencional da MO só detectava cães com carga parasitária maior ou igual a 30 parasitas/mL, enquanto a qPCR da mesma amostra detectava cães infectados com menos de 1 parasita/mL.

Desta forma, a sorologia determina somente que o animal teve contato com o agente infeccioso, mas não é capaz de distinguir entre o parasitismo atual ou pregresso, enquanto a determinação da carga parasitária auxilia nesta diferenciação (MIRÓ et al., 2008).

A inoculação em animais de laboratório, mais comumente hamsters, tem sido utilizada em estudos experimentais (IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2007; GOMES et al., 2006). O desenvolvimento da leishmaniose nos animais inoculados foi acompanhado através do aumento de anticorpos séricos anti-*Leishmania*, esplenomegalia e da carga parasitária. Além disso, os hamsters inoculados com sangue de cães com leishmaniose desenvolveram sinais típicos da doença como caquexia, ascite e morte (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1996; DE SOUZA et al., 2001).

O modelo mais adequado para a infecção experimental na LV, de acordo com alguns estudos, é o hamster *Mesocricetus auratus*, pois esse animal mimetiza a patogenia e a clínica da doença humana e canina, manifestando a hepatoesplenomegalia e supressão da resposta das células T (GOTO, LINDOSO, 2004).

3.2 Transmissão de patógenos através da transfusão sanguínea

Antes da realização de uma doação de sangue o histórico do doador deve ser averiguado, o animal deve ser submetido a um exame físico e a testes de controle laboratoriais. O animal não deve estar sob qualquer tratamento, não deve ter histórico de doença grave ou contato com carrapatos ou outros hospedeiros ou vetores de doenças, além disto, não deve ter sido submetido à transfusão sanguínea anterior e, no caso de fêmeas, não devem estar prenhes (KRISTENSEN e FELDMAN, 2005).

A transmissão de enfermidades infecciosas através da transfusão sanguínea é bem documentada em Medicina Veterinária. A triagem dos doadores para as principais doenças que podem ser veiculadas pelo sangue é de extrema importância para não piorar a condição clínica do receptor. Existe um risco muito elevado de transmissão de agentes infecciosos, devido ao longo período de incubação e persistência da enfermidade sem sinais clínicos evidentes em animais infectados, existindo assim a probabilidade destes agentes permanecerem viáveis no sangue estocado (HARRELL e KRISTENSEN, 1995; OWENS et al., 2001; REINE, 2004; FREITAS et al., 2005).

3.3 Tecnologia de redução/inativação de patógenos

Os patógenos envolvidos nas infecções transmitidas por transfusão sanguínea são muitos heterogêneos, portanto o ideal é uma abordagem não específica de inativação de uma ampla variedade de organismos. A esterilização é um processo que destrói ou remove microrganismos patogênicos (ou não patogênicos) de um objeto ou solução, porém um item esterilizado não pode suportar a vida. Apesar das plaquetas e hemácias de mamíferos não possuírem um núcleo e, desta forma, não serem capazes de se reproduzir, possuem metabolismo respiratório ativo, sendo assim células vivas. Portanto, os procedimentos de esterilização comuns não são adequados para os produtos do sangue (BRYANT e KLEIN, 2007).

Os procedimentos de inativação de agentes patogênicos têm uma ampla atividade antimicrobiana, preservando todos os componentes do sangue e representando uma abordagem proativa para a segurança do sangue. O desafio de inativação de patógenos é reduzir ao máximo o maior número de potenciais agentes patogênicos do sangue, sem comprometer significativamente os constituintes celulares ou proteínas ou introduzir alguma toxicidade nova, carcinogenicidade, ou teratogenicidade (BRYANT e KLEIN, 2007).

As mais promissoras abordagens para a tentativa de inativação, até o momento, são métodos que têm por alvo o impedimento da replicação do patógeno no genoma de vírus, bactérias e protozoários (tratamento com

riboflavina e luz ultravioleta, azul de metileno e Psoralen). Os estudos *in vitro* foram realizados para garantir a sua segurança em termos de toxicidade para as células e/ou para os pacientes (WENDEL, 2002).

3.3.1 Riboflavina associada à luz UV

O tratamento de bolsas de sangue para transfusão através da associação riboflavina (RB) e luz UV tem se mostrado muito eficaz em estudos *in vitro* (GOODRICH, 2000; CORBIN, 2002). O conhecimento do perfil toxicológico da riboflavina e de seus derivados, sua grande utilização na dieta, assim como o uso de um foto sintetizador eficaz na inativação de patógenos, torna este procedimento promissor para ser utilizado no sangue e seus derivados (REDDY et al., 2008; REIKVAM et al., 2010).

Sua ação como agente inativador em componentes lábeis tem sido extensamente estudada, com reduções de 4 a 6 log nos títulos de vírus (intra e extra celulares) e bactérias, sem efeitos consideráveis sobre as plaquetas ou fatores de coagulação (WENDEL, 2002).

3.3.1.1 Mecanismo de ação

A riboflavina (vitamina B₂) participa em várias reações de óxido-redução celular, além de possuir importante papel na estrutura de várias enzimas. Por ser altamente solúvel, penetra rapidamente na célula. Desde a década de 60 já se conhecia a sua ação inativadora na presença de luz visível ou UV. Possui capacidade de agir como um fotossensibilizador causando danos seletivos aos ácidos nucleicos, após exposição à luz UV, sem se ligarem às células e proteínas (MARSCHNER e GOODRICH, 2011). A RB se associa aos ácidos nucleicos e intercede um processo de transferência de elétrons oxigênio-independente que leva à modificação dos ácidos nucleicos, principalmente sobre os resíduos de guanina, bem como a conversão da riboflavina ao seu fotoproduto lumichromo (SPEEK e ROSENKRANZ, 1979).

A utilização de luz UV, sem a adição de riboflavina, causa dano reversível ao ácido nucleico. Porém, os danos induzidos pela RB são irreversíveis, pois os processos de replicação e reparação são prejudicados

devido à modificação da base guanina (KUMAR et al., 2004). O número de lesões ocorrem com uma frequência de aproximadamente uma em cada 350 pares de base (bp) (GOODRICH et al., 2006). O dano em ácido nucleico pode ser menos frequente em DNA mitocondrial, conforme mostrado por Janetzko et al. (2007).

3.3.1.2 Toxicologia e segurança

A riboflavina é um componente elementar na dieta, apresentando uma baixa toxicidade. Entretanto, é uma molécula capaz de fazer a intercalação e a oxidação do DNA e RNA na presença de radiação ultravioleta (UV) (CORBIN, 2002; UNNA e GRESLIN, 1942 *apud* CALLAHAN et al., 2008).

Por ser uma substância naturalmente encontrada no organismo (assim como seus metabólitos, inclusive os induzidos pela foto-irradiação), não é considerada, até o momento, como mutagênica ou tóxica (CORASH, 2001).

3.3.1.3 Protocolo da associação riboflavina e luz UV para sangue total

Para o protocolo de redução/inativação de patógenos em sangue total, as hemácias devem ser combinadas com uma solução de riboflavina na concentração final de 500 μ M/L em solução salina 0,9%, obtendo-se uma concentração final de 50 μ M, e ser colocada no iluminador até atingir 60J/mL (RENTAS et al., 2007). Tonnetti et al. (2010) utilizaram 60 J/mL, 80 J/mL e 110 J/mL em protocolos de redução do *Trypanossoma cruzi* em sangue total, havendo completa inativação em todos os níveis de energia estudados.

A mistura deve ser exposta à luz UV na faixa de 450nm (luz azul), um comprimento de onda que possui mínima absorbância pela hemoglobina (GOODRICH, 2000; SEGATCHIAN e DE SOUSA, 2006). Para o sangue total o ideal de exposição à luz UV está na faixa de 280-350 nm com um pico a 313 nm (GOODRICH, 2010). Segundo Tonnetti et al. (2010) o tempo de exposição à luz ultravioleta geralmente é em torno de 7 a 10 minutos, mas depende do volume do componente sanguíneo.

Seltsam e Müller (2011) obtiveram melhores resultados na irradiação de luz UV quando, durante o procedimento, a bolsa de sangue estava sob agitação.

3.3.1.4 Inativação de leucócitos

O tratamento com riboflavina na presença da luz ultravioleta é capaz de inativar funcionalmente os leucócitos nos produtos sanguíneos e assim prevenir reações imunológicas resultantes da presença destes no sangue transfundido (FAST et al., 2006; GOODRICH, 2010).

Fast et al. (2006) compararam dois métodos de inativação de leucócitos e sua capacidade de reduzir a síntese de citocinas/quimiocinas derivadas destes. A irradiação gama não impediu a síntese e secreção de citocinas, embora as células já não fossem mais capazes de se proliferar. A associação de riboflavina com a luz ultravioleta resultou na inibição completa das citocinas/quimiocinas, com exceção de IL-8, todas as outras citocinas testadas estavam abaixo do limite de detecção do ensaio após o tratamento com RB mais luz UV.

3.3.1.5 Alterações laboratoriais

O órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA) atualmente usa como critérios para avaliar as técnicas de inativação/redução de patógenos a taxa de hemólise que deve ser inferior a 1%, no final do armazenamento; o conteúdo residual de leucócitos inferior a 5×10^6 /U (para unidades leucorreduzidas), e a recuperação de mais de 85% da massa de hemácias original, com 95% de confiança. Outras análises incluem parâmetros hematológicos padrões como a contagem de leucócitos, hemácias e plaquetas, concentrações de trifosfato de adenosina (ATP), 2,3-DPG, glicose, e lactato, bem como determinação do pH e avaliação morfológica (WEBERT et al., 2008)

De acordo com Goodrich (2010), após o tratamento utilizando a RB associada à luz UV, a taxa de hemólise foi baixa, sendo <0,2% tanto para as unidades tratadas quanto para o grupo controle, durante o armazenamento; sendo as curvas de fragilidade osmótica também similares entre os grupos durante os 42 dias de armazenamento. A concentração de proteínas também permaneceu a mesma, assim como a contagem de plaquetas e o pH, porém o

tratamento com a energia mais elevada (110J/mL de concentrado de hemácias) diminuiu as concentrações plasmáticas de glicose e aumentou as de lactato.

Segundo Weibert et al. (2008) a recuperação *in vivo* dos eritrócitos tem sido considerada como o padrão ouro de viabilidade. O ideal é a recuperação média de 75% das hemácias 24 horas após a reinfusão de eritrócitos radiomarcados com um intervalo de confiança de 95%.

3.3.1.6 Experiência no uso da riboflavina associada à luz UV

O uso da riboflavina em combinação com a luz UV apresenta uma efetividade na inativação de uma grande variedade de patógenos, tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus Pseudorábico, vírus do Nilo ocidental, Parvovírus, bactérias Gram positivas (*Staphilococcus epidermitis*), bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*), e alguns protozoários, sem comprometer os componentes sanguíneos por meio de subprodutos tóxicos, ou que induzam efeitos colaterais adversos, preservando a atividade e a funcionalidade dos componentes do sangue (CORBIN, 2002; KLEIN, 2005; CARDO et al., 2006; CARDO et al., 2007; CALLAHAN et al., 2008).

Lopes (2011) obteve redução da carga parasitária de *Anaplasma marginale* imediatamente após o tratamento de bolsas de sangue com riboflavina e radiação de luz UV, além disto, os animais que foram inoculados com sangue destas bolsas tiveram RIFIs negativas. A autora acredita que o tratamento não promoveu a completa eliminação do parasita, porém que ocorreu uma inativação parcial do *A. marginale*, já que os bezerros receptores não desenvolveram a enfermidade. Porém, Reis (2008), utilizando o protocolo de associação da riboflavina com a radiação ultravioleta não obteve eficácia na eliminação da *Babesia bigemina*.

As tabelas 1 a 3 apresentam a eficácia do tratamento com a associação de riboflavina à luz UV sobre vírus, parasitas e bactérias, respectivamente:

TABELA 1 - Resultados da redução *in vitro* de alguns vírus, utilizando-se a associação da riboflavina com luz UV.

Vírus	Modelo de vírus usado	Redução (Log/mL)	Tipo
HIV latente	HIV intracelular humano	4,5	envelopado
HIV ativo	HIV humano	5,9	envelopado
Nilo ocidental	Vírus do Nilo ocidental	≥ 5,1*	envelopado
Hepatite C	Vírus Sindbis	3,2	envelopado
Hepatite B	Vírus Pseudorábico	2,5	envelopado
Raiva	Vírus da estomatite vesicular	≥6,3	envelopado
Influenza	Vírus da Influenza A	≥5,0	envelopado
Citomegalovírus	Rinotraqueíte infecciosa bovina	2,1	envelopado
B19 humano	Parvovírus do suíno	≥5,0	não envelopado
Hepatite A	Hepatite A humana	1,8	não envelopado
Hepatite A	Vírus da encefalomiocardite	3,2	não envelopado

*Resultados expressos como maior igual (≥) indicam que o patógeno foi reduzido ao limite de detecção do ensaio. Fonte: Adaptado de Marschener e Goodrich, 2011.

TABELA 2 - Resultados da redução *in vitro* de alguns parasitas, utilizando-se a associação da riboflavina com luz UV.

Doença	Parasita	Redução (Log/mL)
Leishmaniose	<i>Leishmania donovani infantum</i>	≥4,0*
Malária	<i>Plasmodium falciparum</i>	≥3,2
Doença de Chagas	<i>Trypanossoma cruzi</i>	≥5,0
Babesiose	<i>Babesia microti</i>	≥4,0
Tifo rural	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	≥5,0

*Resultados expressos como maior igual (≥) indicam que o patógeno foi reduzido ao limite de detecção do ensaio. Fonte: Adaptado de Marschener e Goodrich, 2011.

TABELA 3 - Resultados da eficácia da redução *in vitro* de algumas bactérias, utilizando-se a associação da riboflavina com luz UV.

Bactéria	Tipo	Eficácia (%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram positivo	100
<i>Escherichia coli</i>	Gram negativo	100
<i>Bacillus cereus</i>	Gram positivo	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positivo	90
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Gram positivo	100
<i>Streptococcus mitis</i>	Gram positivo	100
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Gram positivo	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	Gram negativo	100
<i>Serratia marcescens</i>	Gram negativo	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram negativo	100
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gram negativo	100

Fonte: Adaptado de Marschener e Goodrich, 2011.

3.3.2 Experiência no uso da tecnologia de redução/inativação sobre *Leishmania* sp

Cardo e Asher (2006) utilizaram filtros de leucodepleção para remover *Leishmania* de hemocomponentes no momento da colheita do sangue, conseguindo remover as formas intracelulares de monócitos e macrófagos, e organismos extracelulares livres.

Wagner et al. (2008) obtiveram bons resultados na inativação de *Leishmania donovani infantum* em concentrado de hemácias suspensos em *thiazole orange*, e Eastman (2005) demonstraram a eficácia do psoraleno (*amotosalen*) e irradiação ultravioleta na inativação da *Leishmania major* em concentrado de plaquetas humanos.

Cardo et al. (2006), utilizando riboflavina e luz UV, obteve uma redução de 5 log de *Leishmania donovani infantum* em cinco de seis unidades de plasma e de 7 log na unidade restante. Além disto, demonstrou uma redução de 5 log de *Leishmania* em cinco de seis unidades de plaquetas, e de 6 log na unidade restante.

3.4 Lesões de “estocagem”

Os eritrócitos quando preservados sob condições de banco de sangue sofrem alterações químicas e estruturais conhecidas como “lesões de conservação”, expressão que significa um aumento da fragilidade osmótica eritrocitária, resultando em ruptura celular (DANON et al., 1964).

Segundo Lanevski e Wardrop (2001), a heparina e o citrato são anticoagulantes que não contribuem para a conservação das hemácias durante o armazenamento a longo prazo e o sangue total coletado com esses anticoagulantes deve ser utilizado dentro de 24 horas. Os conservantes mais comumente utilizados são o ácido citrato dextrose (ACD), citrato fosfato dextrose (CPD e CPD-2) e o citrato fosfato dextrose adenina (CPDA-1), ao qual é adicionado dextrose, fosfato de sódio e adenina para favorecer a viabilidade das hemácias, permitindo seu armazenamento por três a cinco semanas, dependendo do conservante utilizado.

No CPDA-1, a adenina participa como substrato para a síntese de adenosina trifosfato (ATP), que é o elemento básico para a manutenção da integridade da membrana eritrocitária, possibilitando o armazenamento do sangue por até 35 dias (WARDROP et al., 1994; KRISTENSEN e FELDMAN, 2005).

Alterações nas hemácias, tais como de forma, diminuição da deformabilidade de membrana e da relação superfície/volume, aumento da concentração média de hemoglobina e da fragilidade osmótica, aumento da agregação e da viscosidade intracelular podem ocorrer durante o armazenamento e podem eventualmente alterar o fluxo destas células através da microcirculação, influenciando o transporte de oxigênio para os tecidos (KAMENEVA et al., 1998; CICCIO e CICCIO, 2007). Durante o armazenamento, os eritrócitos sofrem alterações morfológicas progressivas, a partir de discos bicôncavos deformáveis para equinócitos (MEISELMAN, 1981; CICCIO e CICCIO, 2007), esferócitos, acantócitos (CAIRUTAS, 1985), esfero-equinócitos, esfero-estomatócitos, ovalócitos, e formas degeneradas (BLASI et al., 2012).

Em paralelo a estas modificações, ocorrem redistribuição e perda de fosfolípidos da membrana das células vermelhas, através da formação de microvesículas que podem ser vistas tanto em armazenamento, quanto em

hemácias consideradas “velhas” (POWELL et al., 1975; GREENWALT, 2006). Estas alterações são fundamentais nas propriedades pós transfusionais das hemácias e na sobrevivência nas primeiras 24 horas (HESS e GREENWALT, 2002).

Um aumento na concentração de hemoglobina das hemácias, durante o período de conservação, foi verificado por Goodstein et al. (1993), assim como uma diminuição do volume das células e aumento da densidade celular, da concentração de hemoglobina corpuscular e da viscosidade interna. Desta forma, os autores concluíram que o estoque de células sanguíneas por mais de 21 dias provoca um decréscimo no tempo de sobrevivência *in vivo*.

No sangue canino conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 a 4°C por 40 dias, Price et al. (1988) encontraram aumento gradual da fragilidade osmótica eritrocitária durante o período de estocagem. Segundo Oyewale et al. (2011) ocorre um aumento da fragilidade dos eritrócitos, de camelos e asininos após 48 e 72 horas de armazenamento do sangue a 4°C. Blasi et al. (2012) observaram, em humanos, que após 21 dias de conservação mais de 50% das hemácias exibiam formatos não discoides, sendo que esta observação foi relacionada ao aumento da fragilidade osmótica.

Segundo Gkoumassi et al. (2012), a taxa de hemólise (hemoglobina do sobrenadante (g/L) x (100 – hematócrito (%)) / hemoglobina total (g/L)) aumenta durante o período de estocagem de eritrócitos humanos e independe do procedimento de separação de hemocomponentes. Patterson et al. (2011) relataram reações agudas pós-transfusão em cães devido à hemólise que ocorreu nas bolsas de sangue por armazenamento inadequado.

Segundo Lopes et al. (1995), os leucócitos sofreram decréscimo gradual de sua contagem global, o que ocorre principalmente devido à degranulação de polimorfonucleares ao longo do tempo.

O sangue canino estocado em CPDA-1 apresenta aumento na concentração extracelular de potássio e sódio e diminuição no pH, na concentração plasmática de glicose, na concentração de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e na quantidade de ATP, sugerindo uma redução na capacidade de transporte de oxigênio pelos eritrócitos (WARDROP et al., 1994). Porém, atualmente sabe-se que embora haja esta queda, a oferta de oxigênio é

determinada principalmente pelo débito cardíaco, em vez de concentração de 2,3-DPG (TSAI et al., 2010).

A colheita de sangue, o processamento e as condições de armazenamento podem influenciar de forma significativa a qualidade dos componentes sanguíneos. Desta forma, para a realização de uma transfusão sanguínea em larga escala, são necessárias, não só a disponibilidade dos componentes sanguíneos e sua utilização apropriada, mas também a comprovação da qualidade destes componentes (ZIMRIN e HESS, 2009).

Um programa de seleção apropriada dos doadores sanguíneos para doenças infecciosas deve ser realizado para minimizar os riscos de transmissão de doenças pelo uso da transfusão sanguínea (WARDROP et al., 2005).

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Conservação do sangue em bolsas para transfusão: primeira etapa

4.1.1 Colheita das amostras do grupo controle (G_C)

Após tricotomia e antissepsia, foram colhidos 450mL de sangue da veia jugular, em bolsas plásticas triplas para transfusão contendo CPDA-1, de 10 cães, adultos, sendo cinco machos e cinco fêmeas, de raças variadas, com pesos corpóreos de aproximadamente 30 kg, clinicamente saudáveis, com exame físico (parâmetros semiológicos) e hemograma normais, apresentando sorologia e PCR negativos para *Leishmania infantum chagasi*, além de serem de região não endêmica (Itapetininga-SP).

Após a colheita, as amostras foram refrigeradas para transporte, sendo mantidas sob refrigeração¹ à temperatura de 4°C, durante 21 dias (Figura 1).



FIGURA 1. Refrigerador vertical para banco de sangue. (Fonte: SACCO, 2012).

¹ Refrigerador Vertical MBR-107D, Sanyo Electric Co., Ltd.

4.1.2 Colheita das amostras do grupo leishmaniose (G_L)

Para este grupo foram utilizados 10 caninos, adultos, de idade e sexo variável, sem raça definida, naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi*, nove deles sintomáticos e somente um assintomático, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba – SP.

A triagem dos animais (Figura 2A) foi realizada através de exames parasitológicos: punção aspirativa do linfonodo poplíteo e esfregaço de ponta de orelha, com presença de formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos (Figura 2B).

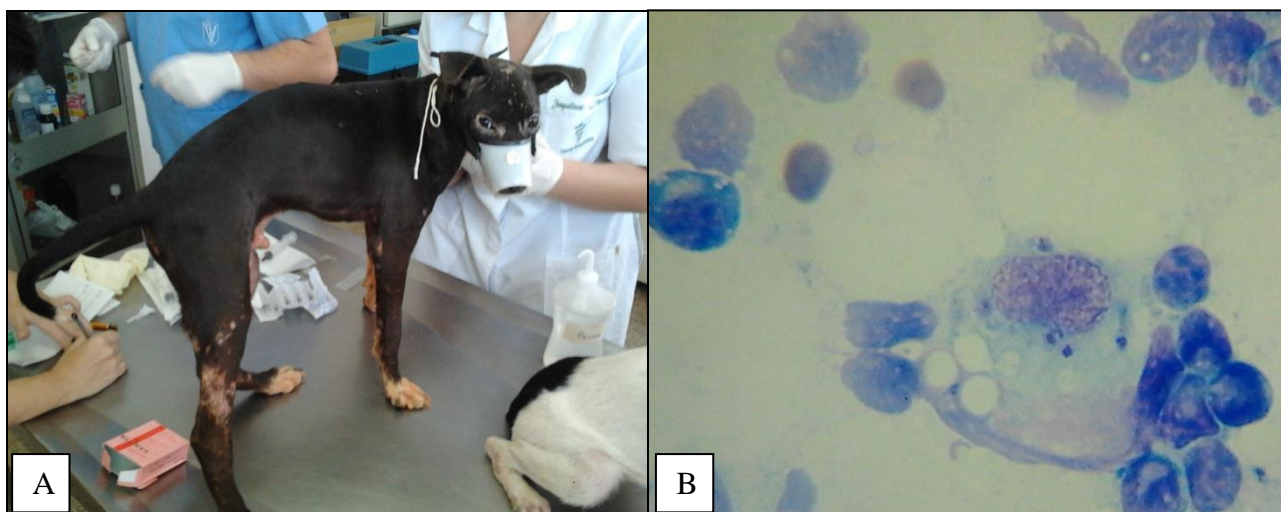


FIGURA 2 - A) Triagem de animais: cão com leishmaniose visceral evidenciando presença de sintomas da doença. B) Forma amastigota da *Leishmania* no interior de monócito. (Fonte: SACCO, 2012).

Além disto, para selecionar os cães, foi utilizado o teste rápido imunocromatográfico Kalazar Detect®², baseado na detecção de anticorpos contra o antígeno rK39 da *Leishmania* sp.

Os animais parasitologicamente positivos e sororeagentes, receberam uma pré-anestesia com acepromazina (0,055 mg/kg/IV), seguida, de uma indução e manutenção anestésica com pentobarbital sódico (15 mg/kg/IV); sendo, então, colhidos 450mL de sangue por punção da veia jugular. Com os cães ainda em plano anestésico, foi aplicada uma ampola de cloreto de potássio a 19,1%, por via intravenosa, em cumprimento ao Decreto no. 51.838

² Kalazar Detect®, InBios International, Inc. 562 1st Ave. South, Suite 600. Seattle, WA 98104 USA.

do Senado Federal, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução n°. 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Depois da colheita as amostras foram refrigeradas para transporte, sendo mantidas no refrigerador supracitado, à temperatura de 4°C, durante 21 dias.

4.1.3 Análises laboratoriais

Após homogeneização, 100 mL do sangue dos animais, de ambos os grupos, foram transferidos para uma das bolsas satélites (Figura 3), sendo estas numeradas de um a dez. O restante do sangue colhido do grupo controle foi utilizado pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP, Botucatu/SP.



FIGURA 3 - Preparação para o procedimento de transferência do sangue para a bolsa satélite (Fonte: SACCO, 2012).

Antes da colheita das bolsas foi colhido 3mL de sangue de cada cão (M0) e posteriormente a este procedimento, amostras de sangue das bolsas satélites foram colhidas após homogeneização em oito momentos diferentes (Figura 4): no dia da colheita (M1), três dias após a colheita (M2), seis dias após a colheita (M3), nove dias após a colheita (M4), 12 dias após a colheita

(M5), 15 dias após a colheita (M6), 18 dias após a colheita (M7) e 21 dias após a colheita (M8), para a realização do hemograma e do teste de fragilidade osmótica utilizando-se as técnicas descritas por Jain (1986), além da determinação do pH³, realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) e da PCR em tempo real (qPCR).

As amostras de sangue também foram centrifugadas durante cinco minutos a 200 g. O plasma foi separado em tubos da marca Eppendorf^{®4}, e congelado a -20° C, para realização da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), de acordo com Camargo (1966) e determinação da concentração de sódio/potássio por meio de espectrofotometria de chama⁵ durante todos os momentos da primeira fase do experimento.



FIGURA 4 - Amostras aliquotadas (100mL) prontas para homogeneização e colheita. (Fonte: SACCO, 2012).

³ Peagâmetro pH-30 Check-Mite®,

⁴ Eppendorf®, Eppendorf do Brasil Ltda., Rua Ferreira de Araújo 221 conj.15, São Paulo, SP.

⁵ Fotômetro de chama FC 280 Celm (Cia Equipadora de Equipamentos Modernos – Barueri – SP)

4.1.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva, após teste de normalidade observou-se que os parâmetros a serem avaliados possuíam distribuição normal, com exceção das plaquetas, que precisou ser transformada para log.

Modelos de medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) foram usados para comparar as médias de cada variável resposta entre os grupos de estudo e momentos de análise. Uma estrutura de covariância de simetria composta foi usada para modelar a correlação entre medidas repetidas dentro do mesmo animal. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores-P resultantes de comparações múltiplas.

Para o teste de fragilidade osmótica foi calculada a hemólise 50% (H_{50}) através da análise de probit e utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney para comparação entre os grupos.

Os resultados foram discutidos ao nível de 5% de significância, segundo Sampaio (1998).

4.2 Avaliação da eficácia da riboflavina sob ação da luz ultravioleta na inativação de *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado para transfusão: segunda etapa

4.2.1 Preparação da riboflavina

Um reagente contendo riboflavina (RB) em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (500 μ M) com pH ajustado para 4,0 a 5,0, foi preparado e autoclavado em frasco âmbar, conforme descrito por Ruane et al. (2004) e Cardo et al. (2007).

4.2.2 Determinação da metodologia

Para determinação da metodologia a ser adotada na pesquisa, foi realizado um piloto no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRB), Universidade de São Paulo

(USP). Campus de Ribeirão Preto, SP, sob orientação do Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco.

Para avaliar a absorvância e a fluorescência da riboflavina (RB) foram testadas amostras de 50 μ M de RB em solução PBS 1:1 em vários comprimentos de ondas sendo os resultados mostrados nas Figuras 5 e 6.

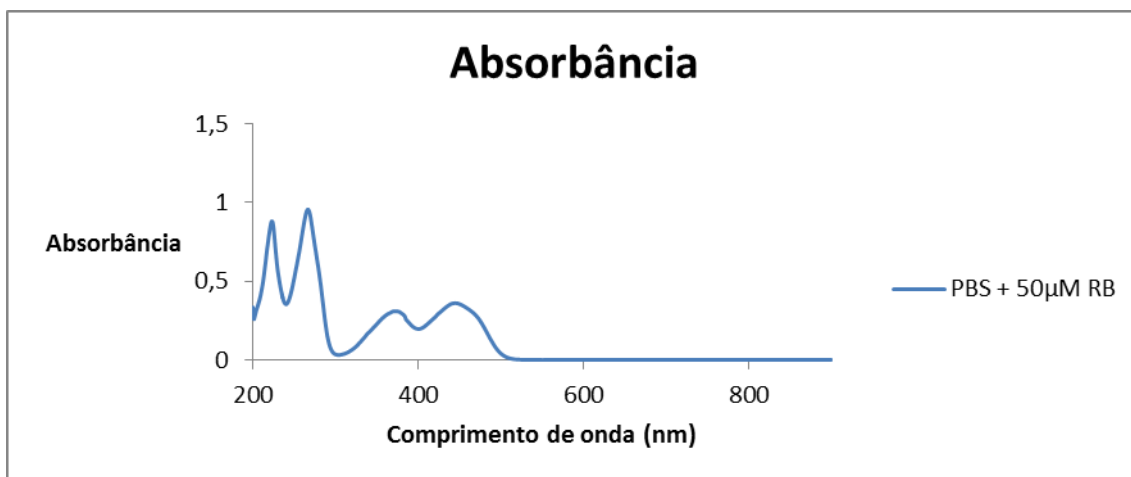


FIGURA 5 - Espectro de absorvância da riboflavina 50 μ M em solução PBS.

