

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**IDENTIFICAÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA* sp. NO  
ENCÉFALO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL.**

**Cintha Brillante Cardinot**  
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP  
2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**IDENTIFICAÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA* sp. NO  
ENCÉFALO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL.**

**Cinthya Brillante Cardinot**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Adjunto Mary Marcondes**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Gisele Fabrino Machado**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais)

ARAÇATUBA – SP  
2013

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**CINTHYA BRILLANTE CARDINOT** – Nascida em Campos dos Goytacazes em 22 de Agosto de 1982. Iniciou e concluiu o curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense– UENF, em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (2003-2007). Ingressou no programa de pós-graduação *lato sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais, na Universidade Paulista-UNIP, São Paulo, São Paulo (2008-2009). Ingressou no curso de residência Médico Veterinária em Clínica Médica de Pequenos Animais, na Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais (2009-2010). Iniciou o programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Mestrado), na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, São Paulo (2011).

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
<b>3. OBJETIVO</b> .....	15
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1 Animais.....	16
4.2 Exame citológico de linfonodo e medula óssea.....	17
4.3 Colheita de material do sistema nervoso central.....	17
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para Pesquisa de DNA de <i>Leishmania</i> sp.....	17
4.4.1 Extração do DNA.....	17
4.4.2 Quantificação e pureza do DNA.....	18
4.4.3 Determinação da curva padrão.....	18
4.4.4 PCR em Tempo Real.....	20
<b>5. RESULTADOS</b> .....	21
5.1 Animais.....	21
5.2 Quantificação e pureza do DNA.....	22
5.3 PCR em Tempo Real.....	24
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	30
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	31
<b>ANEXO</b> .....	47

## LISTA DE QUADROS

Página

- Quadro 1-** Alterações clínicas observadas durante o exame físico de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, sem (C1 a C22) e com (N1 e N2) evidências de alterações neurológicas.....21
- Quadro 2-** Resultados individuais da quantidade total de DNA extraído das amostras de sistema nervoso central, e os respectivos valores de absorbância, de cães com leishmaniose visceral sem (C1 a C22) e com (N1 e N2) evidências de alterações neurológicas, e de cães do grupo controle.....23
- Quadro 3-** Resultados individuais da carga parasitária de *Leishmania* sp. no encéfalo de cães acometidos por leishmaniose visceral sem e com sintomas neurológicos.....26

## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1-** Mapas do Estado de São Paulo destacando os municípios com presença de casos de leishmaniose visceral americana nos anos de 1999 e 2006 (Adaptado de SÃO PAULO, 2006).....3
- Figura 2-** Curvas de ampliação do DNA de *L. infantum chagasi* obtido em diluições seriadas de  $1,6 \times 10^4$  a  $1,6 \times 10^{-2}$  promastigotas/mL.....19
- Figura 3-** Curva padrão obtida pela realização de diluições seriadas de  $1,6 \times 10^4$  a  $1,6 \times 10^{-2}$  promastigotas/mL de *Leishmania infantum chagasi*.....19
- Figura 4-** Curva de ampliação de DNA de *Leishmania sp.* em amostras de encéfalos de cães com leishmaniose visceral.....25
- Figura 5-** Curva de dissociação (Melt Curve) da amplificação de DNA de *Leishmania sp.* em amostras de encéfalo de cães.....25

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença de caráter zoonótico sendo considerada como uma das mais importantes do ponto de vista da saúde pública. É causada por diversas espécies do gênero *Leishmania*, transmitidas por insetos vetores que afetam tanto seres humanos como animais domésticos e silvestres. Até o presente momento, de todos os animais identificados como reservatórios da doença o cão é considerado o mais importante, sendo o principal elo na cadeia de transmissão da LV.

A pobreza associada ao crescimento demográfico, deslocamento de pessoas e animais e à urbanização desorganizada nas periferias dos grandes centros urbanos, favoreceu a expansão da doença, que está distribuída por todos os continentes, com exceção da Oceania e da Antártida.

A infecção causada pela *Leishmania infantum chagasi* em cães resulta em uma variedade de manifestações clínicas, levando ao desenvolvimento de alterações dermatológicas, problemas renais, digestórios, cardiorrespiratórios, musculoesqueléticos e neurológicos. Além disso, um grande contingente de animais infectados permanece assintomático.

O sistema nervoso central (SNC) possui uma série de características morfológicas e funcionais que o tornam, de certa forma, menos susceptível a infecções. Entretanto, alguns patógenos são capazes de transpor os mecanismos de defesa e causar alterações neurológicas.