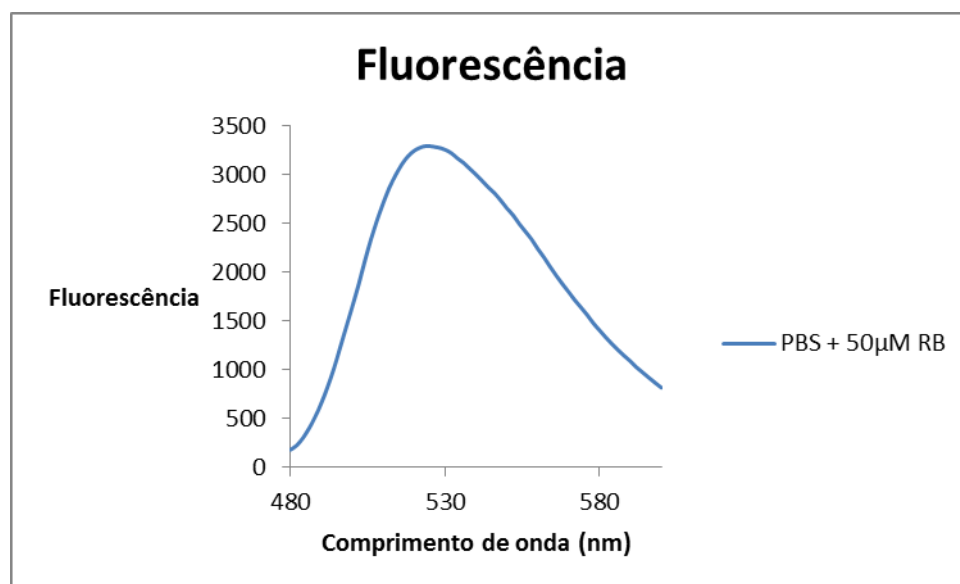


FIGURA 6 - Espectro de fluorescência da riboflavina 50 μ M em solução PBS.

Após a análise dos gráficos, verificou-se que a melhor ação da riboflavina ocorreu em um comprimento de onda entre 265 e 370 nm, região em que a RB absorve melhor a luz, sendo este correspondente a luz UV

Foi realizado teste no iluminador DNA Workstation⁶, para medir a distância em que a bolsa de sangue deveria ficar da luz do aparelho. Para isto foi utilizado um *Power Meter*⁷, para medir o quanto de energia estava atingindo a bolsa em várias distâncias, até atingir a ideal para que fosse fornecido 6.2 J por mL de luz UV (Figura 7).

Levando-se em consideração a distância (17 cm da fonte de luz), a largura (12 cm), a área da bolsa a ser iluminada (204 cm²) e a dose a ser fornecida ($1,40 \times 10^{-1}$); o tempo calculado foi de aproximadamente 35 minutos, conforme ilustra a Tabela 4.

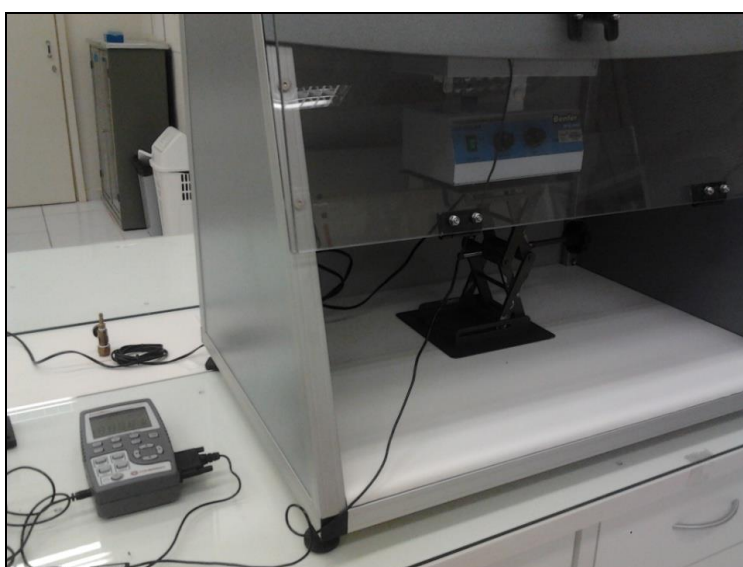


FIGURA 7 - Teste para medir a distância e o tempo de exposição à luz UV para que fosse fornecido 6,2J/mL. (Fonte: SACCO, 2012).

TABELA 4 – Dados utilizados para o cálculo da dose de luz UV em função da distância, área e tempo de iluminação das bolsas de sangue.

Medidas	Geral
Comprimento (cm)	17
Largura (cm)	12
Área (cm ²)	204
Dose (J/cm ²)	$1,40 \times 10^{-1}$
Potencias W	$1,40 \times 10^{-2}$
Intensidade (P/A) W/cm ²	$6,86275 \times 10^{-5}$
Tempo (s) D/I	2040,00
Tempo (min)	34,00

⁶ Loccus Biotechnology – Loccus, São Paulo – SP.

⁷ Optical Associated Incorporated - OAI, Milpitas, CA.

Para avaliar a transmitância das bolsas a serem utilizadas durante a fotoinativação foram usadas duas marcas distintas (JP⁸ e Fresenius Kabi⁹ – FK) de bolsa tripla para transfusão, sendo medidas as transmitâncias da bolsa principal (hemácias) e das satélites (bolsas para plasma e plaquetas) (Figura 8).

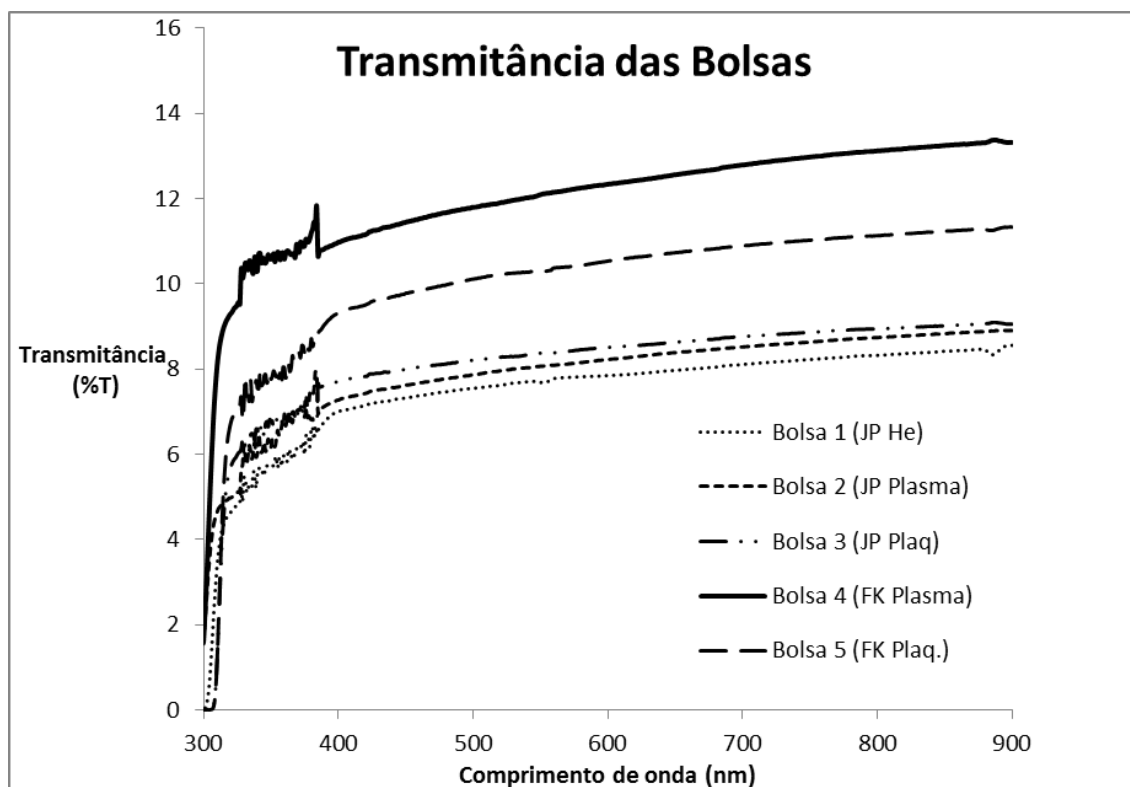


FIGURA 8 - Espectro de transmitância das diferentes bolsas testadas das marcas avaliadas JP e FK, sendo He: hemácias, Pla.: plaquetas e Plasma: a bolsa satélite de plasma.

Conforme análise do gráfico, o material que permitiu maior passagem da luz foi a bolsa quatro (bolsa de plasma da marca Fresenius Kabi®), sendo esta a selecionada para o procedimento de fotoinativação no presente trabalho.

4.2.3 Seleção e análise da amostra por PCR convencional

Para detectar as bolsas de sangue positivas a serem utilizadas no experimento, foi realizado PCR convencional das bolsas colhidas dos animais do grupo leishmaniose.

⁸ JP Indústria Farmacêutica S.A. Av. Presidente Castelo Branco, 999. Ribeirão Preto - SP Brasil.

⁹ Fresenius Kabi Brasil Ltda. Av. Marginal Projetada, 1652. Fazenda Tamboré Barueri – SP.

O DNA foi extraído de 200 µL do sangue coletado das bolsas, utilizando-se o Illustra™ Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®), conforme instruções do fabricante, sendo posteriormente armazenado em microtubos estéreis livres de DNases e RNases e mantido a -20°C até a realização da técnica de PCR.

As reações de PCR foram realizadas em microtubo de 0,5mL com volumes totais de 25 µL contendo tampão de reação 10mM Tris HCl pH 8.0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 10µM de cada *primer*, 0,2 unidades de *Taq* Platinum (Invitrogen) e 10ng de DNA genômico. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®) com o seguinte perfil de ciclagem: desnaturação de 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos e uma extensão final de 70°C durante 10 minutos. Para amplificação foram utilizados os *primers*:

LC14 250-273 (5'- CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG-3')

LC15 416-439 (5'-TGTTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA-3')

Estes *primers* foram desenhados e testados no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), por meio de análise nos programas Primer3 e PrimerBLAST, direcionados para o gene "*Leishmania infantum chagasi* kinetoplast minicircle DNA", AF169138.1 disponível [GenBank]. Nessa reação, o produto resultante apresentou 190 pares de base (pb), que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *L. infantum chagasi*.

Os produtos amplificados foram identificados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sendo utilizados como controles positivos DNAs da cepa ATTC amplificada de *L. infantum chagasi*, e como negativos uma solução contendo água MilliQ e MIX-PCR. A visualização das bandas no gel e a fotodocumentação foram realizadas em transiluminação com luz ultravioleta (296 nm).

Após a análise dos resultados foi selecionada a bolsa de sangue número três, onde foi amplificado o DNA do parasita por PCR convencional durante todo o período de conservação, com o objetivo de utilizar a bolsa do animal com a maior carga parasitária (43,04 parasitas/µL) para a inoculação em

hamsters, sendo as bolsas de número 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9 e 10 negativas na PCR convencional. O animal doador da bolsa apresentava-se sintomático no momento da colheita, com áreas de alopecia ao redor dos olhos, onicogrifose e caquexia.

Após 21 dias de refrigeração (M8), foram retirados 20 mL de sangue de maneira estéril, da bolsa de plasma contendo 100 mL, e adicionado 20 mL da solução de riboflavina supracitada, para que a concentração final de riboflavina na bolsa fosse de 50 μ M.

Posteriormente, a bolsa foi colocada no iluminador DNA Workstation Loccus Biotecnology – Loccus, São Paulo – SP, sendo fornecidos 6,2 J/mL de acordo com Rentas (2007) a um comprimento de onda de 365 nm de luz UV por 30 (tratamento 1 – TT1) e 45 minutos (tratamento 2 – TT2).

Durante o procedimento a bolsa esteve sobre um homogeneizador de bolsa de sangue tipo gangorra modelo HOMBOL-061, Benfer¹⁰ (Figura 9).

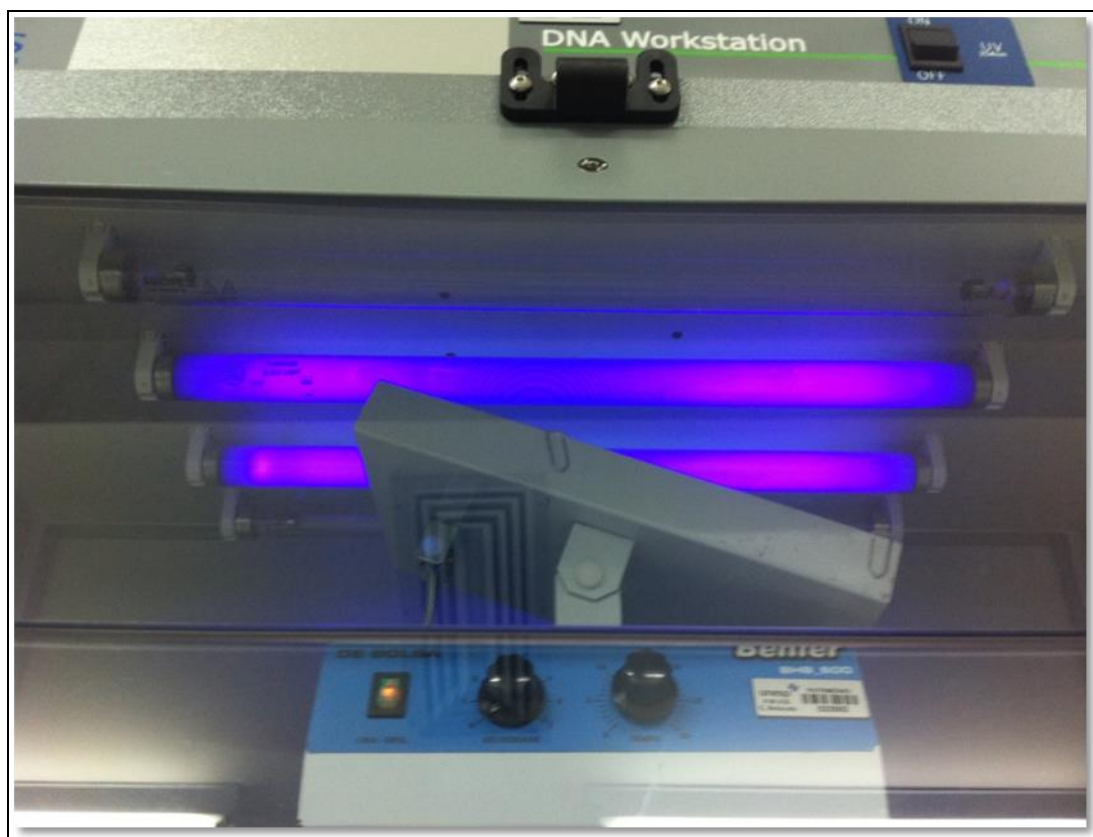


FIGURA 9 - Iluminador de luz UV em 365 nm, tendo abaixo o homogeneizador com a bolsa em seu interior, durante o procedimento de

¹⁰ Benfer Produtos para laboratórios. R. Padre Agostinho Poncet, 74. São Paulo – SP.

fotoinativação nos períodos estipulados (30 e 45 minutos). (Fonte: SACCO, 2012).

Após a adição da riboflavina (RB) e após os tratamentos pela luz UV por 30 minutos (TT1) e 45 minutos (TT2) as amostras mantiveram-se positivas na PCR (Figura 10), sendo portanto necessária à inoculação em hamster.

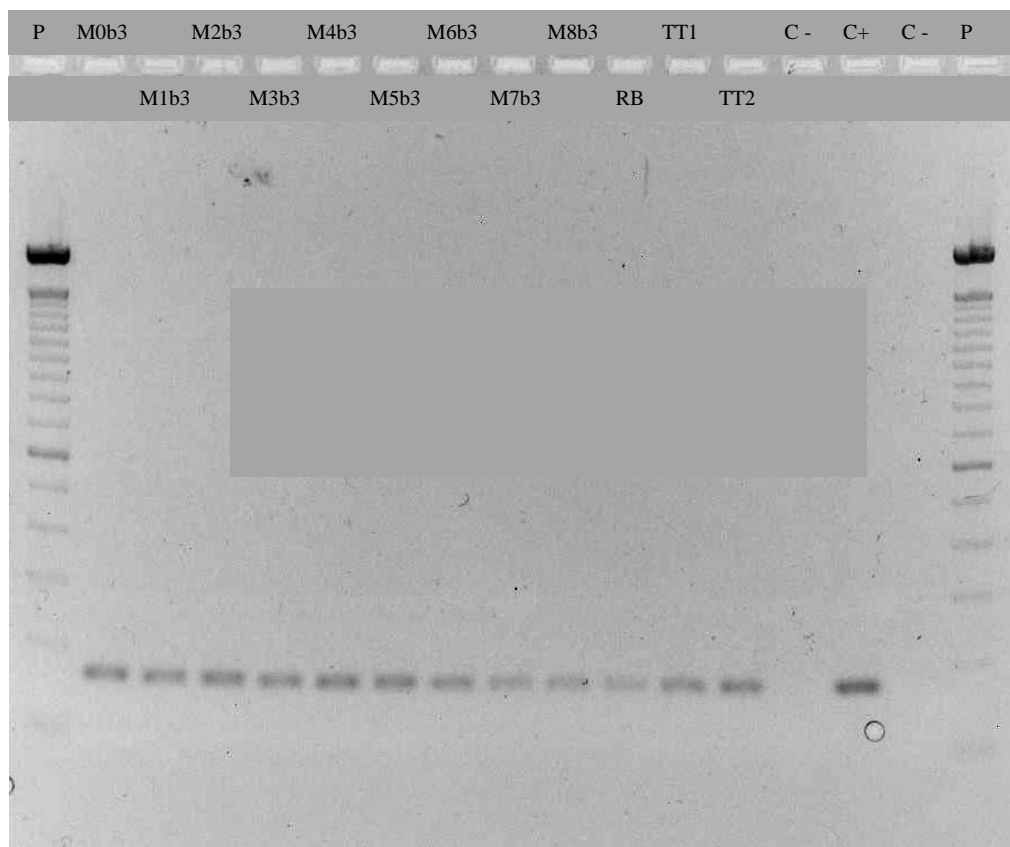


FIGURA 10 - Resultados da PCR em gel de agarose 1,5% da bolsa do animal 3 do grupo leishmaniose, positivo em todos os momentos (M0_{b3}, M1_{b3}, M2_{b3}, M3_{b3}, M4_{b3}, M5_{b3}, M6_{b3}, M7_{b3}, M8_{b3}), inclusive após a adição de riboflavina (RB) e do tratamento com luz durante ambos os tempos de exposição (TT1 e TT2). Controles positivo (C+) e negativo (C-) e padrão (P). (Fonte: SACCO, 2012).

4.2.4 Inoculação em hamster

Foram utilizados 28 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos, adultos, que receberam por via intraperitoneal 3,5 mL do sangue (FREITAS et al., 2005) obtido de cão com leishmaniose (Figura 11); sendo sete animais inoculados com o sangue sem tratamento (grupo leishmaniose: G_L); sete com sangue após a adição de riboflavina (grupo riboflavina: G_{RB}); sete com sangue após

tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta por 30 minutos (grupo tratado I: G_{T30}) e sete com sangue após tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta por 45 minutos (grupo tratado II: G_{T45}).

Os animais foram mantidos durante 120 dias em caixas para hamsters¹¹ no Infectório da área de Zoonoses da FMVZ, UNESP, Botucatu-SP, recebendo água e ração Presence® linha roedores¹² *ad libitum*.



FIGURA 11 - Inoculação em hamster. (Fonte: SACCO, 2012).

Os hamsters inoculados foram acompanhados clinicamente e sacrificados decorridos 120 dias, utilizando protocolo de Hochman et al. (2003).

4.2.4.1 Análises laboratoriais

O sangue dos hamsters foi colhido por punção intracardíaca para realização dos exames sorológicos e moleculares (Figura 12). Baço, fígado e medula óssea foram extraídos após a necropsia, para confecção de lâminas pelo método de aposição de tecido “imprinting”, e subsequente coloração pela técnica de Giemsa para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp, sendo consideradas positivas caso apresentassem pelo menos uma forma

¹¹ Caixa de polipropileno. Elo's Com. e Repres. de Aparelhos para Laboratórios de Biotérios Ltda.

¹² Presence Nutrição Animal. Av. Professor Benedito Montenegro S/Nº. Paulínia - São Paulo Bairro Betel. 13140-000.

amastigota fagocitada ou livre, ou negativa caso a forma amastigota não fosse observada.

Em seguida os órgãos (baço, fígado e osso) foram macerados, sendo a medula óssea obtida após a maceração do osso esterno, e foi realizada extração do DNA para realização da PCR no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO).



FIGURA 12 - Punção intracardíaca para colheita de sangue em hamster. (Fonte: SACCO, 2012).

4.2.4.1.1 PCR convencional e PCR em tempo real

O DNA foi extraído de 200 μ L do sangue coletado, utilizando-se o Illustra™ Blood Genomic Prep Mini Spin Kit¹³, e de amostras de tecido dos hamsters (baço e fígado) utilizando-se Illustra™ Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit¹¹. As amostras de osso foram extraídas utilizando-se o kit Multi-Source Axygen¹⁴ com prévia etapa de maceração em nitrogênio líquido. O material genético extraído foi armazenado sob congelamento a -20°C , até o momento da realização das provas biomoleculares. Controles positivo (DNAs

¹³ GE Healthcare Life Sciences. EUA.

¹⁴ Axygen, EUA

da cepa ATTC amplificada de *L. infantum chagasi*) e negativos (água MilliQ) foram adicionados a cada bateria de extração.

Os primers LC14 e LC15 utilizados foram desenhados e testados no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), por meio de análise nos programas Primer3 e PrimerBLAST, direcionados para amplificar um fragmento de 190 pares de base (pb) do segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *Leishmania infantum chagasi*, AF169138.1 - disponível [GenBank].

O DNA extraído das amostras de hamsters foi amplificado por meio de PCR em Tempo Real para a determinação da carga parasitária, por meio do sistema SYBR®Green, em termociclador StepOne™ Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para a realização da curva-padrão foram utilizadas amostras de DNA de ATTC nas concentrações decrescentes de 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰ parasitas/μL, todas analisadas em triplicata. Os dados foram coletados e analisados com o Step One™ Software v2.1¹⁵. Para todas as análises considerou-se slope (-3,380 a -3,300), R² (0,982 a 0,999) e eficiência (98 a 104%) em intervalos aceitáveis para acurada análise dos resultados.

4.2.4.1.2 Métodos sorológicos

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (1966). Foram utilizadas microplacas para a diluição dos soros, pipetando-se 190 μL de PBS 0,01M, pH 7,2 e 10 μL do soro a ser testado no primeiro orifício, homogeneizando-se, perfazendo a diluição 1:20. Foram distribuídos 100 μL de PBS 0,01M, pH 7,2 em outras cinco cavidades e a partir da primeira diluição, transferindo-se 100 μL para o orifício seguinte, homogeneizando-se, repetindo até a quinta cavidade, desprezando-se os últimos. Com isso, as amostras foram diluídas a 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Da mesma maneira, foram diluídas amostras de soros controles positivo e negativo.

Em lâminas fixadas com o antígeno de *L. major*, foram distribuídos 10 μL de cada diluição nos orifícios, incubando-se a 37^o C por 30 minutos em câmara

¹⁵ Life Technologies, EUA.

úmida. A seguir, foram lavadas com PBS 7,2 por 10 minutos, por duas vezes consecutivas e, a seguir, secas em estufa.

O conjugado espécie-específico foi diluído, segundo seu título pré-estabelecido, em solução de Azul de Evans a qual foi previamente diluída em PBS 0,01M, pH 7,2 na proporção de 1:5. Foram distribuídos 10 μ L de conjugado para cada diluição, incubando-se novamente a 37° C por 30 minutos em câmara úmida.

Realizou-se uma nova lavagem com PBS 0,01M, pH 7,2 por 10 minutos, duas vezes consecutivas, secando-se em estufa. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínula 24x60mm, examinando-se em microscópio de imunofluorescência, no aumento 40 vezes. Após a leitura dos controles, foi procedido o exame das amostras em teste, considerando-se como título final a maior diluição do soro em que ainda ocorresse fluorescência completa na borda de pelo menos 50% das promastigotas.

4.3 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise descritiva e a comparação entre os grupos leishmaniose (G_L), riboflavina (G_{RB}), tratado I (G_{T30}) e tratado II (G_{T45}) foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação de médias. Os valores da carga parasitária foram transformados em logaritmos, com o objetivo de atingir tanto a homogeneidade de variâncias, como a normalidade de distribuição. Para as características qualitativas foi utilizado o teste de qui-quadrado. Os resultados foram discutidos ao nível de 5% de significância, segundo Sampaio (1998).

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Conservação do sangue em bolsas para transfusão: primeira etapa

5.1.1 Análises hematológicas das bolsas de sangue

Os valores do eritrograma dos caninos doadores das bolsas de sangue (M₀) do grupo controle (G_C) encontram-se de acordo com os preconizados por Jain (1986), que considerou normal para cães a contagem de hemácias de 5,5 a 8,5 x 10⁶/μL, a concentração de hemoglobina de 12 a 18 g/dL, hematócrito de 37 a 55%, volume corpuscular médio (VCM) de 60 a 77fL e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de 32 a 36%.

No grupo controle observou-se uma redução significativa (p<0,05) nos valores médios do número total de hemácias durante o período de acondicionamento das bolsas. No primeiro dia (M₀) de análise foi encontrado um valor médio de eritrócitos de 6,79±0,52 x 10⁶/μL, que foi reduzido para 5,36±0,33 x 10⁶/μL após 21 dias de conservação (Tabela 5). Esta diminuição do número de hemácias no decorrer do período de conservação ocorreu provavelmente devido à hemólise e as alterações morfológicas das células que provavelmente provocadas pelas “lesões de estocagem”. Estes resultados encontram-se de acordo com as alterações encontradas por Danon et al. (1964), Lopes et al. (1995), Kameneva et al. (1998) e Cicco e Cicco (2007).

Para Zimrin e Hess (2009) a coleta de sangue, o processamento e as condições de armazenamento podem influenciar de forma significativa a qualidade dos componentes sanguíneos. Sendo que a perda da membrana provocada pela formação de microvesículas é um dos fatores que mais contribuem para as lesões que ocorrem nas hemácias (GREENWALT, 2006).

No grupo parasitado pela *L. infantum chagasi* houve uma redução do número de hemácias, as bolsas destes animais se encontravam anêmicas ao início do experimento com valor médio de eritrócitos de 2,90 x10⁶/μL, porém sem diminuição significativa dos eritrócitos ao longo do período de armazenamento (p>0,05) (Tabela 5). Quando comparamos ambos os grupos, houve menor contagem de hemácias no G_L (2,55±1,70 x10⁶/μL) do que no G_C

($5,24 \pm 0,63 \times 10^6$) em todos os momentos ($p < 0,05$) (Figura 13), sendo que os valores de M0 foram significativamente maiores que as demais em ambos os grupos.

As médias de hemoglobina ($6,05 \pm 3,73 \text{g/dL}$) e hematócrito ($15 \pm 10\%$) também foram menores em G_L do que em G_C ($12,4 \pm 1,25 \text{g/dL}$ e $37 \pm 3,64\%$) ($p < 0,05$) (Tabela 5 e Figura 13).

Os cães com leishmaniose visceral apresentaram desde o momento M0 anemia, sendo na maioria das vezes macrocítica normocrômica. A patogênese da anemia na LV não está totalmente elucidada, acredita-se que mais de um fator esteja envolvido como: sequestro esplênico de hemácias, diminuição da produção medular, falência renal crônica, perda sanguínea, hemólise e mecanismos imunomediados (KONTOS e KOUTINAS, 1993; SLAPPENDEL e FERRER, 1998; KOUTINAS et al., 1999; CIARAMELLA e CORONA, 2003; IKEDA et al., 2003). De acordo com Michalick e Genaro (2005), na leishmaniose visceral a medula óssea é em geral encontrada com hiperplasia e densamente parasitada. A eritropoese e granulopoeese são normais no início do processo infeccioso e durante as fases mais adiantadas da infecção, ocorre desregulação da hematopoeese, caracterizada pela diminuição da produção celular. Segundo Vilela (1999) a presença de uma diminuição da sobrevivência eritrocitária na fase aguda da LV tem sido consistentemente confirmada, bem como a presença de positividade para o teste de Coombs direto.

TABELA 5 – Estatística descritiva para número de hemácias, determinação da hemoglobina e do hematócrito em bolsas de sangue conservadas por 21 dias, provenientes de cães hígidos (grupo controle - G_C) e de cães com leishmaniose visceral (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

Grupo e Momento	Hemácias (x10 ⁶ /μL)			Hemoglobina (g/dL)			Hematócrito (%)			
	Média	Media na	DP	Média	Media na	DP	Média	Media na	DP	
G _C	M0	6,79 ^{aA}	6,73	0,52	16,75 ^{aA}	16,90	1,19	50,14 ^{aA}	50,00	4,81
	M1	5,24 ^{bA}	5,24	0,63	12,40 ^{bA}	12,50	1,25	36,57 ^{bA}	37,00	3,64
	M2	5,17 ^{bA}	5,41	0,74	12,35 ^{bA}	12,60	1,75	35,14 ^{bA}	37,00	4,77
	M3	5,03 ^{bA}	5,02	0,59	12,55 ^{bA}	12,60	1,67	34,85 ^{bA}	35,00	4,05
	M4	5,19 ^{bA}	5,43	0,88	12,44 ^{bA}	12,80	1,62	35,42 ^{bA}	37,00	4,19
	M5	5,23 ^{bA}	5,30	0,43	12,24 ^{bA}	12,40	1,69	35,28 ^{bA}	37,00	3,81
	M6	5,10 ^{bA}	5,34	0,69	12,18 ^{bA}	12,30	1,89	33,14 ^{bA}	34,00	5,17
	M7	5,27 ^{bA}	5,25	0,41	12,52 ^{bA}	12,80	1,81	34,00 ^{bA}	35,00	3,78
	M8	5,36 ^{bA}	5,41	0,33	12,70 ^{bA}	13,00	1,75	34,57 ^{bA}	35,00	3,10
G _L	M0	2,90 ^B	3,35	1,28	6,47 ^B	6,20	2,79	21,57 ^B	20,00	9,71
	M1	2,55 ^B	2,29	1,70	6,05 ^B	5,10	3,73	16,85 ^B	15,00	10,0
	M2	2,18 ^B	2,12	1,49	5,38 ^B	4,60	3,37	17,00 ^B	15,00	9,86
	M3	2,43 ^B	2,39	1,19	5,84 ^B	5,10	2,51	15,71 ^B	18,00	6,94
	M4	1,92 ^B	1,84	1,02	4,71 ^B	4,50	2,16	14,28 ^B	13,00	8,47
	M5	2,34 ^B	1,95	1,94	6,01 ^B	4,70	4,53	17,85 ^B	11,00	13,6
	M6	2,02 ^B	2,37	1,09	5,05 ^B	5,40	2,30	14,85 ^B	14,00	6,56
	M7	2,40 ^B	2,06	1,50	5,71 ^B	4,40	2,99	17,14 ^B	14,00	8,29
	M8	2,53 ^B	2,28	1,54	5,75 ^B	4,60	2,95	17,00 ^B	14,00	8,50

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente (p<0,05) pelo Teste de Tukey. (letras minúsculas dentro do mesmo grupo e maiúsculas entre os grupos).

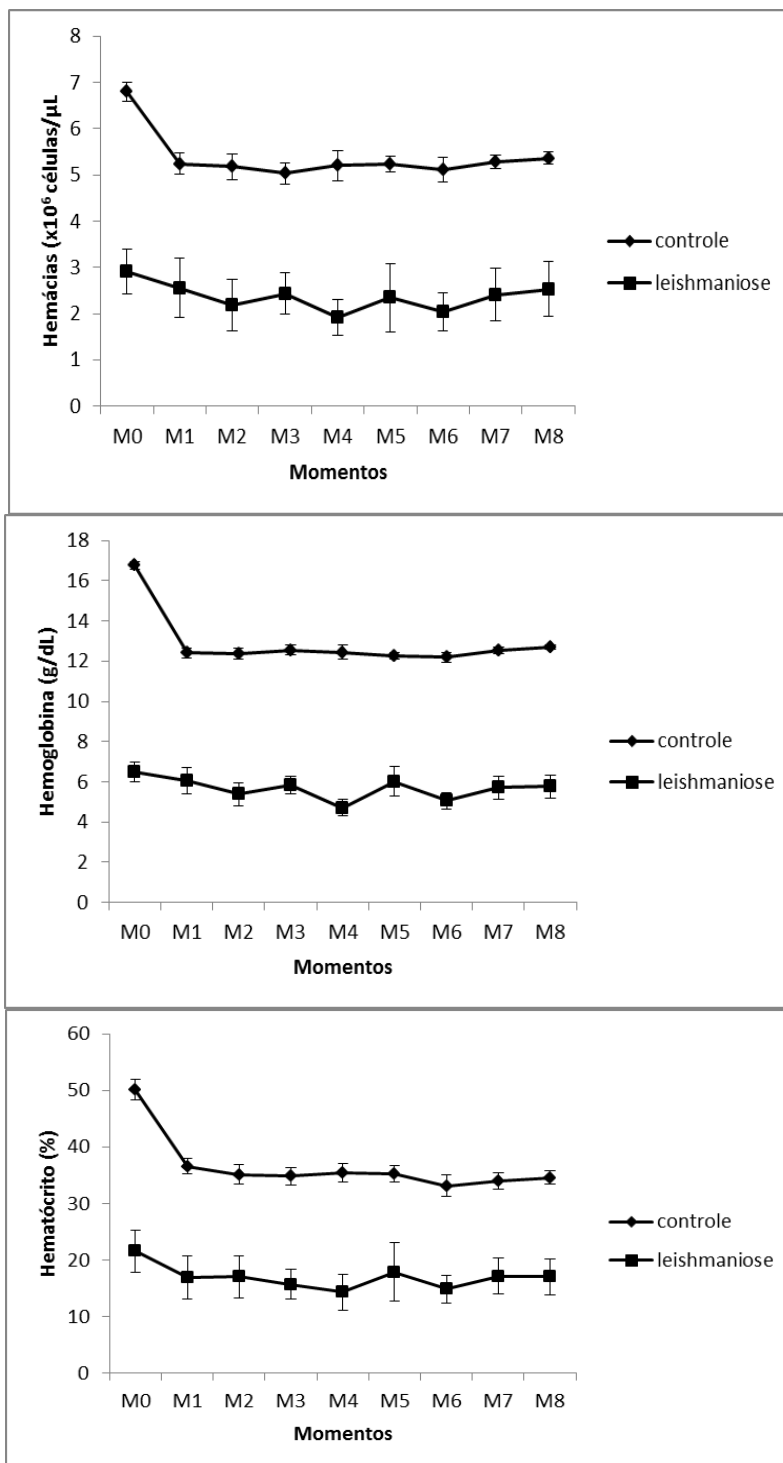


FIGURA 13 - Média e erro padrão do número de hemácias, determinação da hemoglobina e do hematócrito dos cães do grupo controle (G_C) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

Com relação aos índices hematimétricos, VCM e CHCM não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$), sendo que no G_C permaneceram dentro dos valores de referência preconizados por Jain (1986) durante todos os momentos avaliados e o G_L demonstrou VCM maior na maioria dos momentos, indicando anemia macrocítica normocrômica. O RDW foi maior ($p < 0,05$) no G_L ($19,11 \pm 3,69\%$) do que no G_C ($14,26 \pm 0,76\%$), dentro do grupo leishmaniose esta diferença foi significativa entre M0 e os momentos M6, M7 e M8 ($p < 0,05$) (Tabela 6 e Figura 14).

Estes aumentos do VCM e do RDW indicam que as hemácias eram maiores (hemácias jovens), o que está associado à anemia regenerativa. Temizel et al. (2011) relataram aumento do VCM e do RDW em cães com leishmaniose visceral devido a anisocitose, associada à anemia regenerativa. O G_L por ser composto por animais com anemia, apresentou resposta de medula óssea com macrocitose. Segundo Kontos e Koutinas (1993), Koutinas et al. (1999), Ciaramella e Corona (2003) e Ikeda et al. (2003) a ocorrência de alterações hematológicas em cães com leishmaniose visceral é muito frequente, sendo observada na série vermelha, anemia geralmente normocítica e normocrômica arregenerativa em 57 a 94,2% dos animais.

TABELA 6 - Índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) dos cães do grupo controle (G_C) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

Grupos e Momentos	VCM (fL)			CHCM (%)			RDW (%)			
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
G_C	M0	73,29	74,00	3,68	33,29	33,00	1,11	14,31 ^A	14,20	0,35
	M1	69,57	69,00	2,37	33,57	34,00	1,27	14,26 ^A	14,50	0,76
	M2	68,08	68,39	3,00	35,17	35,68	1,24	14,26 ^A	14,50	0,72
	M3	69,34	69,53	3,55	35,97	36,00	1,22	14,21 ^A	14,40	0,74
	M4	68,96	68,26	5,81	35,11	34,59	1,42	14,84 ^A	15,10	0,51
	M5	67,30	68,14	2,65	34,60	34,12	1,41	14,97 ^A	15,20	0,63
	M6	64,74	65,93	3,44	36,88	37,65	2,35	14,93 ^A	14,90	0,72
	M7	64,32	66,09	4,15	36,75	37,65	2,08	14,83 ^A	15,10	0,88
	M8	64,45	64,29	3,75	36,65	37,95	3,07	15,14 ^A	15,70	1,25
G_L	M0	75,97	75,29	12,12	30,53	30,94	4,76	18,47 ^{aB}	16,50	4,18
	M1	70,76	63,87	13,91	35,99	35,43	4,55	19,11 ^{abB}	17,30	3,69
	M2	85,32	75,63	17,15	31,12	30,67	1,56	19,36 ^{abB}	17,00	4,02
	M3	65,92	64,52	6,72	36,32	36,83	5,37	18,91 ^{abB}	17,10	2,99
	M4	73,50	73,26	16,25	36,46	40,77	8,00	19,37 ^{abB}	17,40	3,54
	M5	88,64	77,87	37,93	34,67	33,86	6,76	19,87 ^{abB}	18,00	3,73
	M6	83,04	75,53	25,35	34,10	34,29	5,11	20,03 ^{bB}	18,10	3,53
	M7	80,70	73,03	23,36	32,50	33,08	4,56	19,53 ^{bB}	18,30	3,61
	M8	75,14	67,89	21,02	33,59	33,08	3,82	19,53 ^{bB}	18,30	3,61

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. (letras minúsculas dentro do mesmo grupo e maiúsculas entre os grupos).

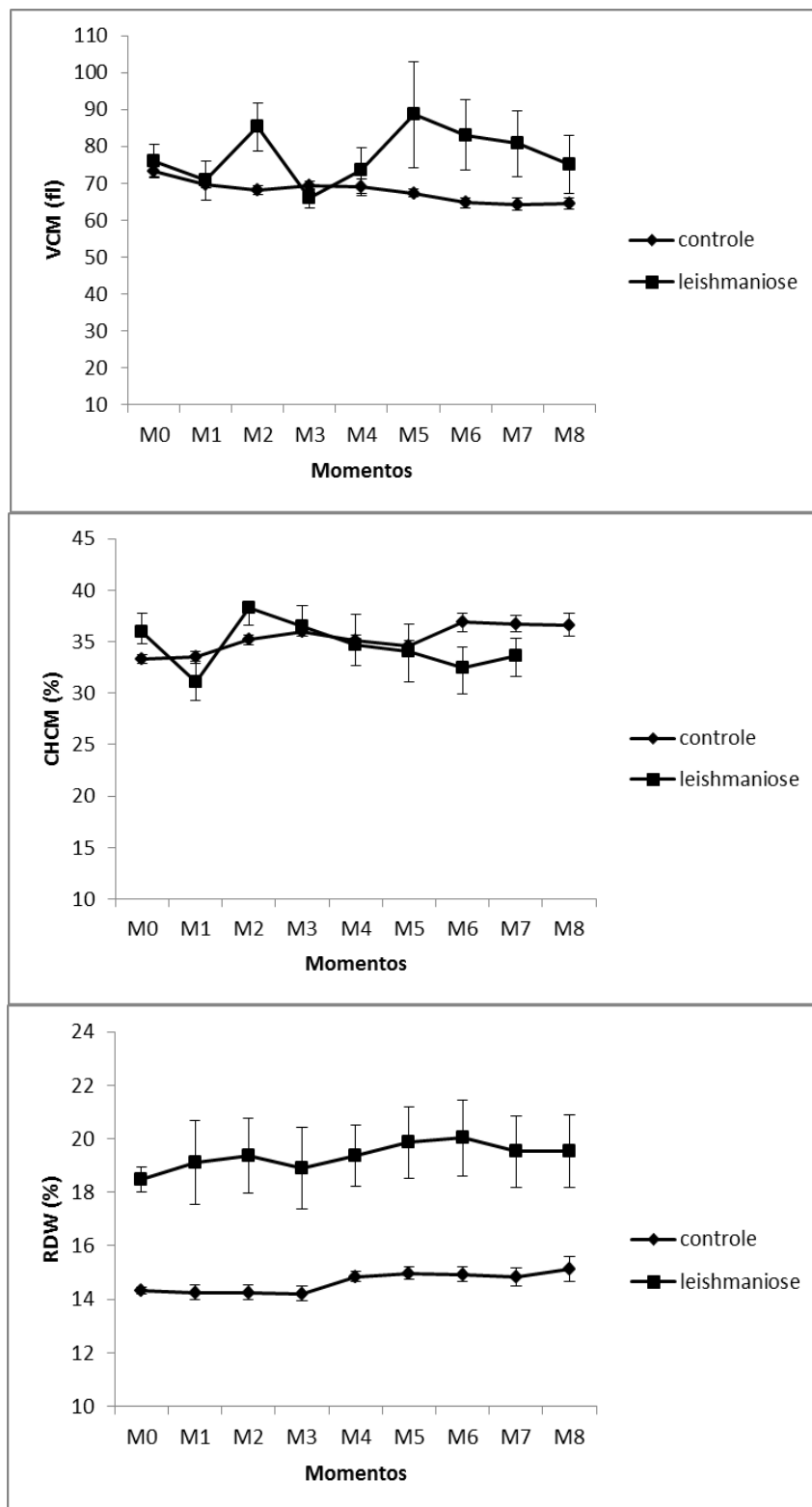


FIGURA 14 - Média e erro padrão do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) dos cães do grupo controle (G_C) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

A contagem de leucócitos não diferiu entre os grupos, porém houve diminuição significativa de leucócitos ($p < 0,05$) a partir de M6 (15 dias de refrigeração), em ambos os grupos, de $6.629 \pm 2.622/\mu\text{L}$ para 5.414 ± 3.876 após a colheita no G_L , e de $9.971 \pm 2.938/\mu\text{L}$ para $5.943 \pm 1.624/\mu\text{L}$ no G_C (Tabela 7 e Figura 15).

Esses dados corroboram com as pesquisas realizadas por Ribeiro Filho et al. (1994) e Lopes et al. (1995), em que o sangue conservado em bolsas para transfusão apresenta uma redução do número de leucócitos no decorrer do tempo.

Com relação às alterações presentes na série leucocitária dos cães do G_L no M0 houve contagem total de leucócitos normais. Kontos e Koutinas (1993) também referem contagem de leucócitos totais normais em cães com LV, porém Anosa e Idowu (1983) descrevem a presença de leucocitose associada com neutrofilia, enquanto Abranches et al. (1991) relatam a ocorrência de leucopenia.

Houve uma redução significativa ($p < 0,05$) nos valores médios do número de plaquetas nos dois grupos ao longo do tempo (Tabela 7). Quando comparamos ambos os grupos, houve menor contagem de plaquetas no G_L do que no G_C em todos os momentos ($p < 0,05$) (Figura 16).

Os cães com leishmaniose apresentaram trombocitopenia desde o momento M0. Alguns autores relatam que nos cães com leishmaniose a contagem plaquetária pode ser normal (MORENO et al., 1998) enquanto outros reportam a ocorrência de trombocitopenia (CIARAMELLA et al., 1997; SLAPPENDEL e FERRER, 1998; CIARAMELLA e CORONA, 2003). As possíveis causas da diminuição do número de plaquetas são a presença de autoanticorpos, imunocomplexos, sequestro esplênico e supressão da medula óssea (KONTOS e KOUTINAS, 1993; SLAPPENDEL e FERRER, 1998).

A proteína plasmática total (PPT) foi significativamente maior no G_L ($8,29 \pm 1,24 \text{ g/dL}$) do que no G_C ($6,17 \pm 0,64 \text{ g/dL}$) ($p < 0,05$) (Tabela 7 e Figura 16). Segundo Ferrer (1992), Ciaramella et al. (1997) e Koutinas et al. (1999) uma das anormalidades mais frequentes da leishmaniose visceral é a hiperglobulinemia, devido a uma ativação policlonal de linfócitos B e a produção de anticorpos que ocorre principalmente em cães sintomáticos, porque são os que desenvolvem imunidade humoral maior e pequena ou

nenhuma resposta celular. De acordo com Feldman et al. (2000) e Ikeda-Garcia et al. (2003) esta elevação da PPT se faz principalmente devido a hiperglobulinemia, geralmente associada à hipoalbuminemia.

TABELA 7 - Contagem de plaquetas, leucócitos totais e determinação da proteína total plasmática dos cães do grupo controle (G_C) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

Grupos e Momentos	Plaquetas (/μL)			Leucócitos (/μL)			Proteínas plasmáticas totais (g/dL)			
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
G _C	M0	339429 ^{aA}	332000	77884	9971 ^a	10500	2938	7,66 ^{aA}	7,80	0,57
	M1	132714 ^{bB}	113000	37990	7571 ^a	7300	2466	6,17 ^{bA}	5,80	0,64
	M2	121143 ^{bB}	118000	45594	7314 ^a	6900	2378	5,74 ^{bA}	5,80	0,71
	M3	110714 ^{bB}	114000	36696	7457 ^a	8000	2170	5,71 ^{bA}	5,60	0,77
	M4	108786 ^{bB}	112000	36665	7329 ^a	8000	2150	5,69 ^{bA}	5,60	0,82
	M5	106571 ^{bB}	93000	41400	6786 ^a	6600	2269	5,61 ^{bA}	5,40	0,84
	M6	106000 ^{bB}	95000	43274	6257 ^b	6800	1780	5,74 ^{bA}	5,80	0,73
	M7	131000 ^{bB}	94000	65038	5800 ^b	5400	1721	5,74 ^{bA}	5,80	0,73
M8	134429 ^{bB}	102000	75791	5943 ^b	6100	1624	5,94 ^{bA}	6,00	0,71	
G _L	M0	70857 ^{aB}	65000	27811	6629	6900	2622	9,83 ^{aB}	9,70	1,42
	M1	75429 ^{aB}	42000	58682	4243	4100	1190	8,29 ^{bB}	7,80	1,24
	M2	74429 ^{aB}	33000	73057	7000	5600	4696	8,26 ^{bB}	7,80	1,34
	M3	74571 ^{aB}	33000	80775	6914	5000	3806	8,29 ^{bB}	7,80	1,33
	M4	88286 ^{aB}	42000	96557	6314	5200	4470	8,39 ^{bB}	8,00	1,38
	M5	96143 ^{aB}	53000	91226	7771	6800	5997	8,40 ^{bB}	8,20	1,38
	M6	87857 ^{aB}	49000	101518	6543	5000	4711	8,51 ^{bB}	7,80	1,29
	M7	95571 ^{aB}	60000	104739	5414	3900	3876	8,33 ^{bB}	7,90	1,39
M8	97571 ^{aB}	67000	106767	5414	3900	3876	8,24 ^{bB}	7,90	1,52	

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente (p<0,05) pelo Teste de Tukey. (letras minúsculas dentro do mesmo grupo e maiúsculas entre os grupos).

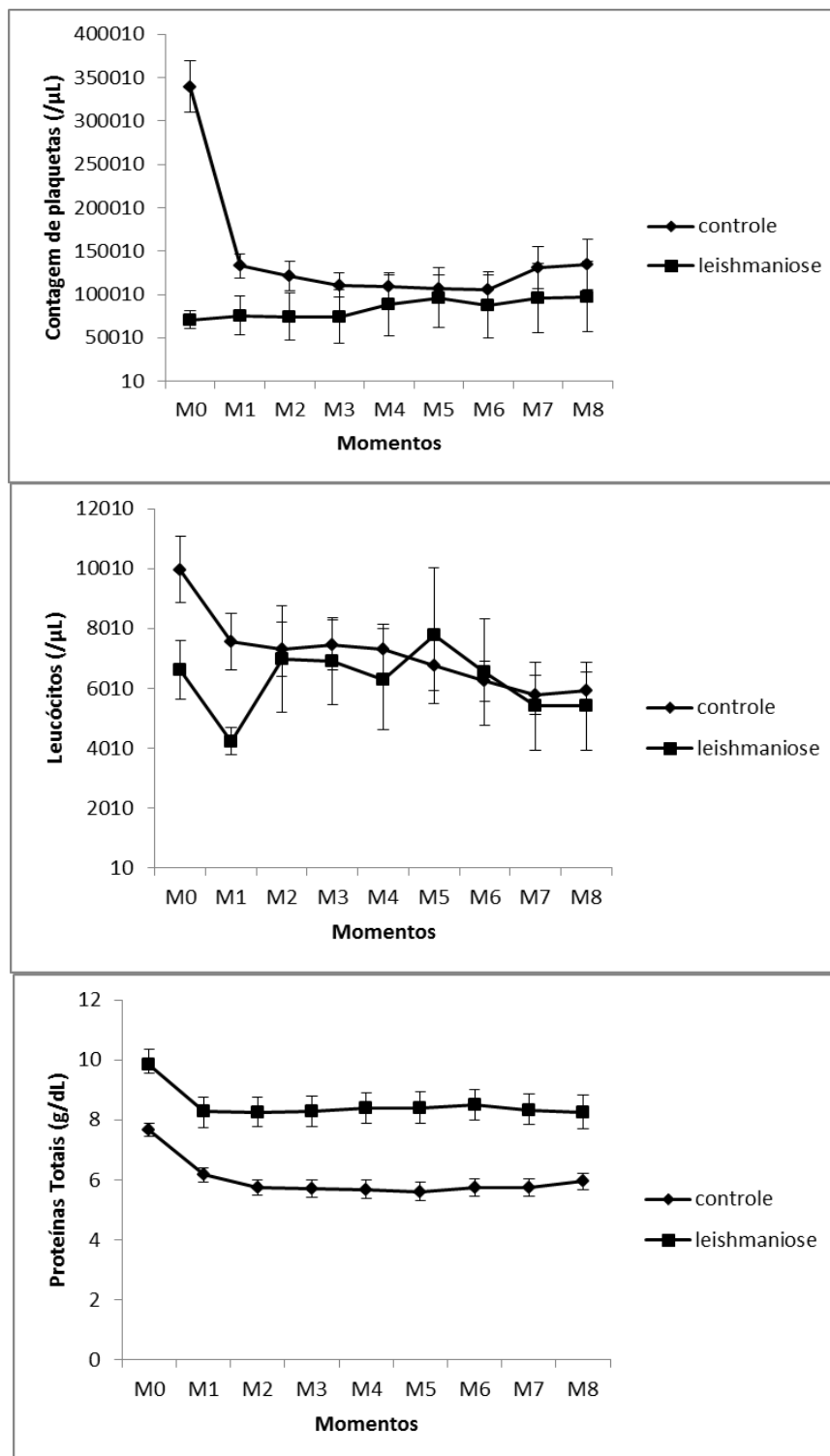


FIGURA 15 - Média e erro padrão da contagem de plaquetas, leucócitos totais e determinação da proteína total plasmática dos cães do grupo controle (G_C) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1(imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

Durante a contagem diferencial de leucócitos dos grupos controle e leishmaniose, os aglomerados de células, que surgiram a partir do M3, dificultaram a leitura do esfregaço sanguíneo, impossibilitando a contagem (Figura 16A e B).

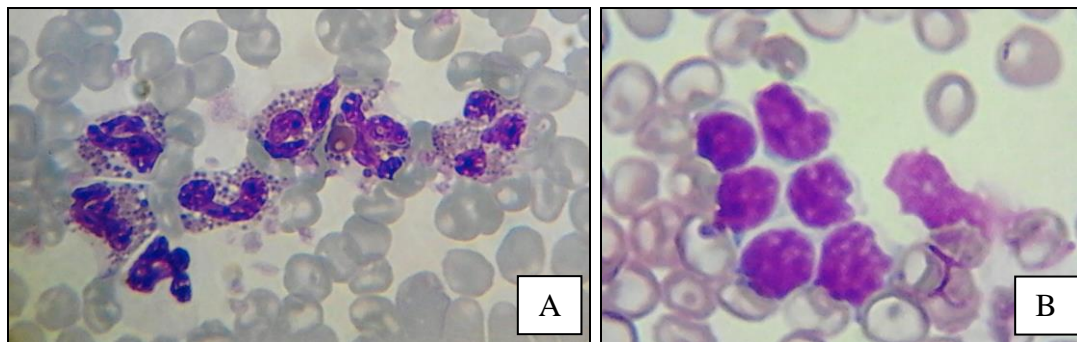


FIGURA 16 – A) Aglomerados de eosinófilos em esfregaço sanguíneo proveniente de sangue estocado em bolsa para transfusão de cães hígidos (grupo controle). B) Aglomerados de linfócitos em esfregaço sanguíneo do grupo leishmaniose. (Fonte: SACCO, 2012).

5.1.2 Teste de fragilidade osmótica

As medianas da determinação da fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) expressa como H_{50} ([NaCl] correspondente a 50% de hemólise), nas bolsas de sangue dos cães do grupo controle e leishmaniose nos momentos estudados encontram-se apresentadas na Figura 17.

Apesar do descrito por Kameneva et al. (1998) e Cicco e Cicco (2007) que relatam aumento da fragilidade osmótica eritrócitária, durante o armazenamento, este não foi significativo ($p > 0,05$) no período avaliado. Além disto, não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Segundo Perk et al. (1964) a osmolaridade com que a célula sofre lise relaciona-se a fatores intrínsecos e extrínsecos. Para Makinde e Bobade (1994), os fatores extrínsecos responsáveis pela redução da FOE compreendem variações fisiológicas, como as pós-prandiais, e também variações patológicas, que incluem a presença de hematozoários, uremia, cirrose e processos autoimunes, por isto esperava-se ainda um aumento ainda maior no G_L .

De acordo com Perk et al. (1964), dentre os fatores intrínsecos destaca-se a forma e tamanho celular, razão área/volume, espécie e propriedades

inerentes às membranas. Segundo Maede (1980), os eritrócitos maiores são proporcionalmente mais resistentes que eritrócitos menores e o tempo de vida da célula também é muito importante, já que os eritrócitos senescentes, que correspondem a 30% da população eritrocitária, são mais frágeis do que os eritrócitos jovens. Provavelmente não ocorreu aumento da FOE no grupo leishmaniose devido à presença de células jovens, demonstrada pela macrocitose e anisocitose e policromasia observadas em esfregaço sanguíneo corado.

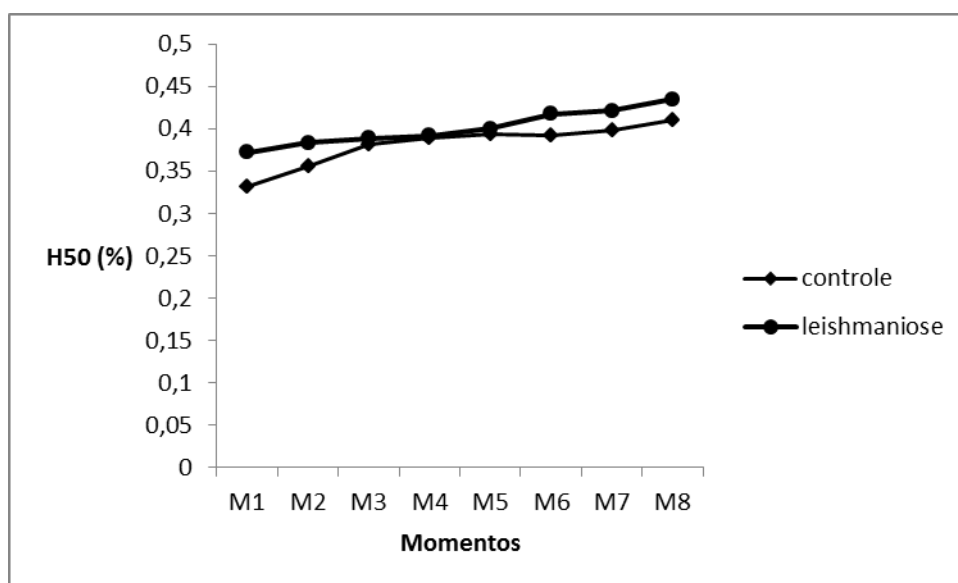


FIGURA 17 - Medianas da fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) expressa como H50 ([NaCl]) correspondente a 50% de hemólise dos grupos controle e leishmaniose, durante 21 dias de conservação do sangue sob refrigeração.

5.1.3 Determinação do pH

Ocorreu uma redução significativa ($p < 0,05$) do pH sanguíneo em ambos os grupos durante o tempo em que as bolsas permaneceram refrigeradas, indo de 7,04 para 6,98 no G_C e de 7,14 para 6,94 no G_L (Tabelas 8, 9 e Figura 18).

Este dado corrobora com os de Wardrop et al. (1994), Ribeiro Filho (1994) e Lopes et al. (1995) que também encontraram diminuição no pH. Esta redução do pH também foi encontrada por Costa Júnior (2006), que relatam que com a retirada do sangue da circulação, o metabolismo celular devido à metabolização da glicose pela via glicolítica anaeróbica, resulta na formação de

lactato, levando a um acúmulo de íons hidrogênio (H^+), o que provoca uma diminuição do pH sanguíneo.

TABELA 8 - pH sanguíneo das bolsas dos cães do grupo controle (G_C) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

G_C Momentos	pH			
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão
M1	7,04 ^a	7,08	0,21	0,06
M2	7,05 ^{ab}	7,05	0,13	0,03
M3	6,99 ^{ab}	7,00	0,16	0,04
M4	7,03 ^{ab}	7,05	0,15	0,04
M5	7,03 ^{ab}	7,05	0,12	0,03
M6	7,01 ^b	7,03	0,11	0,03
M7	7,02 ^b	7,05	0,11	0,03
M8	6,98 ^b	6,98	0,13	0,04

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

TABELA 9 - pH sanguíneo das bolsas dos cães do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

G_C Momentos	pH			
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão
M1	7,14 ^a	7,15	0,13	0,05
M2	7,12 ^a	7,15	0,13	0,05
M3	7,08 ^a	7,05	0,11	0,04
M4	7,07 ^a	7,10	0,13	0,05
M5	7,04 ^a	7,05	0,15	0,06
M6	6,97 ^a	6,95	0,13	0,05
M7	6,99 ^a	7,00	0,12	0,05
M8	6,94 ^b	6,90	0,15	0,06

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

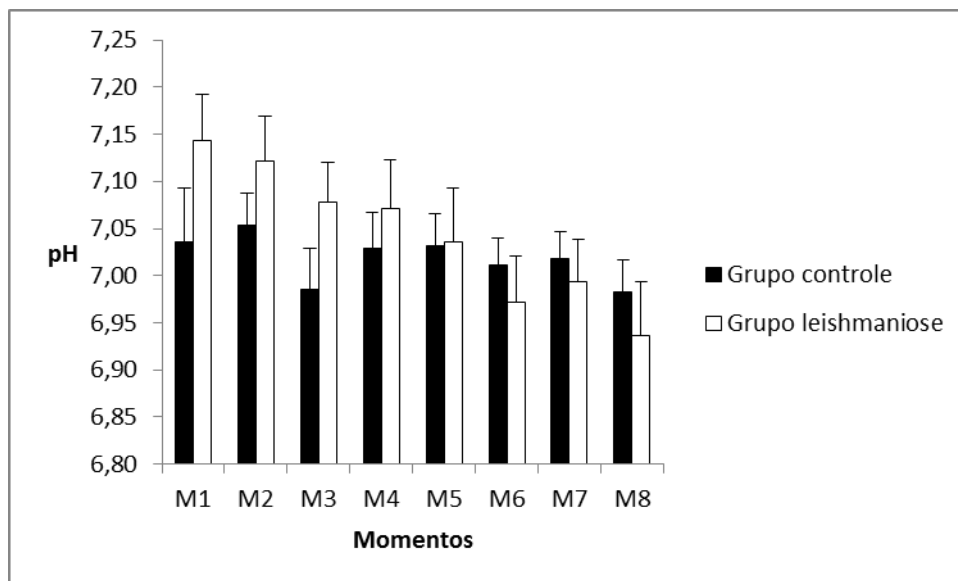


FIGURA 18 - Média e erro padrão do pH sanguíneo das bolsas dos cães do grupo controle (G_C) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

5.1.4 Determinação plasmática do sódio/potássio

Os resultados das dosagens plasmáticas de sódio e potássio das bolsas do grupo controle e do grupo leishmaniose, desde a colheita (M1) até 21 dias após a conservação (M8) encontram-se na Tabela 10 e Figura 19.

Não houve diferença estatística entre momentos e grupos em relação ao sódio ($p > 0,05$), porém todas as médias do eletrólito, tanto em G_C quanto em G_L , estavam acima dos valores de referência proposto por Kaneko et al. (2008), que relatam uma faixa variando de 141,1 a 152,3 mEq/L. Isto ocorreu devido a presença do anticoagulante CPDA-1, composto por ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose e adenina (LANEVSKI e WARDROP, 2001).

Em relação a concentração plasmática do potássio houve aumento significativo ($p < 0,05$) ao longo do tempo de refrigeração nas amostras de sangue, porém dentro dos valores de referência propostos por Kaneko et al. (2008), de 4,37 a 5,65 mEq/L. Ocorreu hipercalemia somente no G_L a partir do M7 (média de $5,78 \pm 0,90$ mEq/L).

TABELA 10 - Determinação da concentração plasmática de sódio e potássio do sangue das bolsas dos cães do grupo controle (G_C) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

Grupos e Momentos	Sódio (mEq/L)				Potássio (mEq/L)				
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão	
G_C	M1	190,14	191,00	13,17	4,98	3,36 ^a	3,40	0,41	0,16
	M2	202,86	196,00	36,55	13,82	4,04 ^{ab}	4,10	0,72	0,27
	M3	222,71	203,00	55,39	20,94	4,96 ^{ab}	4,70	1,17	0,44
	M4	192,14	189,00	16,30	6,16	4,61 ^{ab}	4,60	0,37	0,14
	M5	211,43	191,00	40,64	15,36	5,17 ^b	5,00	0,56	0,21
	M6	202,29	196,00	19,55	7,39	5,07 ^{bc}	5,00	0,58	0,22
	M7	217,29	220,00	31,57	11,93	5,59 ^{bc}	5,20	1,20	0,45
	M8	205,57	201,00	10,45	3,95	5,26 ^c	5,20	0,70	0,27
G_L	M1	200,74	199,00	17,96	5,68	4,00 ^a	3,90	0,41	0,43
	M2	205,65	201,00	56,05	23,20	4,14 ^a	4,00	0,69	0,25
	M3	207,20	205,00	45,20	15,73	4,63 ^a	4,80	0,98	0,50
	M4	200,14	192,00	28,50	10,10	4,65 ^a	4,50	0,45	0,24
	M5	208,70	197,00	34,91	16,95	4,99 ^b	5,00	0,53	0,32
	M6	205,98	202,00	27,55	10,22	5,10 ^b	5,05	0,62	0,12
	M7	217,50	217,00	55,00	10,41	5,78 ^{bc}	5,50	0,90	0,65
	M8	215,63	214,00	15,78	4,50	5,92 ^c	5,30	0,87	0,34

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Portanto para ambos os grupos somente o aumento na concentração plasmática de potássio foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Michael et al. (1975) utilizando sangue humano conservado em bolsas com CPD também relataram aumento de potássio plasmático, descrevendo que este aumento é decorrente da solução preservadora, do tempo de conservação, da redução da atividade da enzima de Na/K ATPase, da temperatura de estocagem e da hemólise que ocorre no sangue durante o período de conservação.

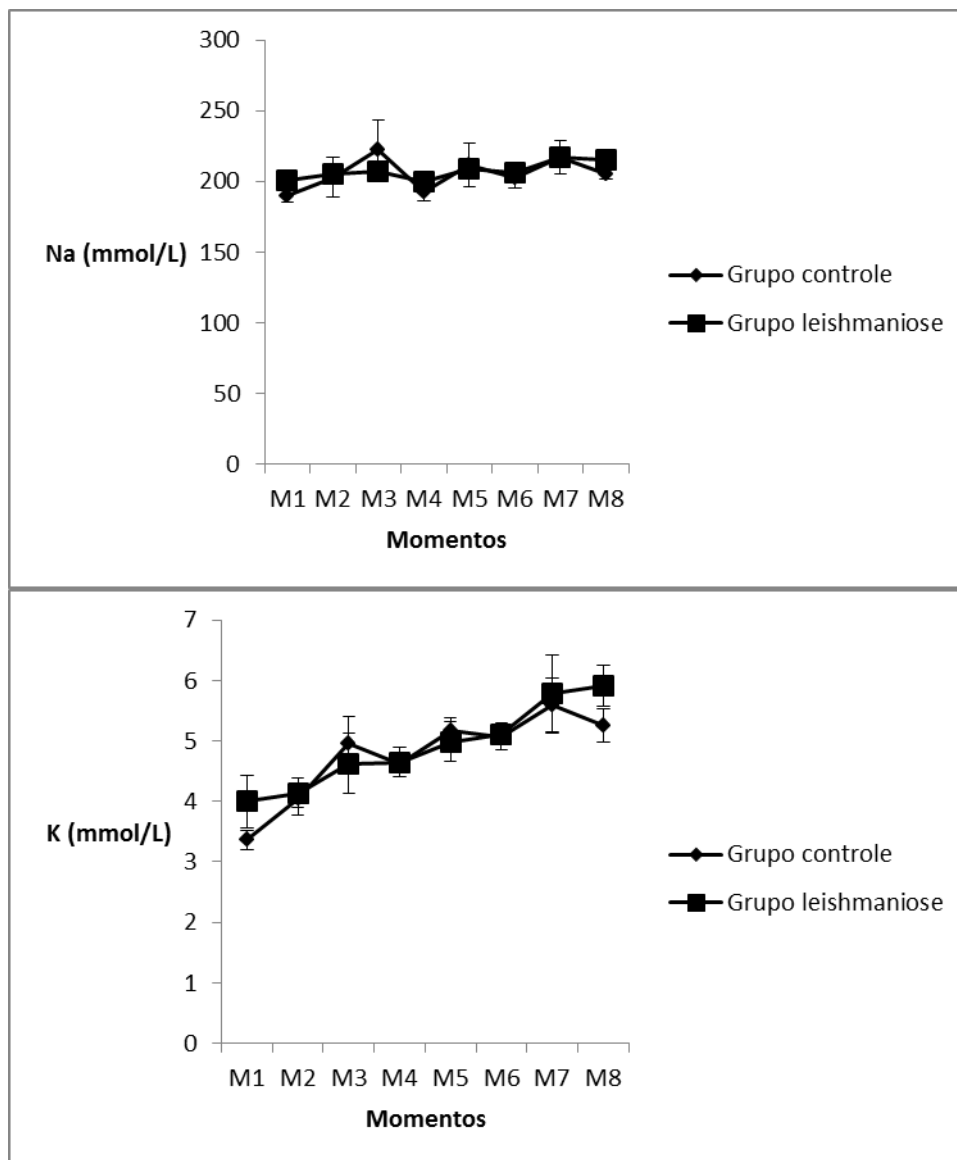


FIGURA 19 - Média e erro padrão dos valores plasmáticos de sódio (Na) e potássio (K) das bolsas dos cães do grupo controle (G_C) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

5.1.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Nas amostras de sangue dos cães do grupo controle não se observou amplificação do DNA de *Leishmania*, como era esperado, já que os animais são oriundos de uma área livre da enfermidade.

Das dez amostras colhidas do grupo leishmaniose, em somente duas foi amplificado o DNA do parasita; nos cães de número três (sintomático) e cinco

(assintomático). No sangue do primeiro animal o DNA do parasita foi amplificado por PCR convencional durante todo o período de conservação (21 dias), porém no cão de número cinco o DNA foi amplificado apenas logo após a colheita de sangue, não sendo mais identificado a partir do momento do armazenamento em bolsa para transfusão.

Resultados negativos na PCR convencional não significam que as bolsas de sangue conservadas não apresentavam o parasita, mas que isto pode ter ocorrido devido à pequena quantidade de parasitas nas bolsas e a menor sensibilidade da técnica de PCR convencional quando comparada à PCR em tempo real. Segundo Pelt-Verkuil (2008) a técnica de PCR em tempo real requer apenas 3 picogramas, o que é material genético cerca de 1000 vezes menor do que a dos ensaios convencionais.

Além disto, o parasita pode não estar naquele momento na circulação sanguínea, estando em outros órgãos como baço, fígado, linfonodos ou medula óssea. Nunes et al. (2007) citam que a escolha do tecido onde será realizada a pesquisa do DNA do parasita influencia a sensibilidade da reação, sendo que a sensibilidade é menor nas amostras de sangue. Principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele e medula óssea (MIRÓ et al., 2008, PALTRINIERI et al., 2010).

Dependendo da fase da doença, encontra-se o parasita em diferentes locais, como a maioria dos animais eram sintomáticos, e portanto, a maior probabilidade era de encontrá-lo em órgãos linfoides, com baixa parasitemia. Isto justifica uma PCR negativa no sangue de cães com sinais e sintomas clínicos da leishmaniose. .

5.1.6 Real-time PCR (qPCR)

A média e desvio padrão das cargas parasitárias determinadas em triplicata pela qPCR encontram-se dispostos na Tabela 11, em todos os momentos avaliados enquanto as bolsas estavam sob refrigeração (M1 a M8), após a adição da riboflavina (RB) e os tratamentos com luz ultravioleta (TT1 e TT2)

TABELA 11 – Carga parasitária (/μL) (média e desvio padrão) das bolsas de sangue positivas na PCR convencional, determinada pela qPCR de amostras de bolsa três e cinco obtidas respectivamente de animal sintomático e assintomático em todos os momentos desde a colheita (M0) até 21 dias de refrigeração (M8) e também após a adição de riboflavina (RB) e dos protocolos de luz UV utilizados TT1 (30 minutos) e TT2 (45 minutos).

Momentos	Bolsa 3 (sintomático)		Bolsa 5 (assintomático)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
M0	43,04	-*	10,93	0,66
M1	22,95	-	5,79	2,92
M2	26,10	6,87	3,19	-
M3	17,34	6,89	1,67	-
M4	26,00	2,49	0	0
M5	19,69	9,62	0	0
M6	8,47	3,23	0	0
M7	2,29	0,59	0	0
M8	3,42	1,64	0	0
RB	5,59	3,07	-	-
TT1	7,75	7,74	-	-
TT2	22,65	1,76	-	-

*Valores não determinados.

A qPCR detectou o DNA do parasita em todas as amostras do animal sintomático (bolsa três) e até M3 (9 dias de refrigeração da bolsa de sangue), do cão assintomático (bolsa cinco).

A qPCR foi mais sensível que a PCR convencional, que só tinha detectado DNA da *L. infantum chagasi* no momento zero do cão sem sintomas da enfermidade. Segundo Mortarino et al. (2004) a técnica de PCR em tempo real (qPCR) é um método avançado que pode detectar níveis extremamente baixos de parasitas. Ramos et al. (2012) compararam as técnicas de PCR convencional e tempo real utilizando amostras de medula óssea (MO), linfonodos e baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum chagasi*, sintomáticos e assintomáticos, observando que a qPCR amplificou o DNA das

leishmanias de 100% das amostras dos animais sem sintomas, enquanto a PCR convencional detectou o parasita em apenas 20% destes animais.

Portanto, o grau de parasitemia do animal doador utilizado na segunda etapa do experimento (bolsa três) foi conhecido durante todo o período em que ficou refrigerado (M0 a M8).

Quando observamos a Tabela 10 pode-se dizer que houve uma diminuição da carga parasitária durante o período em que as bolsas foram mantidas sob refrigeração em ambas as bolsas, três e cinco, chegando a zerar a partir de M4 na bolsa cinco. Existe a possibilidade de que após a adição da riboflavina, e dos protocolos de luz de 30 e 45 minutos na bolsa três, tenha ocorrido um relativo aumento da carga parasitária, que pode ser explicado pela fragmentação do DNA da *Leishmania*, gerando mais porções de DNA após os tratamentos na bolsa de sangue, que foram amplificadas e detectadas pela qPCR.

Ao observamos os resultados da carga parasitária da bolsa três e avaliarmos o protocolo de inoculação em hamsters podemos afirmar que a *L. infantum chagasi* foi capaz de sobreviver por pelo menos 21 dias de armazenamento sob refrigeração. Já Grogl et al. (1993) demonstraram que a *L. donovani* foi capaz de sobreviver por pelo menos 25 dias de conservação.

O risco de transmissão da leishmaniose pela transfusão sanguínea é eminente quando cães parasitados assintomáticos são usados como doadores, principalmente nas transfusões que envolvem sangue total e concentrado de hemácias, nas quais as células mononucleares podem estar presentes. O hemograma e os testes de diagnóstico laboratorial da leishmaniose são exames indispensáveis de triagem para cães doadores de sangue.

5.1.7 Sorologia

Foi realizado na seleção dos cães do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), o teste rápido imunocromatográfico Kalazar Detect®¹⁶, baseado na detecção de anticorpos contra o antígeno rK39 da *Leishmania* sp, sendo todos

¹⁶ Kalazar Detect®, InBios International, Inc. 562 1st Ave. South, Suite 600. Seattle, WA 98104 USA.

os cães selecionados positivos para este exame durante a triagem dos animais no CCZ de Araçatuba-SP.

Teste semelhante está sendo recomendado pelo Ministério da Saúde para o inquérito canino como técnica de triagem (BRASIL, 2011). Os exames comerciais de imunocromatografia utilizam como antígeno o rK39 e têm sido úteis no diagnóstico de LV tanto em seres humanos quanto em cães. Suas vantagens são a simplicidade de uso, rapidez e praticidade, além da ausência de reação cruzada entre *Trypanossoma cruzi* e *L. infantum chagasi* (ZANETTE, 2006; SILVA et al., 2012).

Além disto, foi realizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* nas bolsas de sangue a cada três dias para acompanhamento do título de anticorpos do sangue das respectivas bolsas (M1 a M8).

Todas as amostras apresentavam títulos de 1:640, mantendo-se durante os 21 dias do experimento em todos os momentos avaliados. Isto indica que os cães do grupo leishmaniose, em sua maioria sintomáticos, tinham títulos elevados, que se mantiveram durante o período de conservação do sangue. Segundo Ferrer (1999) e Ferrer (2002), animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*. Para Paltrinieri et al. (2010) em cães a soroconversão ocorre, em média, cinco meses após a infecção, podendo ocorrer entre um e 22 meses. E para Ferrer (2002) os títulos permanecem elevados por, pelo menos, dois anos, indicando que os animais do G_L tinham a infecção há mais tempo. De acordo com Paltrinieri et al. (2010) os títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, obtidos por meio de exames sorológicos, nem sempre estão associados com a severidade dos sintomas e devem ser interpretados com cautela, sendo que títulos baixos geralmente são observados em cães assintomáticos infectados.

Em situações de banco de sangue humanos, anticorpos anti-*Leishmania* foram encontrados em 11 dos 1449 doadores de sangue do distrito de Agrigento, na Sicília, Itália (0,75% dos casos) (SCARLATA et al., 2008) e em 44 dos doadores de sangue de 1437 (3,1%) e Baleares, na Espanha (RIERA et al., 2008). No entanto, a sorologia para leishmaniose não é feita de rotina entre os doadores de sangue.

Segundo Cardo et al. (2006) existem poucos casos publicados de transmissão transfusional acidental de *Leishmania* por vários motivos, dentre eles, a ocorrência de transmissão predominantemente em áreas endêmicas, tornando difícil provar que a transmissão ocorreu pela transfusão. Outro fator é que a infecção pode ser assintomática em animais com sistemas imunológicos saudáveis. Além disto, Harms et al. (2003) discutem que a dificuldade é imposta pelo fato de que o tempo desde o surgimento dos sintomas até o diagnóstico pode variar de um a 16 meses.

Segundo Giger et al. (2002), apenas hospitais veterinários em grandes centros urbanos, faculdades de medicina veterinária e algumas clínicas privadas têm acesso aos doadores de sangue permanentes. Estes animais geralmente são vacinados contra as principais enfermidades virais que afetam os cães e são submetidos a exames sorológicos periódicos para detecção de dirofilariose e hemoparasitoses transmitidas por carrapatos, como a babesiose e erliquiose.

De acordo com Harrell e Kristensen (1995), Owens et al. (2001) e Reine (2004) existe um risco elevado de transmissão de agentes infecciosos durante os procedimentos de transfusão sanguínea, particularmente por protozoários, devido aos seus longos períodos de incubação, a persistência subclínica em animais infectados e a probabilidade de permanecerem viáveis nas bolsas de sangue estocadas.

Na primeira etapa do experimento, o sangue colhido e armazenado em bolsas de transfusão de animais com leishmaniose demonstrou: anemia, hiperproteinemia, trombocitopenia, hipercalemia (após 18 dias de refrigeração), diminuição do pH, 100% das RIFIs positivas (título 1:640) e PCR convencional positiva em 20% dos animais.

Desta forma, os cães do grupo leishmaniose não serviriam como doadores, somente pela observação das alterações feitas no hemograma. O hemograma é um exame de triagem, de fácil realização, que deveria ser feito em todos os animais candidatos a doadores de sangue, já que a sorologia e a PCR são análises mais elaboradas, que demandam tempo, e que seriam inviáveis em um caso de emergência, que é um procedimento de transfusão de sangue.

5.2 Avaliação da eficácia da riboflavina sob ação da luz ultravioleta na inativação de *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado para transfusão – segunda etapa

5.2.1 Sinais e sintomas clínicos observados nos hamsters e necropsia

Próximo ao final do experimento (120 dias), os animais dos grupos leishmaniose e riboflavina apresentaram emagrecimento aparente, quando comparados aos demais grupos.

Durante a necropsia dos hamsters, feita para realização do *imprinting* e colheita dos órgãos (baço, fígado e medula óssea) obtivemos os seguintes resultados: 100% dos animais dos grupos leishmaniose e riboflavina apresentaram esplenomegalia, 50% dos hamsters destes dois grupos apresentaram hepatomegalia e 42% dos animais do grupo leishmaniose apresentaram ascite. Os hamsters do G_{T30} e G_{T45} não apresentaram sinais e sintomas durante o período de observação (Tabela 12).

TABELA 12 – Evolução clínica dos hamsters (número de animais que desenvolveram ou não sintomas/número total de animais) após inoculação de sangue de cão com leishmaniose nos diferentes tratamentos (grupo leishmaniose - G_L, grupo riboflavina – G_{RB}, grupo tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV – G_{T30} e grupo tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV – G_{T45}).

Grupos	Sintomáticos	Assintomáticos
G _L	7/7	0/7
G _{RB}	7/7	0/7
G _{T30}	0/7	7/7
G _{T45}	0/7	7/7

No presente trabalho após 120 dias os hamsters do grupo leishmaniose apresentaram hepatoesplenomegalia e ascite. Lei et al. (2010) inocularam hamsters com *L. infantum chagasi* pela da veia safena e em aproximadamente 15 semanas (105 ± 22,2 dias), os animais apresentaram pele enrugada, aumento de volume abdominal devido à hepatoesplenomegalia, e/ou ascite. Freitas et al. (2005) realizaram inoculação de sangue total de cão com

leishmaniose e de concentrado de células mononucleares isoladas infectadas por *Leishmania* em hamsters e observaram que após inoculação de sangue total de cão com leishmaniose os sinais e sintomas clínicos nos hamsters foram mais evidentes, apresentando aumentos variáveis no baço, no fígado e de gânglios linfáticos mesentéricos, bem como presença de líquido ascítico em alguns casos.

Desta forma, pode-se dizer que o sangue canino da bolsa três inoculado nos Hamsters nos grupos G_L e G_{RB} continha leishmanias e que estas foram transmitidas. O volume de sangue canino utilizado para inoculação dos hamsters no experimento (3,5 mL) demonstrou que o parasita *Leishmania infantum chagasi* pode ser experimentalmente transmitido pelo sangue total de cães naturalmente infectados para seus os receptores (hamsters sensíveis).

Este é um achado importante, dado ao amplo uso de transfusões de sangue na Medicina Veterinária. Além disto, no Brasil, geralmente a terapia pelo sangue envolve o uso de sangue total e de cães doadores escolhidos aleatoriamente, sem o diagnóstico laboratorial para leishmaniose.

Segundo Fast et al. (2006), a ação da RB associada à luz UV resulta na inibição das citocinas/quimiocinas, por isso hipotetizamos que este é o motivo dos hamsters que receberam sangue tratado não apresentarem sinais e sintomas clínicos, associado à baixa carga parasitária.

Segundo Goto e Lindoso (2004) o hamster mimetiza a patogenia e a clínica da doença humana e canina, manifestando a hepatoesplenomegalia e supressão da resposta das células T. Portanto, os animais dos grupos tratados G_{T30} e G_{T45} podem não ter desenvolvido a doença clínica pela supressão da resposta imune mediada por linfócitos T, que segundo Rosypal et al. (2005) interagem com os macrófagos parasitados. Estudos realizados por Guarga et al. (2000) em cães sintomáticos provenientes do Mediterrâneo com LV revelaram que a ausência de resposta celular está relacionada com a diminuição dos níveis de CD4+ e altos títulos de anticorpos. Para Baneth e Solano-Gallego (2012), os anticorpos específicos opsonizam as formas amastigotas iniciando sua fagocitose pelos macrófagos. Ainda de acordo com Rosypal et al. (2005) , os macrófagos infectados têm capacidade reduzida de interagir com linfócitos T, o que interfere na liberação de interferon-gama e promovem a destruição do parasito.

5.2.2 *Imprinting* medula óssea, baço e fígado

Dos sete hamsters inoculados do grupo leishmaniose somente um foi negativo, não sendo encontradas formas amastigotas de LV no esfregaço sanguíneo corado obtido pela leitura das lâminas de *imprinting* dos órgãos avaliados (medula óssea, baço e fígado), sendo, portanto 83% dos animais positivos para *Leishmania* (Figura 21). O mesmo ocorreu no grupo riboflavina. Porém dos sete animais do grupo tratado I e dos sete do grupo tratado II, quatro em cada grupo foram positivos na pesquisa de formas amastigotas de leishmanias (57%) em pelo menos um dos órgãos linfoides, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparamos G_L e G_{RB} com os grupos tratados com riboflavina associada à luz ultravioleta (G_{T30} e G_{T45}).

Mesmo após o tratamento com riboflavina associada à luz UV nos grupos G_{T30} e G_{T45} , em 57% dos animais em cada grupo foram detectadas as formas amastigotas no esfregaço sanguíneo (Figura 20), indicando que não ocorreu a eliminação completa dos parasitas.

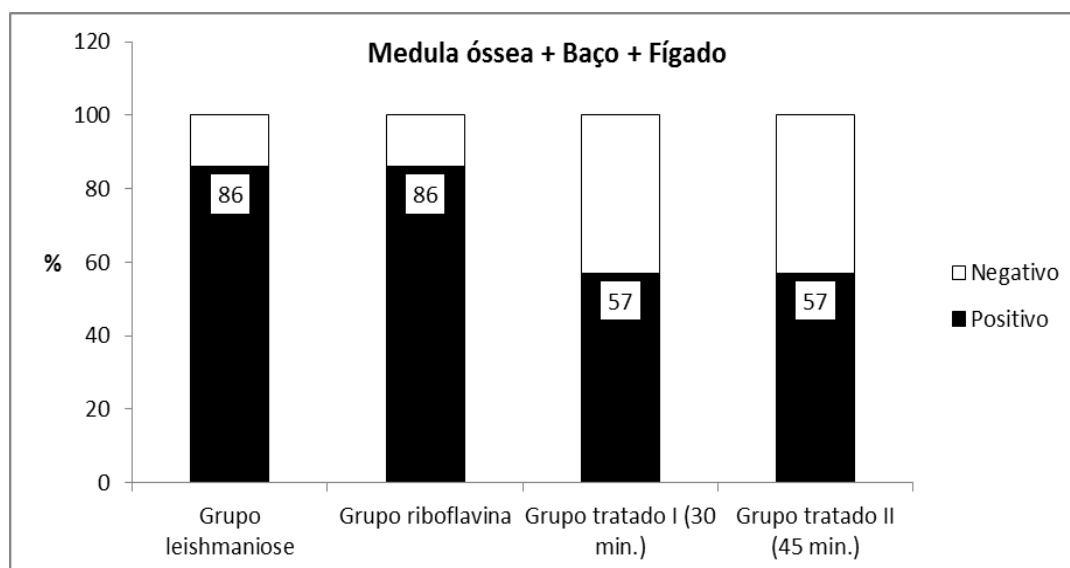


FIGURA 20 – Porcentagem de lâminas positivas e negativas para *L. infantum chagasi* em “*imprinting*” dos órgãos linfoides (medula óssea, baço e fígado) dos hamsters dos grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Quando avaliados os órgãos linfoides separadamente, formas amastigotas de LV foram encontradas no esfregaço sanguíneo corado obtido através do *imprinting* medula óssea dos hamsters no grupo leishmaniose, sendo que 86% das amostras eram positivas e 14% negativas; no grupo riboflavina 71% eram positivas e 29% negativas; no tratamento com associação de riboflavina e luz UV por 30 minutos (grupo tratado I) 29% eram positivas e 71% das lâminas eram negativas e no tratamento com associação de riboflavina e luz UV por 45 minutos (grupo tratado II) 14% eram positivas enquanto que em 86% das lâminas não foi encontrado o parasita. A menor porcentagem de lâminas positivas para *L. infantum chagasi* foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados os grupos tratados com luz UV por 30 e 45 minutos com os grupos leishmaniose e riboflavina (Figura 21).

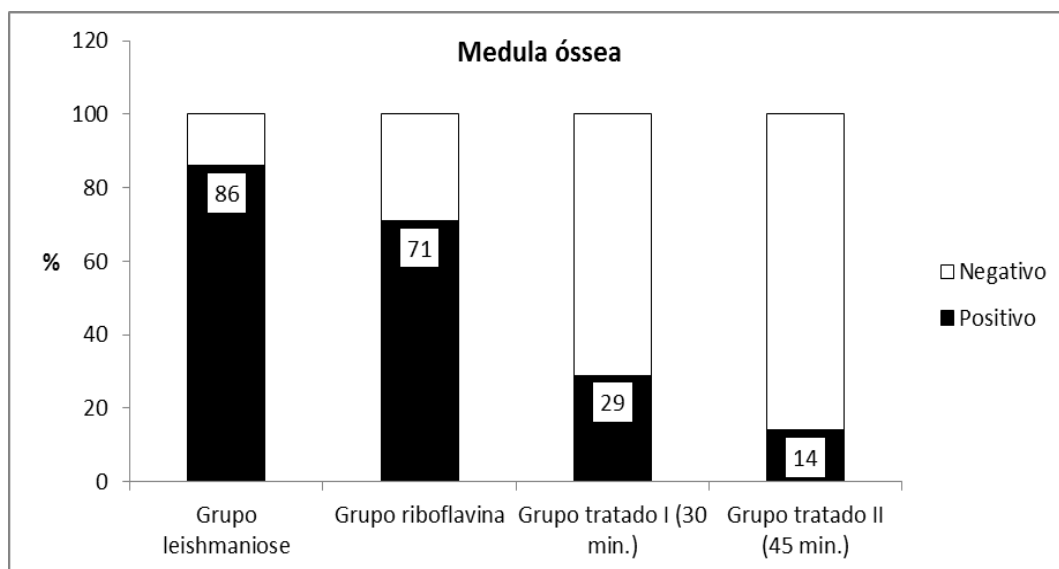


FIGURA 21 – Porcentagem de lâminas positivas e negativas para *L. infantum chagasi* em “imprinting” de medula óssea dos Hamsters dos grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp foram encontradas no esfregaço sanguíneo corado obtido através do *imprinting* de baço, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Sendo a porcentagem de amostras positivas 71% e a porcentagem de amostras negativas 29% no grupo leishmaniose e 57% positivas e 43% negativas, nos grupos riboflavina, tratado I e tratado II (Figura 22).

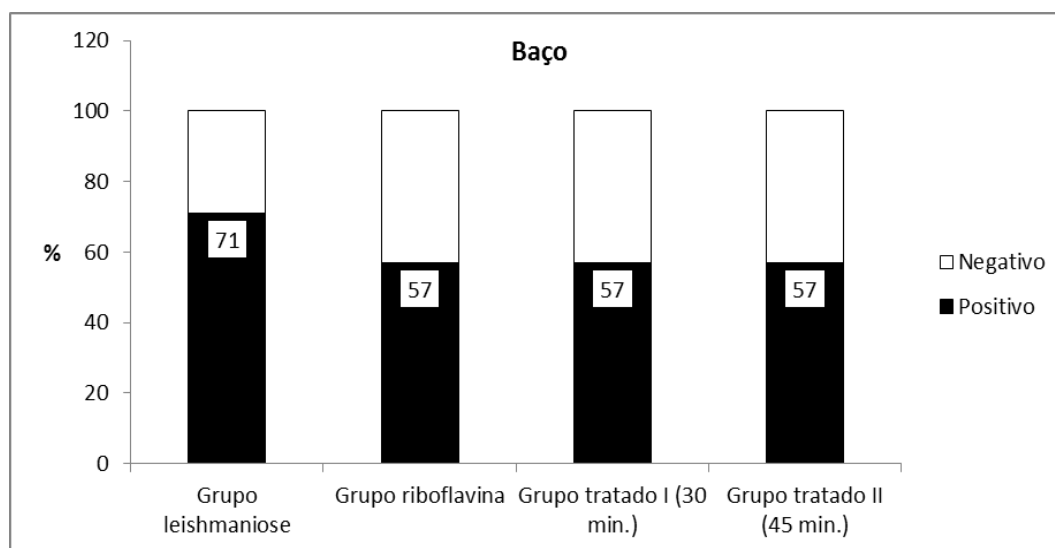


FIGURA 22 – Porcentagem de lâminas positivas e negativas para *L. infantum chagasi* em “imprinting” de baço dos Hamsters dos grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp foram encontradas no esfregaço sanguíneo corado obtido através *imprinting* de fígado, não havendo diferença entre os grupos ($p > 0,05$), sendo que 14% das amostras eram positivas e 86% negativas no G_L , 29% das amostras eram positivas e 71% negativas no G_{RB} , 29% das amostras eram positivas e 71% negativas no G_{T30} e 14% das amostras positivas e 86% negativas no G_{T45} (Figura 23).

A pesquisa de amastigotas foi positiva no baço na maioria dos animais infectados, independente do grupo inoculado com sangue de canino com leishmaniose, confirmando as observações de outros autores em infecções experimentais, e em casos caninos e humanos de leishmaniose visceral submetidos à necropsia (ZIJLSTRA et al., 2001; RIÇA-CAPELA et al., 2003; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; WYLLIE e FAIRLAMB, 2006). De acordo com Singh e Sivakumar (2003), em cães, a sensibilidade é maior quando se utiliza aspirado esplênico. Segundo Zijlstra et al. (2001) o diagnóstico da doença nos cães pode ser feito pela demonstração das formas amastigotas em aspirados de linfonodos, medula óssea e baço, com sensibilidade de 58, 70 e 96% respectivamente.

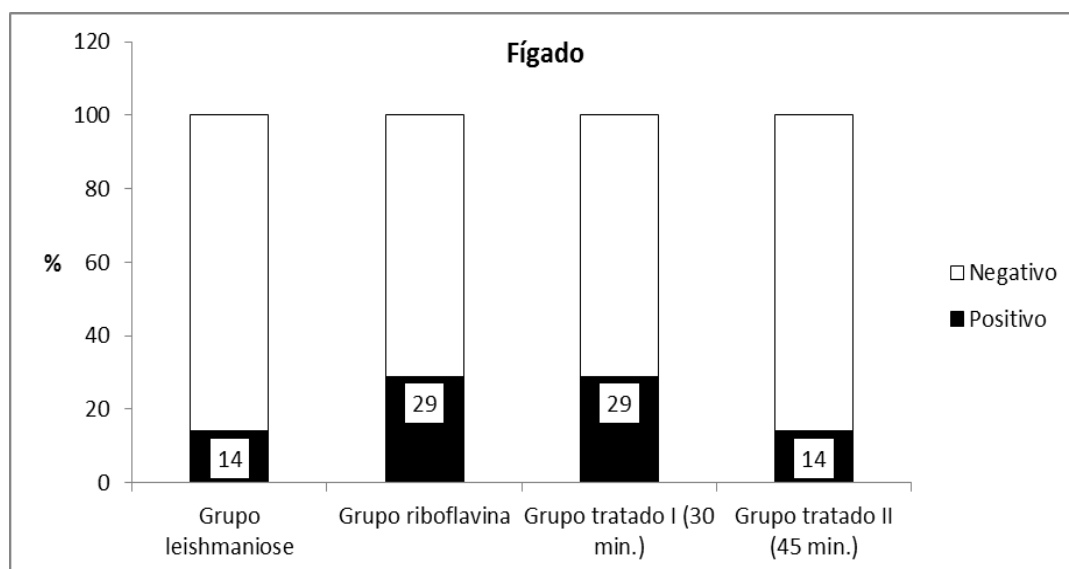


FIGURA 23 – Porcentagem de lâminas positivas e negativas para *L. infantum chagasi* em “imprinting” de fígado dos Hamsters dos grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

A pesquisa de formas amastigotas nos *imprintings* dos órgãos linfoides dos hamsters dos grupos G_L , G_{RB} , G_{T30} e G_{T45} serviu para diagnosticar a LV. Para Kontos e Koutinas (1993), Ferrer (1999) e Ikeda-Garcia e Feitosa (2007) uma das formas mais seguras de diagnóstico de leishmaniose visceral é a observação direta de formas amastigotas do parasita em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos. Para Slappendel e Ferrer (1998) a especificidade deste método é virtualmente 100%, mas dependendo do tempo despendido procurando o parasita, a sensibilidade passa a ser de no máximo 80% em animais sintomáticos e menor em cães assintomáticos.

5.2.3 PCR convencional

Os sete Hamsters inoculados do grupo leishmaniose tiveram todas as amostras de sangue negativas no PCR convencional, enquanto 100% das amostras de medula óssea e baço foram positivas. No fígado a PCR foi positiva em 42% das amostras colhidas (Tabela 13). Isto ocorreu porque os animais não estavam mais em parasitemia, devido ao tempo transcorrido entre a inoculação e a obtenção do sangue (120 dias), estando os parasitas nos órgãos linfoides.

TABELA 13 – Resultado do PCR convencional dos Hamsters do grupo leishmaniose: amostras de sangue e macerado de baço, fígado e medula óssea.

Hamsters	Sangue	Baço	Fígado	Medula óssea
1	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
2	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
3	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
4	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
5	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
6	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
7	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo

No grupo riboflavina 28% das amostras foram positivas pela PCR convencional no sangue, 71% no baço e no fígado e 86% foram positivas na medula óssea (Tabela 14). Este grupo se comporta de forma semelhante ao G_L, já que a riboflavina utilizada sem a associação com a luz UV, não apresenta sua ação inativadora de agir como um fotossensibilizador, e desta forma segundo Goodrich (1997) e Marschner e Goodrich (2011) não provoca os danos seletivos aos ácidos nucleicos esperados.

TABELA 14 – Resultado do PCR convencional dos hamsters do grupo riboflavina: amostras de sangue e macerado de baço, fígado e medula óssea.

Hamsters	Sangue	Baço	Fígado	Medula óssea
1	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
4	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
5	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
6	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Dos hamsters que receberam sangue tratado com riboflavina e luz ultravioleta por 30 minutos (tratado I), 28% das amostras foram positivas para PCR no sangue, 100% positivas no baço e medula óssea e 71% no fígado (Tabela 15). Mesmo após o tratamento com riboflavina associada à luz UV por

30 minutos os animais apresentaram diagnóstico laboratorial positivo, e quando realizada a técnica da PCR convencional, pode-se observar DNA do parasita no sangue, baço, medula óssea e fígado, indicando que o tratamento não eliminou completamente o parasita.

TABELA 15 – Resultado do PCR convencional dos hamsters do grupo tratado I (RB associada a 30 minutos de luz UV): amostras de sangue e macerado de baço, fígado e medula óssea.

Hamsters	Sangue	Baço	Fígado	Medula óssea
1	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
2	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
3	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
5	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
6	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
7	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

Os animais que receberam sangue tratado com riboflavina associada à luz UV por 45 minutos (tratado II) apresentaram porcentagem de positivos na PCR convencional de 28% no sangue e 100% no baço, fígado e medula óssea (Tabela 16). Mesmo após o tratamento com RB e 45 minutos de luz UV os animais apresentaram diagnóstico laboratorial positivo, podendo-se observar DNA do parasita no sangue, baço, medula óssea e fígado, através da PCR convencional, indicando que o tratamento assim como no grupo G_{T30}, não eliminou completamente a *L. infantum chagasi*.

TABELA 16 – Resultado do PCR convencional dos Hamsters do grupo tratado II (RB associada a 45 minutos de luz UV) amostras de sangue e macerado de baço, fígado e medula óssea.

Hamsters	Sangue	Baço	Fígado	Medula óssea
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
3	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
6	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
7	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

Para o diagnóstico realizado por PCR convencional a utilização dos protocolos de luz UV (30 e 45 minutos) não permitiu um diagnóstico negativo, sendo necessária a utilização da PCR quantitativa para determinar a carga parasitária. Para Nunes et al. (2007), a escolha do tecido onde será realizada a pesquisa do DNA do parasita influencia a sensibilidade da reação. De acordo com Miró et al. (2008) e Paltrinieri et al. (2010), nas amostras de sangue a sensibilidade é menor, principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele e medula óssea.

5.2.4 qPCR

A somatória da média da carga parasitária do sangue com os órgãos linfoides (MO, baço e fígado) foi de $134 \times 10^6 \pm 113 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo leishmaniose, $73 \times 10^6 \pm 43 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo riboflavina, $9 \times 10^6 \pm 19 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo tratado I, com a associação de riboflavina mais 30 minutos de luz UV e de $0,5 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo tratado II, com a associação de riboflavina mais 45 minutos de luz UV.

Isto demonstra que apesar dos hamsters serem positivos na técnica de PCR convencional para *L. infantum chagasi*, houve menor carga parasitária nos grupos tratados I e II, quando comparados aos grupos leishmaniose e riboflavina ($p < 0,05$). Esta redução se deve, segundo Speek e Rosenkranz (1979) e Goodrich (1997) ao fato da RB se associar aos ácidos nucleicos do

parasita e interceder no processo de transferência de elétrons oxigênio-independente que leva à modificação destes ácidos nucleicos, principalmente sobre os resíduos de guanina. Para Kumar et al. (2004), a utilização de luz UV, sem a adição de riboflavina, causa dano reversível ao ácido nucleico, porém, os danos induzidos pela RB são irreversíveis, pois os processos de replicação e reparação são prejudicados devido à modificação da base guanina.

O órgão com maior carga parasitária foi a medula óssea, pois todos os grupos apresentaram grande quantidade do parasita, porém houve carga parasitária significativamente menor na MO nos hamsters do grupo G_{T30} e G_{T45} quando comparados aos grupos leishmaniose e riboflavina (RB) ($p < 0,05$) (Tabela 17 e Figura 24).

Quando comparamos a redução da carga parasitária dos grupos com o grupo leishmaniose, o grupo riboflavina teve uma redução de 46% da carga do G_L , enquanto o grupo tratado I (30 minutos de luz UV) teve uma redução de 93% da carga parasitária e o grupo tratado II (45 minutos de luz UV) uma redução de 99% da carga parasitária. Sendo o tratamento do G_{T45} o mais efetivo na redução da carga parasitária.

TABELA 17 – Estatística descritiva da carga parasitária (/ μ L) obtida pela qPCR da medula óssea nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	133 x 10 ⁶ A	112 x 10 ⁶	116 x 10 ⁶	6,62	304 x 10 ⁶	42 x 10 ⁶
Riboflavina	73 x 10 ⁶ A	43 x 10 ⁶	86 x 10 ⁶	0,00	106 x 10 ⁶	19 x 10 ⁶
Tratado I	9 x 10 ⁶ B	19 x 10 ⁶	3,87	0,00	52 x 10 ⁶	7 x 10 ⁶
Tratado II	0,45 x 10 ⁶ B	1 x 10 ⁶	2,69	0,00	3 x 10 ⁶	0,45 x 10 ⁶

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

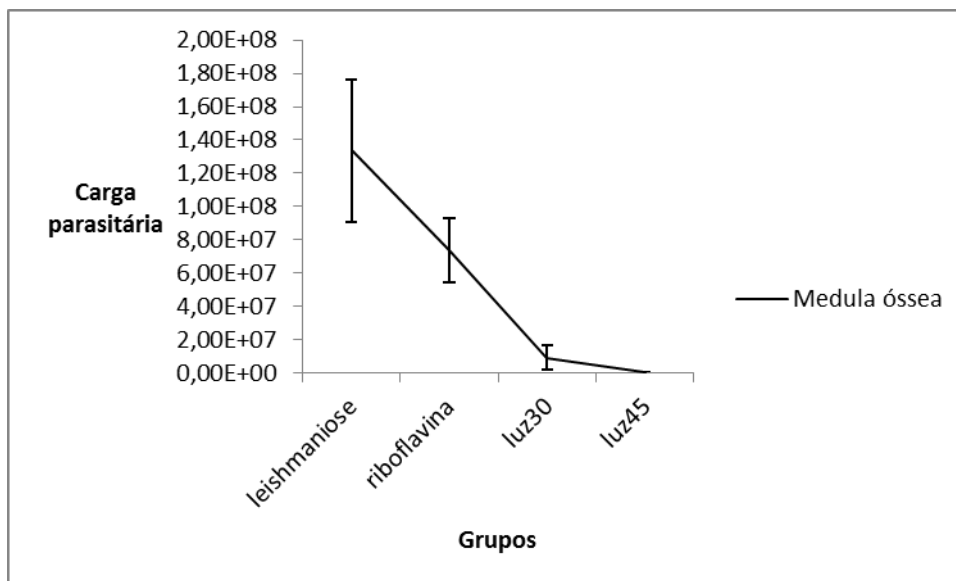


FIGURA 24 – Média e erro padrão da carga parasitária (μL) de *Leishmania* na medula óssea dos Hamsters nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

O baço foi o segundo órgão com maior carga parasitária, havendo diferença significativa entre o grupo leishmaniose e o grupo riboflavina e tratado II ($p < 0,05$) (Tabela 18 e Figura 25). Houve uma redução de 90% da carga parasitária no grupo riboflavina, de 40% no grupo tratado I (30 minutos de luz UV) e de 87% no grupo tratado II (45 minutos de luz UV), quando comparados ao grupo leishmaniose.

TABELA 18 – Estatística descritiva da carga parasitária (μL) obtida pela qPCR do baço nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	476×10^3 A	1×10^6	90,87	9,39	2×10^6	475×10^3
Riboflavina	45×10^3 B	87×10^3	5×10^3	64,70	239×10^3	33×10^3
Tratado I	283×10^3 A	404×10^3	2×10^3	300,55	911×10^3	152×10^3
Tratado II	59×10^3 B	99×10^3	9×10^3	0,00	276×10^3	37×10^3

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

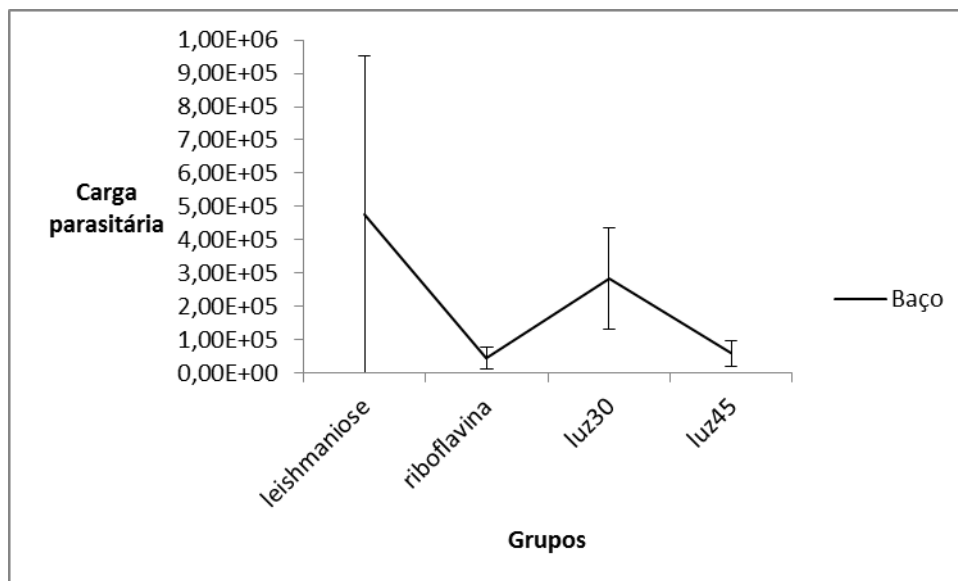


FIGURA 25 – Média e erro padrão da carga parasitária (μL) de *Leishmania* no baço dos Hamsters nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

O fígado não apresentou carga parasitária tão alta quanto os demais órgãos avaliados, não havendo diferença estatística entre os grupos estudados ($p > 0,05$) (Tabela 19 e Figura 26). Segundo Wilson et al. (1996) o fígado serve como local de replicação inicial do parasito e o baço como local de persistência. Em seu estudo com camundongos, aos 60 dias pós-infecção o baço passou a apresentar maior carga parasitária em comparação ao fígado, sugerindo que o mesmo esteja montando uma resposta imune eficiente frente ao parasito. Sabe-se que a infecção do fígado é auto limitante, com formação de granulomas, e que no baço o crescimento do parasito é lento e persistente, além desse órgão ser conhecido por ser mais suscetível à infecção por *Leishmania* spp.

TABELA 19 – Estatística descritiva da carga parasitária (μL) obtida pela qPCR do fígado nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	58,22	131,86	7,59	0,00	356,78	49,84
Riboflavina	111,16	218,35	11,22	0,00	500,61	97,65
Tratado I	83,50	220,00	18,21	2,16	583,20	83,30
Tratado II	119,50	207,17	18,93	0,00	551,70	78,30

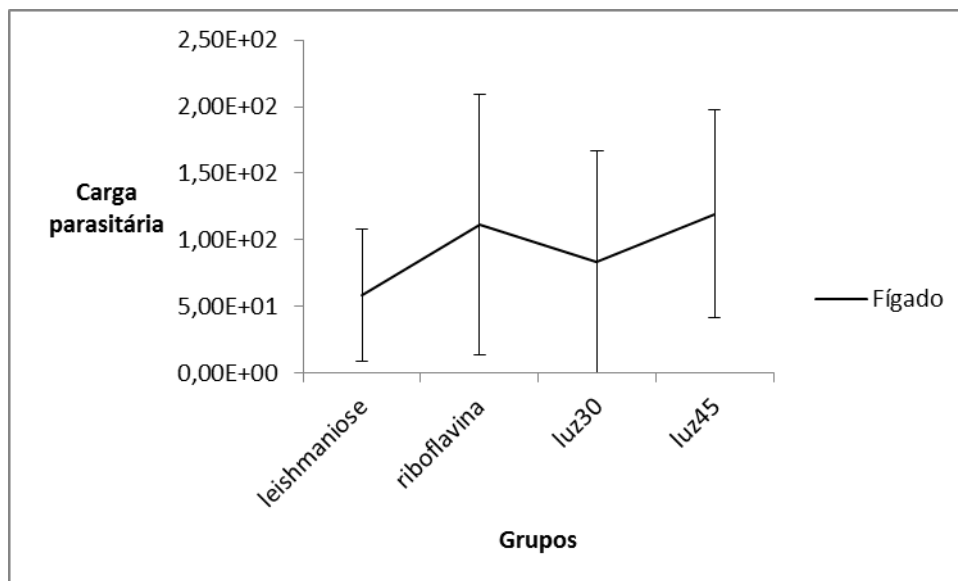


FIGURA 26 – Média e erro padrão da carga parasitária (μL) de *Leishmania* no fígado dos Hamsters nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

O sangue em todos os grupos teve baixa carga parasitária através da técnica de qPCR, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$) (Tabela 20 e Figura 27). Uma explicação para este fato é que parasitemia nesta fase da infecção é menor, já que os parasitas encontram-se nos órgãos linfoides. Na PCR para amostras de sangue, a sensibilidade é menor (NUNES et al., 2007), principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele, medula óssea (MIRÓ et al., 2008, PALTRINIERI et al., 2010) e baço (SOLCÀ et al., 2012).

TABELA 20 – Estatística descritiva da carga parasitária (μL) obtida pela qPCR do sangue nos diferentes grupos : leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	0,85	1,35	0,25	0,00	3,24	0,61
Riboflavina	0,03	0,08	0,00	0,00	0,20	0,03
Tratado I	0,30	0,81	0,00	0,00	2,13	0,30
Tratado II	0,46	0,88	0,00	0,00	2,42	0,33

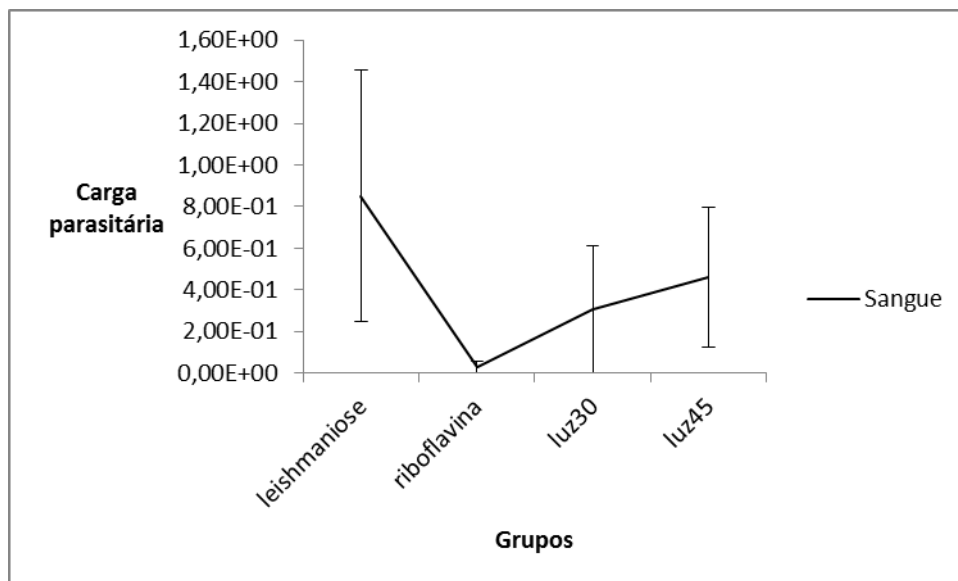


FIGURA 27 – Média e erro padrão da carga parasitária (μL) de *Leishmania* no sangue dos Hamsters nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

A diferença nos resultados no sangue e nos órgãos linfoides pode estar relacionada com a distribuição heterogênea dos parasitas, em cada tecido, bem como a carga parasitária e resposta imune local (MAIA et al., 2009).

Obtivemos resultados semelhantes aos de Cardo et al. (2006), que utilizando riboflavina e luz UV em bolsas de plasma, obteve uma redução significativa de *Leishmania donovani infantum*, principalmente quando avaliamos os resultados das cargas parasitárias na medula óssea e no baço.

Na segunda etapa, identificamos que a associação da riboflavina com a luz UV reduziu a carga parasitária de *Leishmania infantum chagasi* quando consideramos a somatória da média da carga parasitária do sangue com os órgãos linfoides (MO, baço e fígado), porém não evitou que este agente patogênico fosse transmitido em procedimentos de terapia pelo sangue, já que o parasita e o seu DNA foram encontrados nos órgãos linfoides. Porém, o sangue parasitado tratado com riboflavina e luz ultravioleta não foi capaz de produzir sinais e sintomas em hamsters durante o período estudado de 120 dias.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, nas condições em que foi realizado, nos permitem concluir que:

O hemograma e os testes de diagnóstico laboratorial da leishmaniose como citologia aspirativa por agulha fina e sorologia são exames indispensáveis de triagem para cães doadores de sangue.

O sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* não perdeu a capacidade de produzir a infecção após o período de armazenamento.

O tratamento com luz ultravioleta e riboflavina do sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* impede o aparecimento de sintomas nos hamsters e diminui a sua carga parasitária.

Referências

7. REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L.F.; JAFFE, C.L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.13, n.5, p.537-550, 1991.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence, **PLoS ONE** v.7, n.5, e35671, 2012. Disponível em: <<http://www.journal.pone.0035671>>. Acesso em: 07 set. 2013.

ANOSA, V.O.; IDOWU, A.L. The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. **Zentralblatt Veterinärmedizin Reihe B**, v.30, n.8, p.600-608, 1983.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; BUZETTI, W. A. S.; NEVES, M. F.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Diagnóstico por RIFI e PCR de Leishmaniose visceral em cães sintomáticos e oligossintomáticos. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.2, supl. 1, ago, p. 61, 2008.

BADARÓ, R; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESE, R.; FOCACCI, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996, v. 2, p.1234-1259.

BANETH, G., SOLANO-GALLEGU, L. Leishmaniasis In: Greene, C. E. (Ed.) **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 4. ed, Elsevier, 2012, 734-749

BLASI, B.; D'ALESSANDRO, A.; RAMUNDO, N.; ZOLLA, L. Red blood cell storage and cell morphology. **Transfusion Medicine**, v.22, p.90-96, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica nº 48 /2011. **Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_48_2011_diagnostico_lvc_19_9_2011.pdf>. Acesso em: 10 de março de 2013.

BRASIL. Secretaria de Vigilância e Saúde (2012). **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area/=1561>. Acesso em: 08 abr. 2013.

BRYANT, B.J.; KLEIN, H.G. Pathogen inactivation: the definitive safeguard for the blood supply. **Arch. Pathol. Lab Med.** v.131, n.5, p.719-733, 2007.

CAIRUTAS, C. M. **Componentes e derivados do sangue para uso terapêutico.** Recife: Universitária-UFPE, 1985. 382p.

CALLAHAN, S.M.; WONGANAN, P.; OBENAUER-KUTNER, L.J.; SUTJIPTO, S.; DEKKER, J.D. & CROYLE, M.A Controlled inactivation of recombinant viruses with vitamin B2. **Journal of Virological Methods** n.148, p.132–145, 2008.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.8, p.227-234, 1966.

CARDO, L.J.; ASHER, L. Electron micrographic study of the removal of *Leishmania* from blood products by leukodepletion filters. **Transfusion**, .v.46, p.315-316, 2006.

CARDO, L.J.; SALATA, J.; MENDEZ, J.; REDDY, H.; GOODRICH, R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light **Transfusion and Apheresis Science** v.37, p. 131–137, 2007.

CARDO, L.J.; RENTAS, F.J.; KETCHUM, L.; SALATA, J.; HARMAN, R.; MELVIN, W.; WEINA, P.J.; MENDES, J.; REDDY, H.; GOODRICH, R. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani infantum* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. **Vox Sanguinis.** v.90, p.85-91, 2006.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

CICCO, G.; CICCO, S. Hemorheological aspects in the microvasculature of several pathologies. **Adv Exp Med Biol**, v.599, p.7-15, 2007.

CORASH L. Inactivation of infectious pathogens in labile blood components: meeting the challenges. **Transfusion Medicine Reviews**, v.8, p.138-145, 2001.

CORBIN F. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. **Int J Hematol** v.76, n.2, p.253-257, 2002.

COSTA JÚNIOR, J. D. **Avaliação do sangue total de cães armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M.** 2006. 48f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p.149-155, 2005.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 320-325, 2007.

DANON, D., FREI, Y.F., RIMON, A. Simple rapid osmotic fragility test proposed as a routine in blood banks. **Transfusion**, Philadelphia, v.4, n.5, p. 339-342, 1964.

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

DE SOUZA, E.P.; PEREIRA, A.P.E.; MACHADO, F.C.S.; MELO, M.F.; SOUTO-PADRO, T.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Occurrence of *Leishmania donovani* parasitemia in plasma of infected hamsters. **Acta Tropica**. v.80, p.69–75, 2001.

EASTMAN, R.T.; BARRETT, L.K.; DUPUIS, K.; BUCKNER, F.S.; VAN VOORHIS, W.C. *Leishmania* inactivation in human pheresis platelets by a psoralen (amotosalen HCl) and long-wavelength ultraviolet irradiation. **Transfusion**, v.45, p.1459-1463, 2005.

FAST, L.D.; DILEONE, G.; MARSCHNE, S. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation. **Transfusion**, v.51, p.1397-1404, 2006.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, anoV, n.28, p.36-44, 2000.

FELDMAN, B.V.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Canada: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 1344p.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM**. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, 1999. p.6-10.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: **PROCEEDINGS OF SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM**. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Salamanca: Intervet International bv, 2002. p.21-24.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA,

X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.137, n.3-4, p.214-221, 2006.

FREITAS, E.; MELO, M.N. COSTA-VAL A.P.; MICHALICK, M.S.M. Transmissão de *Leishmania infantum* via blood transfusão in dogs: potencial for infection and importance of clinical factors, **Vet. Parasitol.** v.137, p.159–167. 2005.

FREITAS, J. C. C.; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.109, p.11-20, 2010.

GALIMBERTTI, M.Z., KATZ, G., CAMARGO-NEVES, V.L.F., RODAS, L.A.C., CASANOVA, C., COSTA, A.I., ARAÚJO, M.F.L., TANIGUCHI, H.H., BARBOSA, J.A.R., BARBOSA, J.E.R., TOLEZANO, J.E., PINTO, P.L.S. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.217-8, supl. I, 1999.

GIGER, U.; OAKLEY, D. A.; OWENS, S. D.; SCHANTZ, P. *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. **Transfusion**, v.42, p.381–383, 2002.

GKOUMASSI, E.; DIJKSTRA-TIEKSTRA, M.J.; HOENTJEN, D.; DEWILDT-EGGEN, J. Hemolysis of red blood cells during processing and storage. **Transfusion**, v.52, p.489-492, 2012.

GOMES, A.H.S.; FERREIRA, I.M.R.; LIMA, M.L.S.R.; CUNHA, E.A.; GARCIA, A.S.; ARAÚJO, M.F.L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control for canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p. 234-241, 2006.

GOODRICH, R.P., HANSEN, E., GILMOUR, D., JESSER, R., KEIL, S. & GOODRICH, T. Inactivation of Pathogens in Blood Products with Riboflavin and Light. In: Gambro **BCT, Inc., Lakewood, CO, USA**, 2000.

GOODRICH, R.P.; DOANE, S.; REDDY, H.L. Design and development of a method for the reduction of infectious pathogen load and inactivation of white blood cells in whole blood products. **Biologicals**, v.38 , p.20–30, 2010.

GOODRICH, R.P.; EDRICH, R.A.; GOODRICH, L.; SCOTT, C.; MANICA, K.; HLAVINKA, D.; HOVENGA, N.; HANSEN, E.; GAMPP, D.; KEIL, S.D., GILMOUR, D.; LI, J.; MARTIN, C.B., PLATZ, M.S. The antiviral and antibacterial properties of riboflavin and light: applications to blood safety and transfusion medicine. In: SILVA, E.; EDWARDS, A.M. (eds). **Flavins: Photochemistry and Photobiology**. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2006, p. 83–113.

GOODSTEIN, M.H., LOCKE, R.G., WLODARCZYK, D. et al. Comparison of two preservation solutions for erythrocyte transfusions in newborn infants. **J. Pediatr.** v.123, n.5, p. 783-788, 1993.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p.615-623, 2004.

GREENWALT, T.J. The how and why of exocytic vesicles. **Transfusion**, v.46, p.143-152, 2006.

GUARGA, J. L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M. J.; PERIBANEZ, M. A.; ALVAR, J.; CASTILLO, J. A. Canine leishmaniasis transmission, higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T-helper cells. **Res. Vet. Sci.**, v.69, p.249-253, 2000.

HARMS, G.; SCHONIAN, G.; FELDMEIER, H. Leishmaniasis in Germany. **Emerg Infect Dis**, v.9, p.872–875, 2003.

HARRELL, K. A.; KRISTENSEN, A. T. Canine transfusion reactions and their management. **Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.**, v.25, p.1333–1364, 1995.

HESS, J.R.; GREENWALT, T.G. Storage of red blood cells: new approaches. **Transfus Med Ver**, v.16, p.283–295, 2002.

HOCHMAN, B.; FERREIRA, L. M.; BÔAS, F. C. V.; MARIANO, M. Integração do enxerto heterólogo de pele humana no subepitélio da bolsa jugal do hamster (*Mesocricetus auratus*). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.5, p.415-430, 2003.

IKEDA-GARCIA, F. A. **Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica de cães, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos a diferentes protocolos de tratamento.** 2004. 184f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista Clínica Veterinária**, n.62, p.32-38, 2007.

IKEDA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M.; GONÇALVES, M.E.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba - SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, v.8, n.47, p.42-48, 2003.

JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology.** 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986.

JANETZKO, K.; HINZ, K.; MARSCHNER, S.; KLÜTER, H.; BUGERT, P. Monitoring of the Mirasol Pathogen Reduction Procedure for Platelet Concentrates by PCR and bioanalyzer; **Transfus Med Hemother**, v.34, n.1, p.60-65, 2007.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 2008, 932p.

KAMENEVA, M.V.; GARRETT, K.O.; WATACH, M.J.; BOROVETZ, H.S. Red blood cell aging and risk of cardiovascular diseases. **Clin Hemorheol Microcirc**, v.18, p.67-74, 1998.

KESSLER, R.J.; RANKIN, S.; YOUNG, S.; SHEA, K.; CALABRESE, M.; GULDIN, A.; LIPSON, N.; OAKLEY, D. A.; GIGER, U. Pseudomonas fluorescens contamination of a feline packed red blood cell unit and studies of canine units. **Vet Clin Pathol**, v.39, n.1, p. 29–38, 2010.

KLEIN, H.G. Pathogen inactivation technology: cleansing the blood supply. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, p.224–237, 2005.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old World Canine Leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education Small Animal**, v.15, n.7, p.949-959, 1993.

KRISTENSEN, A.T., FELDMAN, B.F. Bancos de sangue e medicina transfusional. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária** Doenças do cão e do gato. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 497-517.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.811-827, 2005.

LANEVSKI, A. & WARDROP, K. J. Principles of transfusion medicine in small animals. **Can Vet J**, v. 42, p. 447-454, 2001.

LEI, S. M; RAMER-TAIT, A. E.; DAHLIN-LABORDE, R. R.; MULLIN, K.; BEETHAM, J. K. Reduced hamster usage and stress in propagating *Leishmania chagasi* promastigotes using cryopreservation and saphenous vein inoculation. **J. Parasitol.**, v.96, n.1, p. 103–108, 2010.

LOPES, R.S., KOHAYAGAWA, A., DANTAS FILHO, J., PEREIRA, A.M., CURI, P.R. Alterações hematológicas e bioquímicas em sangue total de eqüino, conservado para transfusão, em bolsas plásticas contendo ACD-F. **Rev. Univ. Rural, Sér. Ciênc. da Vida**, v.17, n.2, p. 91-95, dez, 1995.

MAEDE, Y. Studies on feline haemobartonellosis. VI. Changes of erythrocyte lipids concentration and their relation to osmotic fragility. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.42, n.3, p.281-288, 1980.

MAIA, C.; RAMADA, J.; CRISTÓVÃO, J. M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Vet J**, v.179, n.1, p.142-144, 2009.

MAKINDE, M. O.; BOBADE, P. A. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science**, v.57, n.3, p.343-348, 1994.

MARSCHNER, S.; GOODRICH, R. Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light. **Transfus Med Hemother**; v.38, p.8–18, 2011.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; SOUZA, P.P.; TOLEDO, L.M.; FILHO, F.B.R. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.1, n.4, p.432-446, 1985.

MATHUR, P.; SAMANTARAY, J.C. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. **Transfusion Medicine**, v.1, p. 319-321, 2004.

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

MEISELMAN, H.J. Morphological determinants of red cell deformability. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, v.156, p.27–34, 1981.

MICHAEL, J.M.; DORNER, I.; BURNS, D.; LADENSON, J.H.; SHERMAN, L.A. Potassium load in CPD-preserved whole blood and two types of packed red blood cells. **Transfusion**, v.15, n.2, p.144-149, 1975.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two, **Trends in parasitology**, v.24, p.371-377, 2008.

MORTARINO, M.; FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F.; BAZZOCCHI, C.; GENCHI, C.; BANDI, C. Quantitative PCR in the Diagnosis of *Leishmania*. **Parasitology**, n. 46, p. 163-167, 2004.

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B. DE; AZEVEDO, M. A. A DE; LIMA, V. M. F. DE; GARCIA, J. F. 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.

OYEWALE, J.; T. DZENDA, L.; YAQUB, D.; AKANBI, J.; AYO, O.; OWOYELE, N.; MINKA, T. Alterations in the osmotic fragility of camel and donkey erythrocytes caused by temperature, pH and blood storage. **Vet. Arhiv**, v.81, p.459-470, 2011.

OWENS, S.D.; OAKLEY, D.A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T.J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U.

Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v.219, p.1076-1083, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; PARAGUAI-DE-SOUZA, E.; GOMES, E.M.; MACHADO, F. C. S.; LUZ, K. G.; BOROJEVIC, R. Transmission of visceral leishmaniasis by blood transfusion in hamsters. **Braz J Med Biol Res**. v.29, n.10, p.1311-1315, 1996.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.236, p.1184–1191, 2010.

PATTERSON, J.; ROUSSEAU, A.; KESSLER, R.J.; GIGER, U. In Vitro Lysis and Acute Transfusion Reactions with Hemolysis Caused by Inappropriate Storage of Canine Red Blood Cell Products. **J Vet Intern Med**, v.25, p.927–933, 2011.

PERK, K.; FREI, Y. F.; HERZ, A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, v. 25, p.1241-1248. 1964.

PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**, Springer, 2008, 332p.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENNAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G.; RUITENBERG, E.J. Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.** v.62, n.1, p.229-235, 1994.

POWELL, L.W.; HALLIDAY, J.W.; KNOWLES, B.R. The relationship of red cell membrane lipid content to red cell morphology and survival in patients with liver disease. **Aust N Z J Med**, v.5, p.101–107, 1975.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, v. 1, p. 713-732.

PRICE, G.S., FAIRLEY, N.M., MEUTEN, D.J. Evaluation of red blood cell fragility in pygmy goats. **American Journal Veterinary Research**, v.49, n.9, p.1598-1600, 1988.

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

REDDY, H.L.; DAYAN, A.D.; CAVAGNARO, J.; GAD, S.; LI, J; GOODRICH, R.P. Toxicity Testing of a Novel Riboflavin-Based Technology for Pathogen Reduction and White Blood Cell Inactivation. **Transfusion Medicine Reviews**, v.22, n.2, p.133-153, 2008.

REIKVAM, H.; MARSCHNER, S.; APELSETH, T.O.; GOODRICH, R.; HERVIG, T. The Mirasol® Pathogen Reduction Technology system and quality of platelets stored in platelet additive solution. **Blood Transfusion**, v.8, p.186-192, 2010.

REINE, N.J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. **Clin. Tech. Small Anim. Pract.**, v.19, p.68–74, 2004.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; GUERRA, L.L.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; and MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. and Experimental Immunology**. v.146, p.303-311, 2006

REY, L. O Complexo “*Leishmania donovani*” e a Leishmaníase Visceral. In:____. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.253-266, 2001.

RIBEIRO, V. M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal**, v.11, n.3, p.13-19, 2001.

RIBEIRO FILHO, J. D.; ALMEIDA, C. T.; GONÇALVES, R. C.; KOHAYAGAWA, A.; CURY, P. R. Alterações hemogasométrias de sangue bovino durante a conservação em frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. **Vet. Zootec.**, v.6, p.77-84, 1994.

RIÇA-CAPELA, M. J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M. C.; GOMES, G. S.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology Research**, v.89, n. 3, p. 163-169, 2003.

RIERA, C.; FISA, R.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; SERRA, T.; GIRONA, E.; JIMÉNEZ, M.; MUNCUNILL, J.; SEDEÑO, M.; MASCARÓ, M.; UDINA, M.; GÁLLEGO, M.; CARRIÓ, J.; FORTEZA, A.; PORTÚS, M. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). **Transfusion**, v.48, p.1383-1389, 2008.

ROSPAL, A. C.; GOGAL, R. M. J.; ZAJAC, A. M.; TROY, G. C.; LINDSAY, D. S. Flow cytometric analyses of cellular responses in dogs experimentally infected with a North American isolate of *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, v.131, p.45-51, 2005.

RUANE, P. H.; EDRICH, R.; GAMPP, D.; KEIL, S. D. K.; LEONARD, R. L.; GOODRICH, R. P. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria

in platelet concentrates using riboflavin and light. **Blood Components**, v.4, p.877-885, 2004.

SEGHATCHIAN, J.; DE SOUSA, G. Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends. **Transfusion and Apheresis Science**, v.35, p.189-196, 2006.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 1998, 221p.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Revista Clínica Veterinária**, ano II, n.11, p.24-28, 1997.

SCARLATA, F.; VITALE, F.; SAPORITO, L.; REALE, S.; VECCHI, V.L.; GIORDANO, S.; INFURNARI, L.; OCCHIPINTI, F.; TITONE, L. Asymptomatic *Leishmania infantum/chagasi* infection in blood donors of western Sicily. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.102, p.394-396, 2008.

SELTSAM, A.; MÜLLER, T.H. UVC Irradiation for Pathogen Reduction of Platelet Concentrates and Plasma. **Transfus Med Hemother**, v.38, p.43–54, 2011.

SHAW, J. The leishmaniasies – survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SILVA, J.G.L.; SILVA, T.M.; PELOSO, E.F.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; MAYRINK, W.; ARIOSIA, M.C.F.; SILVA, P.M.F.; MARQUES, M.J. Comparison among three Polymerase Chain Reaction assays on detection of DNA from *Leishmania* in biological samples from patients with american cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.2, p.257-9, 2012.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent Advances in the Diagnosis of Leishmaniasis. **J. Postgrad. Med.**, v.49, p.55-60, 2003.

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

SOLCÀ, M. S.; GUEDES, C. E.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G.; SANTOS, W. L.; FRAGA, D. H.; VERASA, P. S. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.184, p.133– 140, 2012.

SPECK, W.T.; ROSENKRANZ, H.S. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia – a potential environmental health hazard to newborn infants: a review. **Environ Mutagen**, v.1, p.321–336, 1979.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: W.B.Saunders Co., 1998, p.450-458.

STAGEMAN, J.R.; BIRKENHEUER, A.H.; KRUGER, J.M.; BREITSCHWERDT, E.B. Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. **J Am Vet Med Assoc**. v.222, p.959–963, 2003.

TEMİZEL, E. M.; CİHAN, H.; YILMAZ, Z.; AYTUĞ, N. Evaluation of erythrocyte and platelet indices in canine visceral leishmaniasis. **Ankara Üniv Vet Fak Derg**, v.58, p.185-188, 2011.

TSAI, A.G., HOFMANN, A.; CABRALES, P.; INTAGLIETTA, M. Perfusion vs. oxygen delivery in transfusion with “fresh” and “old” red blood cells: The experimental evidence. **Transfusion and Apheresis Science**, v.43, p.69–78, 2010.

TONNETTI, L.; THORP, A.M.; REDDY, H.L.; KEIL, S.D.; GOODRICH, R.P.; LEIBY, D.A. Evaluating pathogen reduction of *Trypanosoma cruzi* with riboflavin and ultraviolet light for whole blood. **Transfusion**, v.52, p.409-416, 2012.

VILELA, R. Q. B. Análise prospectiva das alterações imunohematológicas eritrocitárias em pacientes com leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.5, p.589-590, set-out, 1999.

WARDROP, K. J., YOUNG, J., WILSON, E. An *in vitro* evaluation of storage media for the preservation of canine packed red blood cells. **Vet Clin Pathol**. v.23, n.3, p.83-88, 1994.

WARDROP, K.J.; REINE, N.; BIRKENHEUER, A.; HALE, A.; HOHENHAUS, A.; CRAWFORD, C.; LAPPIN, M.R. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. **J Vet Intern Med**. v. 19, n. 1, p. 135-42, 2005.

WAGNER, S.J. SKRIPCHENKO, A.; SALATA, J.; O’SULLIVAN, A.M.; CARDO, L.J. Inactivation of *Leishmania donovani infantum* and *Trypanosoma cruzi* in red cell suspensions with thiazole orange. **Transfusion**, v.48, p.1363-1367, 2008.

WEBERT, K.E.; CSERTI, C.M.; HANNON, J.; LIN, Y.; PAVENSKI, K.; PENDERGRAST, J.M.; BLAJCHMAN, M.A. Proceedings of a Consensus Conference: Pathogen Inactivation: Making Decisions About New Technologies. **Transfusion Medicine Reviews**, v.22, n.1, p.1-34, 2008.

WENDEL, S. A quimioprofilaxia de doenças transmissíveis por transfusão em componentes lábeis hemoterápicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.4, p.275-281, 2002.

WYLLIE, S.; FAIRLAMB, A. H. Refinement of techniques for the propagation of *Leishmania donovani* in hamsters. **Acta Tropica**, v. 97, n. 3, p. 364–369, 2006.

WILSON, M.E.; SANDOR, M.; BLUM, A.M.; YOUNG, B.M.; METWALI, A.; ELLIOTT, D.; LYNCH, R.G.; WEINSTOCK, J.V. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissuespecific replication of *Leishmania chagasi*. **J Immunol.**, v.156, n.6, p.2231–2239, 1996.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araçatuba, 2006.

ZIJLSTRA, E. E.; NUR, Y.; DESJEUX, P.; KHALIL, E.A.G.; EL-HASSAN, A. M.; GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from Sudan. **Trop. Med. Int. Health**, v.6, p.108-113, 2001.

ZIMRIN A.B.; HESS, J.R. Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. **Vox Sang**, v.96, p.93-103, 2009.

Trabalhos Científicos

8. TRABALHOS CIENTÍFICOS

Trabalhos a serem submetidos à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Alterações hematológicas em bolsas de sangue de cães parasitados por *Leishmania infantum chagasi*¹

Soraya Regina Sacco^{2*}, Cesar Rodrigo de Souza Surian², Rodrigo Costa da Silva², Hélio Langoni², Mary Marcondes³ e Raimundo Souza Lopes²

ABSTRACT.- Sacco S.R., Surian, C.R.S., Silva, R.C., Langoni, H., Marcondes, M. & Lopes R.S. 2013. [Hematological abnormalities in blood bags of dogs infected by *Leishmania infantum chagasi*.]

Alterações hematológicas em bolsas de sangue de cães parasitados por *Leishmania infantum chagasi*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-000, Brazil. E-mail: soraya_sacco@rocketmail.com

Providing safety during the transfusion of blood products is of major importance in transfusion medicine; this requires a proper blood to minimize the occurrence of pathogen transmission. The present work aims to characterize the possible hematological and biochemical changes that occur during the 21 days of storage of canine blood samples collected in plastic bags for transfusion. Total blood count, determination of serum sodium and potassium, serological and molecular tests, comparing a group of bags of blood taken from dogs infected with *Leishmania infantum chagasi*, with a group of bags obtained from healthy dogs. The blood of dogs with leishmaniasis stored in bags for transfusion showed anemia, hyperproteinemia, thrombocytopenia, hyperkalemia, decreased pH, 100 % of RIFIs positive (1:640 titer) and conventional PCR positive in 20% of animals, demonstrating the importance of blood count, biochemical tests and laboratory tests for the diagnosis of leishmaniasis in blood donor selection.

INDEX TERMS: dog, leishmaniasis, whole blood.

RESUMO.- É de extrema importância para a medicina transfusional que haja segurança no procedimento de transferência de hemocomponentes, minimizando a ocorrência da transmissão de patógenos. O presente trabalho visa caracterizar as possíveis alterações hematológicas e bioquímicas, ocorridas durante o período de 21 dias de armazenamento das amostras de sangue canino, colhidas em bolsas plásticas para transfusão. Para isto, realizou-se hemograma, determinação da concentração sérica de sódio e potássio, testes sorológicos e moleculares, comparando-se um grupo de bolsas de sangue colhidas de cães parasitados com *L. infantum chagasi*, com um grupo de bolsas de sangue obtidas de cães hígidos. O sangue de cães com leishmaniose armazenado em bolsas para transfusão demonstrou: anemia, hiperproteinemia, trombocitopenia, hipercalemia, diminuição do pH, 100% das RIFIs positivas (título 1:640) e PCR convencional positiva em 20% dos animais, demonstrando a importância do hemograma, exames bioquímicos e dos testes laboratoriais de diagnóstico da leishmaniose na seleção dos doadores.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: cão, leishmaniose, sangue total.

INTRODUÇÃO

Antes da realização de uma doação de sangue o histórico do doador deve ser averiguado, o animal deve ser submetido a um exame físico e a testes de controle laboratoriais. O animal não deve estar sob qualquer tratamento, não deve ter histórico de doença grave ou contato com carrapatos ou outros hospedeiros ou vetores de doenças, além disto, não deve ter sido submetido à transfusão sanguínea anterior e, no caso de fêmeas, não devem estar prenhes (Kristensen e Feldman 2005).

¹Recebido em 12 de janeiro de 2014.

Aceito para publicação em

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Distrito de Rubião Júnior, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

³Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Campus de Araçatuba, SP.

*Autor para correspondência: soraya_sacco@rocketmail.com

Mathur e Samantaray (2004) demonstraram a sobrevivência da *Leishmania* no sangue e seus derivados quando em condições de armazenamento em bancos de sangue humanos. Além disto, anticorpos anti-*Leishmania* foram encontrados em 11 dos 1449 doadores de sangue do distrito de Agrigento, na Sicília, Itália (0,75% dos casos) (Scarlata et al. 2008) e em 44 de 1437 doadores (3,1%) de Baleares, na Espanha (Riera et al. 2008). No entanto, a sorologia para leishmaniose visceral não é realizada rotineiramente entre os doadores de sangue.

Os eritrócitos quando preservados sob condições de banco de sangue sofrem alterações químicas e estruturais conhecidas como “lesões de conservação”, resultando em ruptura celular (Danon et al. 1964).

Segundo Lopes et al. (1995), os leucócitos sofreram decréscimo gradual de sua contagem global, o que ocorre principalmente devido à degranulação de polimorfonucleares ao longo do tempo.

O sangue canino estocado em CPDA-1 apresenta aumento na concentração extracelular de potássio e sódio e diminuição no pH, na concentração plasmática de glicose, na concentração de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e na quantidade de ATP, sugerindo uma redução na capacidade de transporte de oxigênio pelos eritrócitos (Wardrop et al. 1994).

A colheita de sangue, o processamento e as condições de armazenamento podem influenciar de forma significativa a qualidade dos componentes sanguíneos. Desta forma, para a realização de uma transfusão sanguínea em larga escala, são necessárias, não só a disponibilidade dos componentes sanguíneos e sua utilização apropriada, mas também a comprovação da qualidade destes componentes (Zimrin e Hess 2009).

Desta forma, o objetivo do trabalho foi determinar as possíveis alterações nos exames hematológicos e bioquímicos, e dos resultados dos testes laboratoriais de diagnóstico da leishmaniose no sangue canino, obtido de animais hígidos e de cães parasitados com *Leishmania infantum chagasi*, quando conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, durante 21 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Após tricotomia e antisepsia, foram colhidos 450mL de sangue da veia jugular, em bolsas plásticas triplas para transfusão contendo CPDA-1, de 10 cães, adultos, sendo cinco machos e cinco fêmeas, de raças variadas, com pesos corpóreos de aproximadamente 30 kg, clinicamente sadios, com exame físico (parâmetros semiológicos) e hemograma normais, apresentando sorologia e PCR negativos para *Leishmania infantum chagasi*, além de serem de região não endêmica (Itapetininga-SP). Após a colheita, as amostras foram refrigeradas para transporte, sendo mantidas sob refrigeração³ à temperatura de 4°C, durante 21 dias, sendo este grupo denominado de controle (G_c).

Para o grupo leishmaniose (G_i) foram utilizados 10 caninos, adultos, de idade e sexo variável, sem raça definida, naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi*, nove deles sintomáticos e somente um assintomático, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba-SP. A triagem dos animais foi realizada através de exames parasitológicos: punção aspirativa do linfonodo poplíteo e esfregaço de ponta de orelha, com presença de formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos. Além disto, para selecionar os cães, foi utilizado o teste rápido imunocromatográfico Kalazar Detect®⁴, baseado na detecção de anticorpos contra o antígeno rK39 da *Leishmania* sp.

Os animais parasitologicamente positivos e sororeagentes, receberam uma pré-anestesia com acepromazina (0,055 mg/kg/IV), seguida, de uma indução e manutenção anestésica com pentobarbital sódico (15 mg/kg/IV); sendo, então, colhidos 450mL de sangue por punção da veia jugular. Com os cães ainda em plano anestésico, foi aplicada uma ampola de cloreto de potássio a 19,1%, por via intravenosa, em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Senado Federal, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução n°. 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Depois da colheita as amostras foram refrigeradas para transporte, sendo mantidas no refrigerador supracitado, à temperatura de 4°C, durante 21 dias.

Após homogeneização, 100 mL do sangue dos animais, de ambos os grupos, foram transferidos para uma das bolsas satélites, sendo estas numeradas de um a dez. O restante do sangue colhido do grupo controle foi utilizado pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP, Botucatu/SP.

Antes da colheita das bolsas foi colhido 3mL de sangue de cada cão (M0) e posteriormente a este procedimento, amostras de sangue das bolsas satélites foram colhidas após homogeneização em oito momentos diferentes: no dia da colheita (M1), três dias após a colheita (M2), seis dias após a colheita (M3), nove dias após a colheita (M4), 12 dias após a colheita (M5), 15 dias após a colheita (M6), 18 dias após a colheita (M7) e 21 dias após a colheita (M8), para a realização do hemograma utilizou-se as técnicas descritas por Jain (1986), determinação do pH⁵, realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) e da PCR em tempo real (qPCR).

³ Refrigerador Vertical MBR-107D, Sanyo Eletric Co., Ltd.

⁴ Kalazar Detect®, InBios International, Inc. 562 1st Ave. South, Suite 600. Seattle, WA 98104 USA.

⁵ Peagâmetro pH-30 Check-Mite®,

Além disto, as amostras de sangue foram centrifugadas durante cinco minutos a 2000 g. O plasma foi separado em tubos da marca Eppendorf®⁶, e congelado a -20° C, para realização da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), de acordo com Camargo (1966) e determinação da concentração de sódio/potássio por meio de espectrofotometria de chama⁷ nas bolsas durante todos os momentos da primeira fase do experimento.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva, após teste de normalidade observou-se que os parâmetros a serem avaliados possuíam distribuição normal, com exceção das plaquetas, que precisou ser transformada para log.

Modelos de medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) foram usados para comparar as médias de cada variável resposta entre os grupos de estudo e momentos de análise. Uma estrutura de covariância de simetria composta foi usada para modelar a correlação entre medidas repetidas dentro do mesmo animal. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores-P resultantes de comparações múltiplas. Os resultados foram discutidos ao nível de 5% de significância, segundo Sampaio (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores do eritrograma dos caninos doadores das bolsas de sangue (M0) do grupo controle (G_C) encontram-se de acordo com os preconizados por Jain (1986), que considerou normal para cães a contagem de hemácias de 5,5 a 8,5 x 10⁶/μL, a concentração de hemoglobina de 12 a 18 g/dL, hematócrito de 37 a 55%, volume corpuscular médio (VCM) de 60 a 77fL e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de 32 a 36%.

No grupo controle observou-se uma redução significativa (p<0,05) nos valores médios do número total de hemácias durante o período de acondicionamento das bolsas. No primeiro dia (M0) de análise foi encontrado um valor médio de eritrócitos de 6,79±0,52 x 10⁶/μL, que foi reduzido para 5,36±0,33 x 10⁶/μL após 21 dias de conservação (Quadro a). Esta diminuição do número de hemácias no decorrer do período de conservação ocorreu provavelmente devido à hemólise e as alterações morfológicas das células que provavelmente provocadas pelas “lesões de estocagem”. Estes resultados encontram-se de acordo com as alterações encontradas por Danon et al. (1964) e Lopes et al. (1995). Para Zimrin e Hess (2009) a coleta de sangue, o processamento e as condições de armazenamento podem influenciar de forma significativa a qualidade dos componentes sanguíneos. Sendo que a perda da membrana provocada pela formação de microvesículas é um dos fatores que mais contribuem para as lesões que ocorrem nas hemácias (Greenwalt 2006).

No grupo parasitado pela *L. infantum chagasi* houve uma redução do número de hemácias, estes animais se encontravam anêmicos ao início do experimento com valor médio de eritrócitos de 2,90 x10⁶/μL, porém sem diminuição significativa dos eritrócitos ao longo do período de armazenamento (p>0,05) (Quadro a). Quando comparamos ambos os grupos, houve menor contagem de hemácias no G_L (2,55±1,70 x10⁶/μL) do que no G_C (5,24±0,63 x 10⁶) em todos os momentos (p<0,05). As médias de hemoglobina (6,05±3,73g/dL) e hematócrito (15±10%) também foram menores em G_L do que em G_C (12,4±1,25g/dL e 37±3,64%) (p<0,05) (Quadro a).

Os cães com leishmaniose visceral (LV) apresentaram desde o momento M0 anemia, sendo na maioria das vezes macrocítica normocrômica. A patogênese da anemia na LV não está totalmente elucidada, acredita-se que mais de um fator esteja envolvido como: sequestro esplênico de hemácias, diminuição da produção medular, falência renal crônica, perda sanguínea, hemólise e mecanismos imunomediados (Koutinas et al., 1999; Ciaramella e Corona, 2003; Ikeda et al., 2003). De acordo com Michalick e Genaro (2005), na leishmaniose visceral a medula óssea é em geral encontrada com hiperplasia e densamente parasitada. A eritropoese e granulopose são normais no início do processo infeccioso e durante as fases mais adiantadas da infecção, ocorre desregulação da hematopose, caracterizada pela diminuição da produção celular.

Com relação aos índices hematimétricos, VCM e CHCM não diferiram entre os grupos (p>0,05), sendo que no G_C permaneceram dentro dos valores de referência preconizados por Jain (1986) durante todos os momentos avaliados e o G_L na maioria dos momentos demonstrou VCM maior, indicando anemia macrocítica normocrômica. O RDW foi maior (p<0,05) no G_L (19,11±3,69%) do que no G_C (14,26±0,76%), dentro do grupo leishmaniose esta diferença foi significativa entre M0 e os momentos M6, M7 e M8 (p<0,05) (Quadro b).

Estes aumentos do VCM e do RDW indicam que as hemácias eram maiores, o que pode estar associado à anemia regenerativa. Temizel et al. (2011) relataram aumento do VCM e do RDW em cães com leishmaniose visceral devido a anisocitose, associada à anemia regenerativa. O G_L por ser composto por animais com anemia, apresentou resposta de medula óssea com macrocitose. Porém, segundo Koutinas et al. (1999), Ciaramella e Corona (2003) e Ikeda et al. (2003) a ocorrência de alterações hematológicas em cães com leishmaniose visceral é muito frequente, sendo observada na série vermelha, anemia geralmente normocítica e normocrômica arregenerativa em 57 a 94,2% dos animais.

⁶ Eppendorf®, Eppendorf do Brasil Ltda., Rua Ferreira de Araújo 221 conj.15, São Paulo, SP.

⁷ Fotômetro de chama FC 280 Celm (Cia Equipadora de Equipamentos Modernos – Barueri – SP)

A contagem de leucócitos não diferiu entre os grupos, porém houve diminuição de leucócitos significativa ($p < 0,05$) a partir de 15 dias de refrigeração, em ambos os grupos, de $6.629 \pm 2.622/\mu\text{L}$ para 5.414 ± 3.876 após a colheita no G_L , e de $9.971 \pm 2.938/\mu\text{L}$ para $5.943 \pm 1.624/\mu\text{L}$ no G_C (Quadro c).

Esses dados corroboram com as pesquisas realizadas por Lopes et al. (1995), em que o sangue conservado em bolsas para transfusão apresenta uma redução do número de leucócitos no decorrer do tempo.

Com relação às alterações presentes na série leucocitária dos cães do G_L no M0 houve contagem total de leucócitos normais. Kontos e Koutinas (1993) também referem contagem de leucócitos totais normais em cães com LV, porém Anosa e Idowu (1983) descrevem a presença de leucocitose associada com neutrofilia, enquanto Abranches et al. (1991) relatam a ocorrência de leucopenia.

Houve uma redução significativa ($p < 0,05$) nos valores médios do número de plaquetas nos dois grupos ao longo do tempo (Quadro c). Quando comparamos ambos os grupos, houve menor contagem de plaquetas no G_L do que no G_C em todos os momentos ($p < 0,05$).

Os cães com leishmaniose apresentaram trombocitopenia desde o momento M0. Alguns autores relatam que nos cães com leishmaniose a contagem plaquetária pode ser normal (Moreno et al., 1998) enquanto outros reportam a ocorrência de trombocitopenia (Ciaramella e Corona, 2003). As possíveis causas da diminuição do número de plaquetas são a presença de autoanticorpos, imunocomplexos, sequestro esplênico e supressão da medula óssea (Kontos e Koutinas, 1993).

A proteína plasmática total (PPT) foi significativamente maior no G_L ($8,29 \pm 1,24 \text{ g/dL}$) do que no G_C ($6,17 \pm 0,64 \text{ g/dL}$) ($p < 0,05$) (Quadro c).

Segundo Koutinas et al. (1999) uma das anormalidades mais frequentes da leishmaniose visceral é a hiperglobulinemia, devido a uma ativação policlonal de linfócitos B e a produção de anticorpos que ocorre principalmente em cães sintomáticos, porque são os que desenvolvem imunidade humoral maior e pequena ou nenhuma resposta celular. De acordo com Ikeda-Garcia et al. (2003) esta elevação da PPT se faz principalmente devido a hiperglobulinemia, geralmente associada à hipoalbuminemia.

Ocorreu uma redução significativa ($p < 0,05$) do pH sanguíneo em ambos os grupos durante o tempo em que as bolsas permaneceram refrigeradas, indo de 7,04 para 6,98 no G_C e de 7,14 para 6,94 no G_L .

Este dado corrobora com os de Wardrop et al. (1994) e Lopes et al. (1995) que relatam que a retirada do sangue da circulação, resulta na formação de lactato, pois o metabolismo celular devido à metabolização da glicose pela via glicolítica anaeróbica, leva a um acúmulo de íons hidrogênio (H^+), provocando uma diminuição do pH sanguíneo.

Os resultados das dosagens plasmáticas de sódio e potássio do grupo controle e do grupo leishmaniose, desde a colheita (M1) até 21 dias após a conservação (M8) encontram-se no Quadro d.

Não houve diferença estatística entre momentos e grupos em relação ao sódio ($p > 0,05$), porém todas as médias do eletrólito, tanto em G_C quanto em G_L , estavam acima dos valores de referência proposto por Kaneko et al. (2008), que relatam uma faixa variando de 141,1 a 152,3 mEq/L. Isto ocorreu devido a presença do anticoagulante CPDA-1, composto por ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose e adenina (Lanevski e Wardrop 2001).

Em relação a concentração plasmática do potássio houve aumento significativo ($p < 0,05$) ao longo do tempo de refrigeração nas amostras de sangue, porém dentro dos valores de referência propostos por Kaneko et al. (2008), de 4,37 a 5,65 mEq/L. Ocorreu hipercalemia somente no G_L a partir do M7 (média de $5,78 \pm 0,90$ mEq/L).

Portanto para ambos os grupos somente o aumento na concentração plasmática de potássio foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Michael et al. (1975) utilizando sangue humano conservado em bolsas com CPD também relatou aumento de potássio plasmático, descrevendo que este aumento é decorrente da solução preservadora, do tempo de conservação, da redução da atividade da enzima de Na/K ATPase, da temperatura de estocagem e da hemólise que ocorre no sangue durante o período de conservação.

Nas amostras de sangue dos cães do grupo controle não se observou amplificação do DNA de *Leishmania*, como era esperado, já que os animais são oriundos de uma área livre da enfermidade. Das dez amostras colhidas do grupo leishmaniose, em somente duas foi amplificado o DNA do parasita; nos cães de número três (sintomático) e cinco (assintomático). No sangue do primeiro animal o DNA do parasita foi amplificado por PCR convencional durante todo o período de conservação (21 dias), porém no cão de número cinco o DNA foi amplificado apenas logo após a colheita de sangue, não sendo mais identificado a partir do momento do armazenado em bolsa para transfusão.

Resultados negativos na PCR convencional não significam que as bolsas de sangue conservadas não apresentavam o parasita, mas que isto pode ter ocorrido devido à pequena quantidade de parasitas nas bolsas e a menor sensibilidade da técnica de PCR convencional quando comparada à PCR em tempo real. Segundo Pelt-Verkuil (2008) a técnica de PCR em tempo real requer apenas 3 picogramas, o que é material genético cerca de 1000 vezes menor do que a dos ensaios convencionais.

Além disto, o parasita pode não estar naquele momento na circulação sanguínea, estando em outros órgãos como baço, fígado, linfonodos ou medula óssea. Nunes et al. (2007) cita que a escolha do tecido onde será realizada a pesquisa do DNA do parasita influencia a sensibilidade da reação, sendo que nas amostras de sangue

a sensibilidade é menor. Principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele e medula óssea (Miró et al. 2008, Paltrinieri et al. 2010).

Dependendo da fase da doença, encontra-se o parasita em diferentes locais, sendo a maioria dos animais sintomáticos, a maior probabilidade era de encontrá-lo em órgãos linfoides, com baixa parasitemia. Isto justifica uma PCR negativa no sangue de cães com sinais e sintomas clínicos da leishmaniose.

A qPCR detectou o DNA do parasita em todas as amostras do animal sintomático (bolsa três) e até em M3, com 9 dias de refrigeração da bolsa de sangue, do cão assintomático (bolsa cinco). As cargas parasitárias da bolsa três foram 43,04/ μL em M0, 22,95/ μL em M1, 26,10/ μL em M2, 17,34/ μL em M3, 26,00/ μL em M4, 19,69/ μL em M5, 8,47/ μL em M6, 2,29/ μL em M7 e 3,42/ μL em M8. As cargas parasitárias da bolsa 5 foram 10,93/ μL em M0, 5,79/ μL em M1, 3,19/ μL em M2 e 1,67/ μL em M3.

A qPCR foi mais sensível que a PCR convencional, que só tinha detectado DNA da *L. infantum chagasi* no momento zero do cão sem sintomas da enfermidade. Segundo Mortarino et al. (2004) a técnica de PCR em tempo real (qPCR) é um método avançado que pode detectar níveis extremamente baixos de parasitas. Ramos et al. (2012) compararam as técnicas de PCR convencional e tempo real utilizando amostras de medula óssea (MO), linfonodos e baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum chagasi*, sintomáticos e assintomáticos, observando que a qPCR amplificou o DNA das leishmanias de 100% das amostras dos animais sem sintomas, enquanto a PCR convencional detectou o parasita em apenas 20% destes animais.

Pode-se dizer que houve uma diminuição da carga parasitária durante o período em que as bolsas foram mantidas sob refrigeração em ambos as bolsas, três e cinco, chegando a zerar a partir de M4 na bolsa cinco.

Grogl et al. (1993) demonstraram que a *L. donovani* foi capaz de sobreviver por pelo menos 25 dias de conservação.

O risco de transmissão da leishmaniose pela transfusão sanguínea é eminente quando cães parasitados assintomáticos são usados como doadores, principalmente nas transfusões que envolvem sangue total e concentrado de hemácias, nas quais as células mononucleares podem estar presentes.

Foi realizado na seleção dos cães do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), o teste rápido imunocromatográfico Kalazar Detect®⁸, baseado na detecção de anticorpos contra o antígeno rK39 da *Leishmania* sp, sendo todos os cães selecionados positivos para este exame durante a triagem dos animais no CCZ de Araçatuba-SP.

Teste semelhante está sendo recomendado pelo Ministério da Saúde para o inquérito canino como técnica de triagem (Brasil 2011). Os exames comerciais de imunocromatografia utilizam como antígeno o rK39 e têm sido úteis no diagnóstico de LV tanto em seres humanos quanto em cães, suas vantagens são simplicidade de uso, rapidez e praticidade, além da ausência de reação cruzada entre *Trypanosoma cruzi* e *L. infantum chagasi* (Silva et al. 2012).

Além disto, foi realizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* nas bolsas de sangue a cada três dias para acompanhamento do título de anticorpos do sangue das respectivas bolsas (M1 a M8).

Todas as amostras apresentavam títulos de 1:640, mantendo-se durante os 21 dias do experimento em todos os momentos avaliados. Isto indica que os cães do grupo leishmaniose, em sua maioria sintomáticos, tinham títulos elevados, que se mantiveram durante o período de conservação do sangue. Segundo Ferrer (2002), animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*. Para Paltrinieri et al. (2010) em cães a soroconversão ocorre, em média, cinco meses após a infecção, podendo ocorrer entre um e 22 meses. E para Ferrer (2002) os títulos permanecem elevados por, pelo menos, dois anos, indicando que os animais do G₁ tinham a infecção há mais tempo. De acordo com Paltrinieri et al. (2010) os títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, obtidos por meio de exames sorológicos, nem sempre estão associados com a severidade dos sintomas e devem ser interpretados com cautela, sendo que títulos baixos geralmente são observados em cães assintomáticos infectados.

Em situações de banco de sangue, anticorpos anti-*Leishmania* foram encontrados em 11 dos 1449 doadores de sangue do distrito de Agrigento, na Sicília, Itália (0,75% dos casos) (Scarlata et al., 2008) e em 44 dos doadores de sangue de 1437 (3,1%) do Baleares, na Espanha (Riera et al., 2008). No entanto, a sorologia para leishmaniose não é feita de rotina entre os doadores de sangue.

Segundo Cardo et al. (2006) existem poucos casos publicados de transmissão transfusional acidental de *Leishmania* por vários motivos, dentre eles, a ocorrência de transmissão predominantemente em áreas endêmicas, tornando difícil provar que a transmissão ocorreu pela transfusão. Outro fator é que a infecção pode ser assintomática em indivíduos com sistemas imunológicos sadios. Além disto, Harms et al. (2003) discutem que a dificuldade é imposta pelo fato de que o tempo desde o surgimento dos sintomas até o diagnóstico pode variar de um a 16 meses.

Segundo Giger et al. (2002), apenas hospitais veterinários em grandes centros urbanos, faculdades de medicina veterinária e algumas clínicas privadas têm acesso aos doadores de sangue permanentes. Estes animais geralmente são vacinados contra as principais enfermidades virais que afetam os cães e são submetidos a

⁸ Kalazar Detect®, InBios International, Inc. 562 1st Ave. South, Suite 600. Seattle, WA 98104 USA.

exames sorológicos periódicos para detecção de dirofilariose e hemoparasitoses transmitidas por carrapatos, como a babesiose e erliquiose.

Desta forma, os cães do grupo leishmaniose não serviriam como doadores, somente pela observação das alterações feitas no hemograma. O hemograma é um exame de triagem, de fácil realização, que deveria ser feito em todos os animais candidatos a doadores de sangue, já que a sorologia e a PCR são análises mais elaboradas, que demandam tempo, e que seriam inviáveis em um caso de emergência, que é um procedimento de transfusão de sangue. Além disto, a punção aspirativa por agulha fina também se trata de um método eficaz na triagem de doadores de regiões endêmicas para LV.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, nas condições em que foi realizado, nos permitem concluir que o hemograma e os testes de diagnóstico laboratorial da leishmaniose como punção aspirativa por agulha fina e sorologia são exames indispensáveis de triagem para cães doadores de sangue.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao apoio da FAPESP no auxílio à pesquisa e a CAPES pela disponibilização da bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- Abranches, P.; Santos-Gomes, G.; Rachamim, N.; Campino, L.; Schnur, L.F. & Jaffe, C.L. 1991. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 13(5):537-550.
- Anosa, V.O. & Idowu, A.L. 1983. The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B*. 30(8):600-608.
- Brasil. 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica nº 48 /2011. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_48_2011_diagnostico_lvc_19_9_2011.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2013.
- Camargo, M. E. 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 8:227-234.
- Cardo, L.J.; Rentas, F.J.; Ketchum, L.; Salata, J.; Harman, R.; Melvin, W.; Weina, P.J.; Mendes, J.; Reddy, H. & Goodrich, R. 2006. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani infantum* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox Sanguinis*. 90:85-91.
- Ciaramella, P. & Corona, M. 2003. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*.25(5):358-368.
- Danon, D., Frei, Y.F. & Rimon, A. 1964. Simple rapid osmotic fragility test proposed as a routine in blood banks. *Transfusion*, Philadelphia, v.4, n.5, p. 339-342,
- Ferrer, L. The pathology of canine leishmaniasis. 2002. In: PROCEEDINGS OF SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Salamanca: Intervet International bv. p.21-24.
- Greenwalt, T.J. 2006. The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion*.46:143-152.
- Giger, U.; Oakley, D. A.; Owens, S. D. & Schantz, P. 2002. *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion*.42:381-383.
- Harms, G.; Schonian, G. & Feldmeier, H. 2003. Leishmaniasis in Germany. *Emerg Infect Dis*. 9:872-875.
- Ikeda-Garcia, F. A. 2003. Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica de cães, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos a diferentes protocolos de tratamento. 2003. 184f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.
- Jain, N. C. 1986. *Schalm's Veterinary Hematology*. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Kaneko, J. J.; Harvey, J. W. & Bruss, M. L. 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego: Academic Press, 932p.
- Kontos, V.J. & Koutinas, A.F. 1993. Old World Canine Leishmaniasis. *Compendium on Continuing Education Small Animal*15(7): p.949-959.
- Kristensen, A.T. & Feldman, B.F. 2005. Bancos de sangue e medicina transfusional. In: Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária Doenças do cão e do gato*. p. 497-517.5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Lopes, R.S., Kohayagawa, A., Dantas Filho, J., Pereira, A.M. & Curi, P.R. 1995. Alterações hematológicas e bioquímicas em sangue total de equino, conservado para transfusão, em bolsas plásticas contendo ACD-F. Rev. Univ. Rural, Sér. Ciênc. da Vida. 17(2): 91-95.
- Mathur, P. & Samantaray, J.C. 2004. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. Transfusion Medicine. 1:319-321,
- Michael, J.M.; Dorner, I.; Burns, D.; Ladenson, J.H. & Sherman, L.A. 1975. Potassium load in CPD-preserved whole blood and two types of packed red blood cells. Transfusion.15(2): 144-149.
- Michalick, M.S.M. & Genaro, O. 2005. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11. ed. São Paulo: Atheneu,
- Miró, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Oliva, G. & Baneth, G. 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two, Trends in Parasitology. 24:371-377.
- Mortarino, M.; Franceschi, A.; Mancianti, F.; Bazzocchi, C.; Genchi, C. & Bandi, C. 2004. Quantitative PCR in the Diagnosis of *Leishmania*. Parasitology.46:163-167.
- Nunes, C. M.; Dias, A. K. K.; Gottardi, F. P.; Paula, H. B. De; Azevedo, M. A. A De; Lima, V. M. F. De & Garcia, J. F. 2007. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.16(1):5-9.
- Paltrinieri, S.; Solano-Gallego, L.; Fondati, A.; Lubas, G.; Gradoni, L.; Castagnaro, M.; Crotti, A.; Maroli, M.; Oliva, G.; Roura, X.; Zatelli, A. & Zini, E. 2010. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association.236:1184-1191.
- Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A. & Hays, J. P. 2008. Principles and technical aspects of PCR amplification, Springer, 332p.
- Riera, C.; Fisa, R.; López-Chejade, P.; Serra, T.; Girona, E.; Jiménez, M.; Muncunill, J.; Sedeño, M.; Mascaró, M.; Udina, M.; Gállego, M.; Carrió, J.; Forteza, A. & Portús, M. 2008. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). Transfusion.48:1383-1389.
- Sampaio, I. B. M. 1998. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 221p.
- Scarlata, F.; Vitale, F.; Saporito, L.; Reale, S.; Vecchi, V.L.; Giordano, S.; Infurnari, L.; Occhipinti, F. & Titone, L. 2008. Asymptomatic *Leishmania infantum/chagasi* infection in blood donors of western Sicily. Trans R Soc Trop Med Hyg.102:394-396.
- Silva, J.G.L.; Silva, T.M.; Peloso, E.F.; Machado-Coelho, G.L.L.; Mayrink, W.; Ariosa, M.C.F.; Silva, P.M.F. & Marques, M.J. 2012. Comparison among three Polymerase Chain Reaction assays on detection of DNA from *Leishmania* in biological samples from patients with american cutaneous leishmaniasis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 45(2):257-259.
- Wardrop, K. J., Young, J. & Wilson, E. 1994. An *in vitro* evaluation of storage media for the preservation of canine packed red blood cells. Vet Clin Pathol. 23(3):83-88.
- Zimrin A.B. & Hess, J.R. 2009. Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. Vox Sang.96:93-103.

Quadro a. Estatística descritiva para número de hemácias, determinação da hemoglobina e do hematócrito em bolsas de sangue conservadas por 21 dias, provenientes de cães hígidos (grupo controle - G_C) e de cães com leishmaniose visceral (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

Grupo	e	Hemácias (x10 ⁶ /μL)			Hemoglobina (g/dL)			Hematócrito (%)		
		Média	Media na	DP	Média	Media na	DP	Média	Media na	DP
G _C	M0	6,79 ^{aA}	6,73	0,52	16,75 ^{Aa}	16,90	1,19	50,14 ^{aA}	50,00	4,81
	M1	5,24 ^{bA}	5,24	0,63	12,40 ^{Ba}	12,50	1,25	36,57 ^{bA}	37,00	3,64
	M2	5,17 ^{bA}	5,41	0,74	12,35 ^{bA}	12,60	1,75	35,14 ^{bA}	37,00	4,77
	M3	5,03 ^{bA}	5,02	0,59	12,55 ^{Ba}	12,60	1,67	34,85 ^{bA}	35,00	4,05
	M4	5,19 ^{bA}	5,43	0,88	12,44 ^{Ba}	12,80	1,62	35,42 ^{bA}	37,00	4,19
	M5	5,23 ^{bA}	5,30	0,43	12,24 ^{bA}	12,40	1,69	35,28 ^{bA}	37,00	3,81
	M6	5,10 ^{bA}	5,34	0,69	12,18 ^{Ba}	12,30	1,89	33,14 ^{bA}	34,00	5,17
	M7	5,27 ^{bA}	5,25	0,41	12,52 ^{bA}	12,80	1,81	34,00 ^{bA}	35,00	3,78
	M8	5,36 ^{bA}	5,41	0,33	12,70 ^{bA}	13,00	1,75	34,57 ^{bA}	35,00	3,10
G _L	M0	2,90 ^B	3,35	1,28	6,47 ^B	6,20	2,79	21,57 ^B	20,00	9,71
	M1	2,55 ^B	2,29	1,70	6,05 ^B	5,10	3,73	16,85 ^B	15,00	10,0

M2	2,18 ^B	2,12	1,49	5,38 ^B	4,60	3,37	17,00 ^B	15,00	9,86
M3	2,43 ^B	2,39	1,19	5,84 ^B	5,10	2,51	15,71 ^B	18,00	6,94
M4	1,92 ^B	1,84	1,02	4,71 ^B	4,50	2,16	14,28 ^B	13,00	8,47
M5	2,34 ^B	1,95	1,94	6,01 ^B	4,70	4,53	17,85 ^B	11,00	13,6
M6	2,02 ^B	2,37	1,09	5,05 ^B	5,40	2,30	14,85 ^B	14,00	6,56
M7	2,40 ^B	2,06	1,50	5,71 ^B	4,40	2,99	17,14 ^B	14,00	8,29
M8	2,53 ^B	2,28	1,54	5,75 ^B	4,60	2,95	17,00 ^B	14,00	8,50

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. (letras minúsculas dentro do mesmo grupo e maiúsculas entre os grupos).

Quadro b. - Índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) dos cães do grupo controle (G_c) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

Grupos e Momentos	VCM (fL)			CHCM (%)			RDW (%)			
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
G_c	M0	73,29	74,00	3,68	33,29	33,00	1,11	14,31 ^A	14,20	0,35
	M1	69,57	69,00	2,37	33,57	34,00	1,27	14,26 ^A	14,50	0,76
	M2	68,08	68,39	3,00	35,17	35,68	1,24	14,26 ^A	14,50	0,72
	M3	69,34	69,53	3,55	35,97	36,00	1,22	14,21 ^A	14,40	0,74
	M4	68,96	68,26	5,81	35,11	34,59	1,42	14,84 ^A	15,10	0,51
	M5	67,30	68,14	2,65	34,60	34,12	1,41	14,97 ^A	15,20	0,63
	M6	64,74	65,93	3,44	36,88	37,65	2,35	14,93 ^A	14,90	0,72
	M7	64,32	66,09	4,15	36,75	37,65	2,08	14,83 ^A	15,10	0,88
M8	64,45	64,29	3,75	36,65	37,95	3,07	15,14 ^A	15,70	1,25	
G_L	M0	75,97	75,29	12,12	30,53	30,94	4,76	18,47 ^{abB}	16,50	4,18
	M1	70,76	63,87	13,91	35,99	35,43	4,55	19,11 ^{abB}	17,30	3,69
	M2	85,32	75,63	17,15	31,12	30,67	1,56	19,36 ^{abB}	17,00	4,02
	M3	65,92	64,52	6,72	36,32	36,83	5,37	18,91 ^{abB}	17,10	2,99
	M4	73,50	73,26	16,25	36,46	40,77	8,00	19,37 ^{abB}	17,40	3,54
	M5	88,64	77,87	37,93	34,67	33,86	6,76	19,87 ^{abB}	18,00	3,73
	M6	83,04	75,53	25,35	34,10	34,29	5,11	20,03 ^{bbB}	18,10	3,53
	M7	80,70	73,03	23,36	32,50	33,08	4,56	19,53 ^{bbB}	18,30	3,61
M8	75,14	67,89	21,02	33,59	33,08	3,82	19,53 ^{bbB}	18,30	3,61	

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. (letras minúsculas dentro do mesmo grupo e maiúsculas entre os grupos).

Quadro c. - Contagem de plaquetas, leucócitos totais e determinação da proteína total plasmática dos cães do grupo controle (G_c) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

Grupos e Momentos	Plaquetas (/μL)			Leucócitos (/μL)			Proteínas totais (g/dL)			
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
G_c	M0	339429 ^{aA}	332000	77884	9971 ^a	10500	2938	7,66 ^{aA}	7,80	0,57
	M1	132714 ^{bbB}	113000	37990	7571 ^a	7300	2466	6,17 ^{ba}	5,80	0,64
	M2	121143 ^{bbB}	118000	45594	7314 ^a	6900	2378	5,74 ^{ba}	5,80	0,71
	M3	110714 ^{bbB}	114000	36696	7457 ^a	8000	2170	5,71 ^{ba}	5,60	0,77
	M4	108786 ^{bbB}	112000	36665	7329 ^a	8000	2150	5,69 ^{ba}	5,60	0,82
	M5	106571 ^{bbB}	93000	41400	6786 ^a	6600	2269	5,61 ^{ba}	5,40	0,84
	M6	106000 ^{bbB}	95000	43274	6257 ^b	6800	1780	5,74 ^{ba}	5,80	0,73
	M7	131000 ^{bbB}	94000	65038	5800 ^b	5400	1721	5,74 ^{ba}	5,80	0,73
M8	134429 ^{bbB}	102000	75791	5943 ^b	6100	1624	5,94 ^{ba}	6,00	0,71	
G_L	M0	70857 ^B	65000	27811	6629	6900	2622	9,83 ^{abB}	9,70	1,42

M1	75429 ^B	42000	58682	4243	4100	1190	8,29 ^{bb}	7,80	1,24
M2	74429 ^B	33000	73057	7000	5600	4696	8,26 ^{bb}	7,80	1,34
M3	74571 ^B	33000	80775	6914	5000	3806	8,29 ^{bb}	7,80	1,33
M4	88286 ^B	42000	96557	6314	5200	4470	8,39 ^{bb}	8,00	1,38
M5	96143 ^B	53000	91226	7771	6800	5997	8,40 ^{bb}	8,20	1,38
M6	87857 ^B	49000	101518	6543	5000	4711	8,51 ^{bb}	7,80	1,29
M7	95571 ^B	60000	104739	5414	3900	3876	8,33 ^{bb}	7,90	1,39
M8	97571 ^B	67000	106767	5414	3900	3876	8,24 ^{bb}	7,90	1,52

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. (letras minúsculas dentro do mesmo grupo e maiúsculas entre os grupos).

Quadro d. - Determinação da concentração plasmática de sódio e potássio do sangue das bolsas dos cães do grupo controle (G_C) e do grupo leishmaniose (G_L) nos momentos M0 (antes da colheita), M1 (imediatamente após a colheita), M2 (3 dias de refrigeração), M3 (6 dias), M4 (9 dias), M5 (12 dias), M6 (15 dias), M7 (18 dias) e M8 (21 dias de refrigeração).

Grupos e Momentos	Sódio (mEq/L)				Potássio (mEq/L)				
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão	
G _C	M1	190,14	191,00	13,17	4,98	3,36 ^a	3,40	0,41	0,16
	M2	202,86	196,00	36,55	13,82	4,04 ^{-ab}	4,10	0,72	0,27
	M3	222,71	203,00	55,39	20,94	4,96 ^{-ab}	4,70	1,17	0,44
	M4	192,14	189,00	16,30	6,16	4,61 ^{-ab}	4,60	0,37	0,14
	M5	211,43	191,00	40,64	15,36	5,17 ^b	5,00	0,56	0,21
	M6	202,29	196,00	19,55	7,39	5,07 ^{bc}	5,00	0,58	0,22
	M7	217,29	220,00	31,57	11,93	5,59 ^{bc}	5,20	1,20	0,45
	M8	205,57	201,00	10,45	3,95	5,26 ^c	5,20	0,70	0,27
G _L	M1	200,74	199,00	17,96	5,68	4,00 ^a	3,90	0,41	0,43
	M2	205,65	201,00	56,05	23,20	4,14 ^{-a}	4,00	0,69	0,25
	M3	207,20	205,00	45,20	15,73	4,63 ^{-a}	4,80	0,98	0,50
	M4	200,14	192,00	28,50	10,10	4,65 ^{-a}	4,50	0,45	0,24
	M5	208,70	197,00	34,91	16,95	4,99 ^b	5,00	0,53	0,32
	M6	205,98	202,00	27,55	10,22	5,10 ^b	5,05	0,62	0,12
	M7	217,50	217,00	55,00	10,41	5,78 ^{bc}	5,50	0,90	0,65
	M8	215,63	214,00	15,78	4,50	5,92 ^c	5,30	0,87	0,34

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Ação da luz ultravioleta e da riboflavina na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado em bolsas para transfusão¹

Soraya Regina Sacco Surian^{2*}, Cesar Rodrigo de Souza Surian², Rodrigo Costa da Silva², Hélio Langoni², Mary Marcondes³ e Raimundo Souza Lopes²

ABSTRACT.- Surian S.R.S., Surian, C.R.S., Silva, R.C., Langoni, H., Marcondes, M. & Lopes R.S. 2013. [Action of ultraviolet light and riboflavin in the inactivation of *Leishmania infantum chagasi* in canine blood stored in bags for transfusion.]

Ação da luz ultravioleta e da riboflavina na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado em bolsas para transfusão. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-000, Brazil. E-mail: soraya_sacco@rocketmail.com

The present work aims to investigate the treatment efficiency of canine blood samples, collected in plastic bags for transfusion with ultraviolet light and riboflavin in inactivating *Leishmania infantum chagasi*. For this, the parasitized canine blood was subjected to the treatment with riboflavin and UV light for 30 to 45 minutes and inoculated in hamsters. The parasitized blood has not lost the ability to produce infection after the storage period. Hamsters inoculated with blood treated with riboflavin and UV light for 30 and 45 minutes were PCR positive, although not presenting clinical signs and symptoms of the disease. The qPCR can identify that the combination of riboflavin with UV light reduced the number of *Leishmania*, reducing the parasitic load, but did not completely eliminate parasites

INDEX TERMS: dog, leishmaniasis, UV light, vitamin B₂, whole blood.

RESUMO.- O presente trabalho visa investigar a eficiência do tratamento de amostras de sangue canino, colhidas em bolsas plásticas para transfusão com luz ultravioleta e riboflavina na inativação de *Leishmania infantum chagasi*. Para isto, o sangue canino parasitado foi submetido ao tratamento com riboflavina e luz UV por 30 e 45 minutos e inoculado em hamsters. O sangue parasitado não perdeu a capacidade de produzir a infecção após o período de armazenamento. Os hamsters inoculados com sangue tratado com riboflavina e luz UV por 30 e 45 minutos apresentaram PCR positiva, apesar de não apresentarem sinais e sintomas clínicos da enfermidade. Na qPCR pode-se identificar que a associação da riboflavina com a luz UV reduziu o número de leishmanias, diminuindo a carga parasitária, porém não eliminou completamente os parasitas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: cão, leishmaniose, luz UV, vitamina B₂, sangue total.

INTRODUÇÃO

A transmissão de enfermidades infecciosas através da transfusão sanguínea é bem documentada em Medicina Veterinária. A triagem dos doadores para as principais doenças que podem ser veiculadas pelo sangue é de extrema importância para não piorar a condição clínica do receptor. Existe um risco muito elevado de transmissão de agentes infecciosos, devido ao longo período de incubação e persistência da enfermidade sem sinais clínicos evidentes em animais infectados, existindo assim a probabilidade destes agentes permanecerem viáveis no sangue estocado (Owens et al. 2001, Reine 2004, Freitas et al. 2005).

Os procedimentos de inativação de agentes patogênicos têm uma ampla atividade antimicrobiana, preservando todos os componentes do sangue e representando uma abordagem proativa para a segurança do sangue. O desafio de inativação de patógenos é reduzir ao máximo o maior número de potenciais agentes patogênicos do sangue, sem comprometer significativamente os constituintes celulares ou proteínas ou introduzir alguma toxicidade nova, carcinogenicidade, ou teratogenicidade (Bryant e Klein 2007).

As mais promissoras abordagens para a tentativa de inativação, até o momento, são métodos que têm por alvo o impedimento da replicação do patógeno no genoma de vírus, bactérias e protozoários (tratamento com riboflavina e luz ultravioleta, azul de metileno e Psoralen). Os estudos *in vitro* foram realizados para garantir a sua segurança em termos de toxicidade para as células e/ou para os pacientes (Wendel 2002).

¹Recebido em 14 de janeiro de 2014.

Aceito para publicação em

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Distrito de Rubião Júnior, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

³Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Campus de Araçatuba, SP.

*Autor para correspondência: soraya_sacco@rocketmail.com

O tratamento de bolsas de sangue para transfusão através da associação riboflavina (RB) e luz UV tem se mostrado muito eficaz em estudos *in vitro* (Goodrich et al. 2000, Corbin, 2002). O conhecimento do perfil toxicológico da riboflavina e de seus derivados, sua grande utilização na dieta, assim como o uso de um foto sintetizador eficaz na inativação de patógenos, torna este procedimento promissor para ser utilizado no sangue e seus derivados (Reddy et al. 2008, Reikvam et al. 2010).

Sua ação como agente inativador em componentes lábeis tem sido extensamente estudada, com reduções de 4 a 6 log nos títulos de vírus (intra e extracelulares) e bactérias, sem efeitos consideráveis sobre as plaquetas ou fatores de coagulação (Wendel 2002). Cardo et al. (2006), utilizando riboflavina e luz UV, obteve uma redução de 5 log de *Leishmania donovani infantum* em cinco de seis unidades de plasma e de 7 log na unidade restante. Além disto, demonstrou uma redução de 5 log de *Leishmania* em cinco de seis unidades de plaquetas, e de 6 log na unidade restante.

A riboflavina (vitamina B₂) participa em várias reações de óxido-redução celular, além de possuir importante papel na estrutura de várias enzimas. Por ser altamente solúvel, penetra rapidamente na célula. Desde a década de 60 já se conhecia a sua ação inativadora na presença de luz visível ou UV. Possui capacidade de agir como um fotossensibilizador causando danos seletivos aos ácidos nucleicos, após exposição à luz UV, sem se ligarem à células e proteínas (Marschner e Goodrich 2011). A RB se associa aos ácidos nucleicos e intercede um processo de transferência de elétrons oxigênio-independente que leva à modificação dos ácidos nucleicos, principalmente sobre os resíduos de guanina, bem como a conversão da riboflavina ao seu fotoproduto lumichromo (Speek e Rosenkranz 1979).

A utilização de luz UV, sem a adição de riboflavina, causa dano reversível ao ácido nucleico. Porém, os danos induzidos pela RB são irreversíveis, pois os processos de replicação e reparação são prejudicados devido à modificação da base guanina (Kumar et al. 2004). O número de lesões ocorrem com uma frequência de aproximadamente uma em cada 350 pares de base (bp) (Goodrich et al. 2006). O dano em ácido nucleico pode ser menos frequente em DNA mitocondrial, conforme mostrado por Janetzko et al. (2007).

O presente trabalho investigou a eficácia do tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado, evitando que este agente patogênico possa ser transmitido em procedimentos de transfusão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 caninos, adultos, de idade e sexo variável, sem raça definida, naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi*, nove deles sintomáticos e somente um assintomático, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba – SP.

A triagem dos animais foi realizada através de exames parasitológicos: punção aspirativa do linfonodo poplíteo e esfregaço de ponta de orelha, com presença de formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos. Além disto, para selecionar os cães, foi utilizado o teste rápido imunocromatográfico Kalazar Detect®³, baseado na detecção de anticorpos contra o antígeno rK39 da *Leishmania* sp.

Os animais parasitologicamente positivos e sororeagentes, receberam uma pré-anestesia com acepromazina (0,055 mg/kg/IV), seguida, de uma indução e manutenção anestésica com pentobarbital sódico (15 mg/kg/IV); sendo, então, colhidos 450mL de sangue por punção da veia jugular. Com os cães ainda em plano anestésico, foi aplicada uma ampola de cloreto de potássio a 19,1%, por via intravenosa, em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Senado Federal, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução n°. 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Depois da colheita as amostras foram refrigeradas para transporte, sendo mantidas no refrigerador à temperatura de 4°C, durante 21 dias.

No protocolo de fotoinativação utilizado as hemácias foram combinadas com uma solução de riboflavina a 500µM/L em solução salina 0,9%, obtendo-se uma concentração final de 50 µM, com pH ajustado para 4,0 a 5,0, sendo preparada e autoclavada em frasco âmbar, conforme descrito por Ruane et al. (2004) e Cardo et al. (2007).

Para avaliar a transmitância das bolsas a serem utilizadas durante o procedimento foram usadas duas marcas distintas (JP®⁴ e Fresenius Kabi®⁵ – FK) de bolsa tripla para transfusão, sendo medidas as transmitâncias da bolsa principal (hemácias) e das satélites (bolsas para plasma e plaquetas). O material que permitiu maior passagem da luz foi a bolsa de plasma da marca Fresenius Kabi®, sendo esta a selecionada para o procedimento de fotoinativação no presente trabalho.

³ Kalazar Detect®, InBios International, Inc. 562 1st Ave. South, Suite 600. Seattle, WA 98104 USA.

⁴ JP Indústria Farmacêutica S.A. Av. Presidente Castelo Branco, 999. Ribeirão Preto - SP Brasil.

⁵ Fresenius Kabi Brasil Ltda. Av. Marginal Projetada, 1652. Fazenda Tamboré Barueri – SP.

As bolsas foram fracionadas, e 100mL de sangue total após a adição da RB foram colocadas no iluminador DNA Workstation⁶ até atingir 60J/mL (Rentas et al., 2007). A mistura foi exposta à luz UV na faixa de 365nm, conforme indica Goodrich, 2010. O tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 35 (tratamento 1 - TT1) e 45 minutos (tratamento 2 - TT2).

Seltsam e Müller (2011) obtiveram melhores resultados na irradiação de luz UV quando, durante o procedimento, a bolsa de sangue estava sob agitação, por isto, durante o procedimento a bolsa esteve sob um homogeneizador de bolsa de sangue tipo gangorra modelo HOMBOL-061, Benfer⁷.

Para detectar as bolsas de sangue positivas a serem utilizadas no experimento, foi realizado PCR convencional das bolsas colhidas dos animais do grupo leishmaniose.

O DNA foi extraído de 200 µL do sangue coletado das bolsas, utilizando-se o IllustraTM Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®), conforme instruções do fabricante, sendo posteriormente armazenado em microtubos estéreis livres de DNAses e RNAses e mantido a -20oC até a realização da técnica de PCR.

As reações de PCR foram realizadas em microtubo de 0,5mL com volumes totais de 25 µL contendo tampão de reação 10mM Tris HCl pH 8,0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 10µM de cada *primer*, 0,2 unidades de *Taq* Platinum (Invitrogen) e 10ng de DNA genômico. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®) com o seguinte perfil de ciclagem: desnaturação de 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos e uma extensão final de 70°C durante 10 minutos. Para amplificação foram utilizados os *primers*:

LC14 250-273 (5'- CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG-3')

LC15 416-439 (5'-TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA-3')

Estes *primers* foram desenhados e testados no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), por meio de análise nos programas Primer3 e PrimerBLAST, direcionados para o gene "*Leishmania infantum chagasi* kinetoplast minicircle DNA", AF169138.1 disponível [GenBank]. Nessa reação, o produto resultante apresentou 190 pares de base (pb), que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *L. infantum chagasi*.

Os produtos amplificados foram identificados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Sendo utilizados como controles positivos DNAs da cepa ATTC amplificada de *L. infantum chagasi*, e como negativos (água MilliQ + MIX-PCR). A visualização das bandas no gel e a fotodocumentação foram realizadas em transiluminação com luz ultravioleta (296 nm).

Após a análise dos resultados foi selecionada a bolsa de sangue número três, onde foi amplificado o DNA do parasita por PCR convencional durante todo o período de conservação (21 dias), com o objetivo de utilizar a bolsa do animal com a maior carga parasitária (43,04/µL). O animal apresentava-se sintomático no momento da colheita, com áreas de alopecia ao redor dos olhos, onicogribose e caquexia.

Após a adição da riboflavina (RB) e após os tratamentos pela luz UV por 30 minutos (TT1) e 45 minutos (TT2) as amostras mantiveram-se positivas na PCR, sendo, portanto necessária à inoculação em hamster.

Foram utilizados 28 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos, adultos, que receberam por via intraperitoneal 3,5 mL do sangue (Freitas et al., 2005) obtido de cão com leishmaniose; sendo sete animais inoculados com o sangue sem tratamento (grupo leishmaniose: G_L); sete com sangue após a adição de riboflavina (grupo riboflavina: G_{RB}); sete com sangue após tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta por 30 minutos (grupo tratado I: G_{T30}) e sete com sangue após tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta por 45 minutos (grupo tratado II: G_{T45}).

Os animais foram mantidos durante 120 dias em caixas para hamsters⁸ no Infectório da área de Zoonoses da FMVZ, UNESP, Botucatu-SP, recebendo água e ração Presence® linha roedores⁹ *ad libitum*.

Os hamsters inoculados foram acompanhados clinicamente e sacrificados decorridos 120 dias, utilizando protocolo de Hochman et al. (2003).

O sangue dos hamsters foi colhido por punção intracardíaca para realização dos exames sorológicos e moleculares. Baço, fígado e medula óssea foram extraídos após a necropsia, para confecção de lâminas pelo método de aposição de tecido (*imprinting*), e subsequente coloração pela técnica de Giemsa para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp, sendo consideradas positivas caso apresentassem pelo menos uma forma amastigota fagocitada ou livre, ou negativa caso a forma amastigota não fosse observada.

Em seguida os órgãos (baço, fígado e osso) foram macerados, sendo a medula óssea obtida após a maceração do osso externo, e foi realizada extração do DNA para realização da PCR no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO).

O DNA foi extraído de 200 µL do sangue coletado, utilizando-se o IllustraTM Blood Genomic Prep Mini Spin Kit, e de amostras de tecido dos hamsters (baço e fígado) utilizando-se IllustraTM Tissue & Cells Genomic

⁶ Locus Biotecnology – Locus, São Paulo – SP.

⁷ Benfer Produtos para laboratórios. R. Padre Agostinho Poncet, 74. São Paulo – SP.

⁸ Caixa de polipropileno. Elo's Com. e Repres. de Aparelhos para Laboratórios de Biotérios Ltda.

⁹ Presence Nutrição Animal. Av. Professor Benedito Montenegro S/Nº. Paulínia - São Paulo Bairro Betel. 13140-000.

Prep Mini Spin Kit11. As amostras de osso foram extraídas utilizando-se o kit Multi-Source Axygen com prévia etapa de maceração em nitrogênio líquido. O material genético extraído foi armazenado sob congelamento a -20°C, até o momento da realização das provas biomoleculares. Controles positivo (DNAs da cepa ATTC amplificada de *L. infantum chagasi*) e negativos (água MilliQ) foram adicionados a cada bateria de extração.

Os primers LC14 e LC15 utilizados foram desenhados e testados no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), por meio de análise nos programas Primer3 e PrimerBLAST, direcionados para amplificar um fragmento de 190 pares de base (pb) do segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *Leishmania infantum chagasi*, AF169138.1 - disponível [GenBank].

O DNA extraído das amostras de hamsters foi amplificado por meio de PCR em Tempo Real para a determinação da carga parasitária, por meio do sistema SYBR®Green, em termociclador StepOne™ Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para a realização da curva-padrão foram utilizadas amostras de DNA de ATTC nas concentrações decrescentes de 106, 105, 104, 103, 102, 101, 100 parasitas/mL, todas analisadas em triplicata. Os dados foram coletados e analisados com o Step One™ Software v2.1¹⁰. Para todas as análises considerou-se slope (-3,380 a -3,300), R2 (0,982 a 0,999) e eficiência (98 a 104%) em intervalos aceitáveis para acurada análise dos resultados.

Os resultados foram submetidos à análise descritiva e a comparação entre os grupos leishmaniose (G_L), riboflavina (G_{RB}), tratado 1 (G_{T30}) e tratado 2 (G_{T45}) foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação de médias. Os valores da carga parasitária foram transformados em logaritmos, com o objetivo de atingir tanto a homogeneidade de variâncias, como a normalidade de distribuição. Para as características qualitativas foi utilizado o teste de qui-quadrado. Os resultados foram discutidos ao nível de 5% de significância, segundo Sampaio (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Próximo ao final do experimento (120 dias), os animais dos grupos leishmaniose e riboflavina apresentaram emagrecimento aparente, quando comparados aos demais grupos.

Durante a necropsia dos hamsters, feita para realização do *imprinting* e colheita dos órgãos (baço, fígado e medula óssea) obtivemos os seguintes resultados: 100% dos animais dos grupos leishmaniose e riboflavina apresentaram esplenomegalia, 50% dos hamsters destes dois grupos apresentaram hepatomegalia e 42% dos animais do grupo leishmaniose apresentaram ascite. Os hamsters do G_{T30} e G_{T45} não apresentaram sinais e sintomas durante o período de observação.

No presente trabalho após 120 dias os hamsters do grupo leishmaniose apresentaram hepatoesplenomegalia e ascite. Lei et al. (2010) inocularam hamsters com *L. infantum chagasi* através da veia safena e em aproximadamente 15 semanas (105 ± 22,2 dias), os animais apresentaram pele enrugada, aumento de volume abdominal devido à hepatoesplenomegalia, e/ou ascite. Freitas et al. (2005) realizaram inoculação de sangue total de cão com leishmaniose e de concentrado de células mononucleares isoladas infectadas por *Leishmania* em hamsters e observaram que após inoculação de sangue total de cão com leishmaniose os sinais e sintomas clínicos nos hamster foram mais evidentes, apresentando aumentos variáveis no baço, no fígado e de gânglios linfáticos mesentéricos, bem como presença de líquidos ascíticos em alguns casos.

Desta forma, pode-se dizer que no sangue canino da bolsa três inoculado nos hamsters nos grupos G_L e G_{RB} tinham leishmanias e que estas foram transmitidas. O volume de sangue canino utilizado para inoculação dos hamsters no experimento (3,5 mL) demonstrou que o parasita *Leishmania infantum chagasi* pode ser experimentalmente transmitido pelo sangue total de cães naturalmente infectados para seus os receptores (hamsters sensíveis).

Este é um achado importante, dado ao amplo uso de transfusões de sangue na Medicina Veterinária. Além disto, no Brasil, geralmente a terapia pelo sangue envolve o uso de sangue total e de cães doadores escolhidos aleatoriamente, sem o diagnóstico laboratorial para leishmaniose.

Segundo Fast et al. (2006), a ação da RB associada à luz UV resulta na inibição das citocinas/quimiocinas, por isso hipotetizamos que este é o motivo dos hamsters que receberam sangue tratado não apresentarem sinais e sintomas clínicos, associado à baixa carga parasitária.

Segundo Goto e Lindoso (2004) o hamster mimetiza a patogenia e a clínica da doença humana e canina, manifestando a hepatoesplenomegalia e supressão da resposta das células T. Portanto os animais dos grupos tratados G_{T30} e G_{T45} podem não ter desenvolvido a doença clínica pela supressão da resposta imune mediada por linfócitos T, que segundo Rosypal et al. (2005) interagem com os macrófagos parasitados. Estudos realizados por Guarga et al. (2000) em cães sintomáticos provenientes do Mediterrâneo com LV revelaram que a ausência de resposta celular está relacionada com a diminuição dos níveis de CD4+ e altos títulos de anticorpos. Para Baneth e Solano-Gallego (2012), os anticorpos específicos opsonizam as formas amastigotas iniciando sua fagocitose

¹⁰ Life Technologies, EUA.

pelos macrófagos. Ainda de acordo com Rosypal et al. (2005), os macrófagos infectados têm capacidade reduzida de interagir com linfócitos T, o que interfere na liberação de interferon-gama e promovem a destruição do parasito.

Dos sete hamsters inoculados do grupo leishmaniose somente um foi negativo, não sendo encontradas formas amastigotas de LV no esfregaço sanguíneo corado obtido através da leitura das lâminas de *imprinting* dos órgãos avaliados (medula óssea, baço e fígado), sendo, portanto 83% dos animais positivos para *Leishmania*. O mesmo ocorreu no grupo riboflavina. Porém dos sete animais do grupo tratado I e dos sete do grupo tratado II, quatro em cada grupo foram positivos na pesquisa de formas amastigotas de leishmanias (57%) em pelo menos um dos órgãos linfoides, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparamos G_L e G_{RB} com os grupos tratados com riboflavina associada à luz ultravioleta (G_{T30} e G_{T45}).

Mesmo após o tratamento com riboflavina associada à luz UV nos grupos G_{T30} e G_{T45} , em 57% dos animais em cada grupo foi detectado as formas amastigotas no esfregaço sanguíneo, indicando que a técnica não eliminou completamente os parasitas.

Quando avaliados os órgãos linfoides separadamente, formas amastigotas de LV foram encontradas no esfregaço sanguíneo corado obtido através do *imprinting* medula óssea dos hamsters no grupo leishmaniose, sendo que 86% das amostras eram positivas e 14% negativas; no grupo riboflavina 71% eram positivas e 29% negativas; no tratamento com associação de riboflavina e luz UV por 30 minutos (grupo tratado I) 29% eram positivas e 71% das lâminas eram negativas e no tratamento com associação de riboflavina e luz UV por 45 minutos (grupo tratado II) 14% eram positivas enquanto que em 86% das lâminas não foi encontrado o parasita. Esta menor porcentagem de lâminas positivas para *L. infantum chagasi* foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparamos os grupos tratados com luz UV por 30 e 45 minutos com os grupos leishmaniose e riboflavina.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp foram encontradas no esfregaço sanguíneo corado obtido através do *imprinting* de baço, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Sendo a porcentagem de amostras positivas 71% e a porcentagem de amostras negativas 29% no grupo leishmaniose e 57% positivas e 43% negativas, nos grupos riboflavina, tratado I e tratado II.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp foram encontradas no esfregaço sanguíneo corado obtido através *imprinting* de fígado, não havendo diferença entre os grupos ($p > 0,05$), sendo que 14% das amostras eram positivas e 86% negativas no G_L , 29% das amostras eram positivas e 71% negativas no G_{RB} , 29% das amostras eram positivas e 71% negativas no G_{T30} e 14% das amostras positivas e 86% negativas no G_{T45} .

A pesquisa de amastigotas foi positiva no baço na maioria dos animais infectados, independente do grupo inoculado com sangue de canino com leishmaniose, confirmando as observações de outros autores em infecções experimentais, e em casos caninos e humanos de leishmaniose visceral submetidos à necropsia (Zijlstra et al., 2001; Singh e Sivakumar, 2003; Wyllie e Fairlamb, 2006). De acordo com Singh e Sivakumar (2003), em cães, a sensibilidade é maior quando se utiliza aspirado esplênico. Segundo Zijlstra et al. (2001) o diagnóstico da doença nos cães pode ser feito pela demonstração das formas amastigotas em aspirados de linfonodos, medula óssea e baço, com sensibilidade de 58, 70 e 96% respectivamente.

A pesquisa de formas amastigotas nos *imprintings* dos órgãos linfoides dos hamsters dos grupos G_L , G_{RB} , G_{T30} e G_{T45} serviu para diagnosticar a LV. Para Ferrer (1999) e Ikeda-Garcia e Feitosa (2007) uma das formas mais seguras de diagnóstico de leishmaniose visceral é a observação direta de formas amastigotas do parasita em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos. Para Slappendel e Ferrer (1998) a especificidade deste método é virtualmente 100%, mas dependendo do tempo despendido procurando o parasita a sensibilidade passa a ser de no máximo 80% em animais sintomáticos e menor em cães assintomáticos.

Os sete hamsters inoculados do grupo leishmaniose tiveram todas as amostras de sangue negativas no PCR convencional, enquanto 100% das amostras de medula óssea e baço foram positivas. No fígado a PCR foi positiva em 42% das amostras colhidas. Isto ocorreu porque os animais não estavam mais em parasitemia, devido ao tempo transcorrido entre a inoculação e a obtenção do sangue (120 dias), estando os parasitas nos órgãos linfoides.

No grupo riboflavina 28% das amostras foram positivas pela PCR convencional no sangue, 71% no baço e no fígado e 86% foram positivas na medula óssea. Este grupo se comporta de forma semelhante ao G_L , já que a riboflavina utilizada sem a associação com a luz UV, não apresenta sua ação inativadora de agir como um fotossensibilizador, e desta forma segundo Marschner e Goodrich (2011) não provoca os danos seletivos aos ácidos nucleicos esperados.

Dos hamsters que receberam sangue tratado com riboflavina e luz ultravioleta por 30 minutos (tratado 1), 28% das amostras foram positivas para PCR no sangue, 100% positivas no baço e medula óssea e 71% no fígado. Mesmo após o tratamento com riboflavina associada à luz UV por 30 minutos os animais apresentaram diagnóstico laboratorial positivo, e quando realizada a técnica da PCR convencional, pode-se observar DNA do parasita no sangue, baço, medula óssea e fígado, indicando que o tratamento não eliminou completamente o parasita.

Os animais que receberam sangue tratado riboflavina associada à luz UV por 45 minutos (tratado 2) apresentaram porcentagem de positivos na PCR convencional de 28% no sangue e 100% no baço, fígado e

medula óssea. Mesmo após o tratamento com RB e 45 minutos de luz UV os animais apresentaram diagnóstico laboratorial positivo, podendo-se observar DNA do parasita no sangue, baço, medula óssea e fígado, através da PCR convencional, indicando que o tratamento assim como no grupo G_{T30} não eliminou completamente a *L. infantum chagasi*.

Para o diagnóstico realizado por PCR convencional a utilização dos protocolos de luz UV (30 e 45 minutos) não permitiu diagnóstico negativo, sendo necessário a utilização da PCR quantitativa para determinar a carga parasitária. Para Nunes et al. (2007), a escolha do tecido onde será realizada a pesquisa do DNA do parasita influencia a sensibilidade da reação. De acordo com Miró et al. (2008) e Paltrinieri et al. (2010), nas amostras de sangue a sensibilidade é menor, principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele e medula óssea. Segundo Mortarino et al. (2004) a técnica de PCR em tempo real (qPCR) é um método avançado que pode detectar níveis extremamente baixos de parasitas, baseando-se na detecção e quantificação em tempo real da fluorescência emitida proporcionalmente à síntese do produto de PCR, sendo um método mais sensível do que o PCR convencional, com menor risco de contaminação, uma vez que o sistema é fechado.

A somatória da média da carga parasitária do sangue com os órgãos linfoides (MO, baço e fígado) foi de $134 \times 10^6 \pm 113 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo leishmaniose, $73 \times 10^6 \pm 43 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo riboflavina, $9 \times 10^6 \pm 19 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo tratado I, com a associação de riboflavina mais 30 minutos de luz UV e de $0,5 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo tratado II, com a associação de riboflavina mais 45 minutos de luz UV.

Isto demonstra que apesar dos hamsters serem positivos na técnica de PCR convencional para *L. infantum chagasi*, houve menor carga parasitária nos grupos tratados I e II, quando comparados aos grupos leishmaniose e riboflavina ($p < 0,05$). Esta redução se deve, segundo Speek e Rosenkranz (1979) e Goodrich (1997) ao fato da RB se associar aos ácidos nucleicos do parasita e interceder um processo de transferência de elétrons oxigênio-independente que leva à modificação destes ácidos nucleicos, principalmente sobre os resíduos de guanina. Para Kumar et al. (2004), a utilização de luz UV, sem a adição de riboflavina, causa dano reversível ao ácido nucleico, porém, os danos induzidos pela RB são irreversíveis, pois os processos de replicação e reparação são prejudicados devido à modificação da base guanina.

O órgão com maior carga parasitária foi a medula óssea, todos os grupos apresentaram grande quantidade do parasita, porém houve significativamente menor carga parasitária na MO nos hamsters do grupo G_{T30} e G_{T45} quando comparados aos grupos leishmaniose e riboflavina (RB) ($p < 0,05$) (Quadro a).

Quando comparamos a redução da carga parasitária dos grupos com o grupo leishmaniose, o grupo riboflavina teve uma redução de 46% da carga inicial, enquanto o grupo tratado I (30 minutos de luz UV) teve uma redução de 93% da carga parasitária e o grupo tratado II (45 minutos de luz UV) uma redução de 99% da carga parasitária do início do experimento. Sendo o tratamento do G_{T45} o mais efetivo na redução da carga parasitária.

O baço foi o segundo órgão com maior carga parasitária, havendo diferença significativa entre o grupo leishmaniose e o grupo riboflavina e tratado II ($p < 0,05$) (Quadro b). Houve uma redução de 90% da carga parasitária no grupo riboflavina, de 40% no grupo tratado I (30 minutos de luz UV) e de 87% no grupo tratado II (45 minutos de luz UV), quando comparados ao grupo leishmaniose.

O fígado não apresentou carga parasitária tão alta quanto aos demais órgãos avaliados, não havendo diferença estatística entre os grupos estudados ($p > 0,05$) (Quadro c). Segundo Wilson et al. (1996) o fígado serve como local de replicação inicial do parasito e o baço como local de persistência. Em seu estudo com camundongos, 60 dias pós-infecção o baço passou a apresentar maior carga parasitária em comparação ao fígado, sugerindo que o fígado esteja montando uma resposta imune eficiente frente ao parasito. Sabe-se que a infecção do fígado é auto limitante, com formação de granulomas, e que no baço o crescimento do parasito é lento e persistente, além desse órgão ser conhecido por ser mais suscetível à infecção por *Leishmania* spp.

O sangue em todos os grupos teve baixa carga parasitária através da técnica de qPCR, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$) (Quadro d). Uma explicação para este fato é que parasitemia nesta fase da infecção é menor, já que os parasitas encontram-se nos órgãos linfoides. Na PCR para amostras de sangue, a sensibilidade é menor (Nunes et al., 2007), principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele, medula óssea (Miró et al. 2008, Paltrinieri et al. 2010) e baço (Solcà et al. 2012).

A diferença nos resultados no sangue e nos órgãos linfoides pode estar relacionada com a distribuição heterogênea dos parasitas, em cada tecido, bem como a carga parasitária e resposta imune local (Maia et al. 2009).

Obtivemos resultados semelhantes aos de Cardo et al. (2006), que utilizando riboflavina e luz UV em bolsas de plasma, obteve uma redução significativa de *Leishmania donovani infantum*, principalmente quando avaliamos os resultados das cargas parasitárias na medula óssea e no baço.

Identificamos que a associação da riboflavina com a luz UV reduziu a carga parasitária de *Leishmania infantum chagasi* quando consideramos a somatória da média da carga parasitária do sangue com os órgãos linfoides (MO, baço e fígado), porém não evitou que este agente patogênico possa ser transmitido em procedimentos de terapia pelo sangue, já que o parasita e o seu DNA foram encontrados nos órgãos linfoides.

Porém, o sangue parasitado tratado com riboflavina e luz ultravioleta não foi capaz de produzir sinais e sintomas em hamsters durante o período estudado de 120 dias.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, nas condições em que foi realizado, nos permitem concluir que o sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* não perdeu a capacidade de produzir a infecção após o período de armazenamento de 21 dias.

O tratamento com luz ultravioleta e riboflavina do sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* impede o aparecimento de sintomas nos hamsters e diminui a sua carga parasitária.

REFERÊNCIAS

- Bryant, B.J. & Klein, H.G. 2007. Pathogen inactivation: the definitive safeguard for the blood supply. Arch. Pathol. Lab Med. 131(5):719-733.
- Cardo, L.J.; Rentas, F.J.; Ketchum, L.; Salata, J.; Harman, R.; Melvin, W.; Weina, P.J.; Mendes, J.; Reddy, H. & Goodrich, R. 2006. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani infantum* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. Vox Sanguinis. 90:85-91.
- Cardo, L.J.; Salata, J.; Mendez, J.; Reddy, H. & Goodrich, R. 2007. Pathogen inactivation of Trypanosoma cruzi in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light Transfusion and Apheresis Science. 37:131-137.
- Corbin F. 2002. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. Int J Hematol. 76(2):253-257.
- Fast, L.D.; Dileone, G. & Marschner, S. 2006. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation. Transfusion. 51:1397-1404.
- Ferrer, L.M. 1999. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, p.6-10.
- Freitas, E.; Melo, M.N. Costa-Val A.P. & Michalick, M.S.M. 2005. Transmissão de *Leishmania infantum* via blood transfusão in dogs: potencial for infection and importance of clinical factors, Vet. Parasitol. 137:159-167.
- Goodrich, R.P., Hansen, E., Gilmour, D., Jesser, R., Keil, S. & Goodrich, T. 2000. Inactivation of Pathogens in Blood Products with Riboflavin and Light. In: Gambro BCT, Inc., Lakewood, CO, USA
- Goodrich, R.P.; Doane, S. & Reddy, H.L. 2010. Design and development of a method for the reduction of infectious pathogen load and inactivation of white blood cells in whole blood products. Biologicals. 38:20-30.
- Goodrich, R.P.; Edrich, R.A.; Goodrich, L.; Scott, C.; Manica, K.; Hlavinka, D.; Hovenga, N.; Hansen, E.; Gampp, D.; Keil, S.D., Gilmour, D.; Li, J.; Martin, C.B. & Platz, M.S. 2006. The antiviral and antibacterial properties of riboflavin and light: applications to blood safety and transfusion medicine. p. 83-113. In: Silva, E. & Edwards, A.M. (eds). Flavins: Photochemistry and Photobiology. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences. Cambridge, The Royal Society of Chemistry.
- Goto, H. & Lindoso, J. A. L. 2004. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res. 37:615-623.
- Guarga, J. L.; Moreno, J.; Lucientes, J.; Gracia, M. J.; Peribanez, M. A.; Alvar, J. & Castillo, J. A. 2000. Canine leishmaniasis transmission, higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T-helper cells. Res. Vet. Sci., 69:249-253.
- Hochman, B.; Ferreira, L. M.; Bôas, F. C. V.; Mariano, M. 2003. Integração do enxerto heterólogo de pele humana no subepitélio da bolsa jugal do hamster (*Mesocricetus auratus*). Acta Cirúrgica Brasileira. 18(5): 415-430.
- Janetzko, K.; Hinz, K.; Marschner, S.; Klüter, H. & Bugert, P. 2007. Monitoring of the Mirasol Pathogen Reduction Procedure for Platelet Concentrates by PCR and bioanalyzer; Transfus Med Hemother. 34(1):60-65.
- Lei, S. M.; Ramer-Tait, A. E.; Dahlin-Laborde, R. R.; Mullin, K.; Beetham, J. K. 2010. Reduced hamster usage and stress in propagating *Leishmania chagasi* promastigotes using cryopreservation and saphenous vein inoculation. J. Parasitol. 96(1):103-108.
- Maia, C.; Ramada, J.; Cristóvão, J. M.; Gonçalves, L. & Campino, L. 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. Vet J. 179(1):142-144.
- Marschner, S. & Goodrich, R. 2011. Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light. Transfus Med Hemother. 38:8-18.
- Miró, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Oliva, G. & Baneth, G. 2008. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two, Trends in Parasitology. 24:371-377.
- Mortarino, M.; Franceschi, A.; Mancianti, F.; Bazzocchi, C.; Genchi, C. & Bandi, C. 2004. Quantitative PCR in the Diagnosis of *Leishmania*. Parasitology. 46:163-167.

- Nunes, C. M.; Dias, A. K. K.; Gottardi, F. P.; Paula, H. B. De; Azevedo, M. A. A De; Lima, V. M. F. De & Garcia, J. F. 2007. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*.16(1):5-9.
- Owens, S.D.; Oakley, D.A.; Marrayott, K.; Hatchett, W.; Walton, R.; Nolan, T.J.; Newton, A.; Steurer, F.; Schantz, P. & Giger, U. 2001. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*.219:1076-1083.
- Paltrinieri, S.; Solano-Gallego, L.; Fondati, A.; Lubas, G.; Gradoni, L.; Castagnaro, M.; Crotti, A.; Maroli, M.; Oliva, G.; Roura, X.; Zatelli, A. & Zini, E. 2010. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.236:1184-1191.
- Reddy, H.L.; Dayan, A.D.; Cavagnaro, J.; Gad, S.; Li, J.; Goodrich, R.P. 2008. Toxicity Testing of a Novel Riboflavin-Based Technology for Pathogen Reduction and White Blood Cell Inactivation. *Transfusion Medicine Reviews*. 22(2):133-153.
- Reikvam, H.; Marschner, S.; Apelseh, T.O.; Goodrich, R. & Hervig, T. 2010. The Mirasol® Pathogen Reduction Technology system and quality of platelets stored in platelet additive solution. *Blood Transfusion*.8:186-192.
- Rosypal, A. C.; Gogal, R. M. J.; Zajac, A. M.; Troy, G. C. & Lindsay, D. S. 2005. Flow cytometric analyses of cellular responses in dogs experimentally infected with a North American isolate of *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol*.131:45-51.
- Ruane, P. H.; Edrich, R.; Gampp, D.; Keil, S. D. K.; Leonard, R. L. & Goodrich, R. P. 2004. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Blood Components*. 4:877-885.
- Sampaio, I. B. M. 1998. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 221p.
- Seltsam, A. & Müller, T.H. 2011. UVC Irradiation for Pathogen Reduction of Platelet Concentrates and Plasma. *Transfus Med Hemother*. 38:43-54,
- Singh, S. & Sivakumar, R. 2003. Recent Advances in the Diagnosis of Leishmaniasis. *J. Postgrad. Med*. 49:55-60.
- Solcà, M. S.; Guedes, C. E.; Nascimento, E. G.; Oliveira, G. G.; Santos, W. L.; Fraga, D. H. & Verasa, P. S. 2012. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. 184:133-140.
- Solano-Gallego, L; Miró, G.; Koutinas, A.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G. & Baneth, G. 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 4:86-92.
- Solcà, M. S.; Guedes, C. E.; Nascimento, E. G.; Oliveira, G. G.; Santos, W. L.; Fraga, D. H. & Verasa, P. S. 2012. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. 184:133- 140.
- Zijlstra, E. E.; Nur, Y.; Desjeux, P.; Khalil, E.A.G.; El-Hassan, A. M. & Groen, J. 2001. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from Sudan. *Trop. Med. Int. Health*. 6:108-113.
- Wendel, S. 2002. A quimioprofilaxia de doenças transmissíveis por transfusão em componentes lábeis hemoterápicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(4):275-281.
- Wilson, M.E.; Sandor, M.; Blum, A.M.; Young, B.M.; Metwali, A.; Elliott, D.; Lynch, R.G.; Weinstock, J.V. 1996. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissuespecific replication of *Leishmania chagasi*. *J Immunol*.156(6):2231-2239.
- Zijlstra, E. E.; Nur, Y.; Desjeux, P.; Khalil, E.A.G.; El-Hassan, A. M.; Groen, J. 2001. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from Sudan. *Trop. Med. Int. Health*. 6:108-113.
- Wyllie, S. & Fairlamb, A. H. 2006. Refinement of techniques for the propagation of *Leishmania donovani* in hamsters. *Acta Tropica*. 97(3):364-369,

Quadro a – Estatística descritiva da carga parasitária (/μL) obtida pela qPCR da medula óssea nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	133 x 10 ⁶ A	112 x 10 ⁶	116 x 10 ⁶	6,62	304 x 10 ⁶	42 x 10 ⁶
Riboflavina	73 x 10 ⁶ A	43 x 10 ⁶	86 x 10 ⁶	0,00	106 x 10 ⁶	19 x 10 ⁶
Tratado I	9 x 10 ⁶ B	19 x 10 ⁶	3,87	0,00	52 x 10 ⁶	7 x 10 ⁶
Tratado II	0,45 x 10 ⁶ B	1 x 10 ⁶	2,69	0,00	3 x 10 ⁶	0,45 x 10 ⁶

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente (p<0,05) pelo Teste de Tukey.

Quadro b - Estatística descritiva da carga parasitária (/μL) obtida pela qPCR do baço nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	476 x 10 ³ A	1 x 10 ⁶	90,87	9,39	2 x 10 ⁶	475 x 10 ³
Riboflavina	45 x 10 ³ B	87 x 10 ³	5 x 10 ³	64,70	239 x 10 ³	33 x 10 ³
Tratado I	283 x 10 ³ A	404 x 10 ³	2 x 10 ³	300,55	911 x 10 ³	152 x 10 ³
Tratado II	59 x 10 ³ B	99 x 10 ³	9 x 10 ³	0,00	276 x 10 ³	37 x 10 ³

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente (p<0,05) pelo Teste de Tukey.

Quadro c - Estatística descritiva da carga parasitária (/μL) obtida pela qPCR do fígado nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	58,22	131,86	7,59	0,00	356,78	49,84
Riboflavina	111,16	218,35	11,22	0,00	500,61	97,65
Tratado I	83,50	220,00	18,21	2,16	583,20	83,30
Tratado II	119,50	207,17	18,93	0,00	551,70	78,30

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente (p<0,05) pelo Teste de Tukey.

Quadro d- Estatística descritiva da carga parasitária (/μL) obtida pela qPCR do sangue nos diferentes grupos : leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	0,85	1,35	0,25	0,00	3,24	0,61
Riboflavina	0,03	0,08	0,00	0,00	0,20	0,03
Tratado I	0,30	0,81	0,00	0,00	2,13	0,30
Tratado II	0,46	0,88	0,00	0,00	2,42	0,33

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente (p<0,05) pelo Teste de Tukey.