No tocante ao envolvimento do SNC em cães com leishmaniose visceral canina (LVC), verifica-se a presença de poucos dados tanto na literatura nacional quanto internacional. Dos poucos estudos cujo objetivo principal era elucidar as características neurológicas de cães com LV, nota-se a existência de evidentes contradições no que tange à patogenia da doença. Através do presente estudo viemos, tentar diminuir esta lacuna no conhecimento da etiopatogenia das lesões neurológicas causadas por *L. infantum chagasi*, por meio da pesquisa de DNA do parasita no encéfalo de cães com e sem sintomas neurológicos.

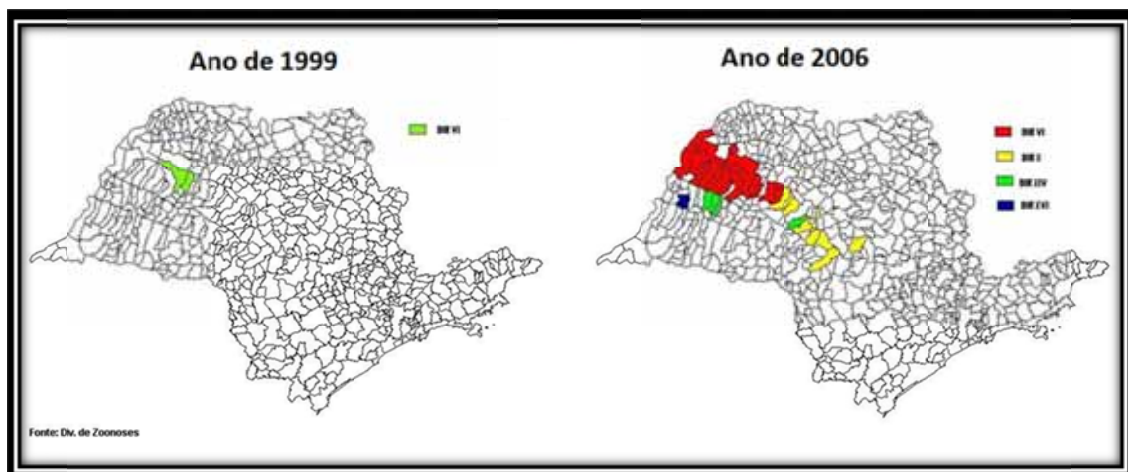
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência mundial das diferentes formas clínicas de leishmaniose, zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, ultrapassa os 12 milhões de casos. Trata-se de uma doença endêmica nos cinco continentes, em 88 países localizados em regiões tropicais e subtropicais, com uma população de 350 milhões de habitantes residindo em áreas de risco. Na América Latina a leishmaniose visceral (LV) já foi identificada em 12 países, ocorrendo relatos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com a maior parte dos casos ocorrendo no Brasil (WHO, 2006).

O primeiro caso de leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil data de 1913, quando Migone descreve uma necropsia de um paciente oriundo de Boa Esperança, Corumbá - MS (ALENCAR et al., 1956). No último censo realizado sobre leishmaniose no Brasil, verificou-se que entre os anos de 2000 e 2010 foram registrados 43.189 novos casos de leishmaniose visceral americana (LVA) e, destes, 2.422 pessoas vieram a óbito (BRASIL, 2012).

No Estado de São Paulo constata-se um processo de expansão da LVA, notificada pela primeira vez no ano de 1999, à medida que se verifica a adaptação do vetor a zonas urbanas (SÃO PAULO, 2007). Até junho de 2006, casos da doença, já haviam sido notificados em 34 municípios das regiões de Araçatuba, Bauru, Marília e Presidente Prudente (Figura 1) (SÃO PAULO, 2006). Segundo a secretaria de Vigilância Epidemiológica de Araçatuba, no ano de 2010 ocorreram 30 casos; em 2011, 44 e até junho de 2012 já haviam sido notificados 10 casos de LVA na região (SÃO PAULO, 2012).





**Figura 1-** Mapas do Estado de São Paulo destacando os municípios com presença de casos de leishmaniasis visceral americana nos anos de 1999 e 2006 (Adaptado de SÃO PAULO, 2006).

No Brasil a leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é causada pela *Leishmania infantum chagasi*, e sua transmissão ocorre por meio da picada de fêmeas de insetos dípteros da família Psychodidae (GONTIJO; MELO, 2004). Estes flebotomíneos estão distribuídos por toda a América Latina, sendo popularmente conhecidos como mosquito-palha, birigui e tatuquira (SÃO PAULO, 2007). O principal transmissor da doença é a *Lutzomyia longipalpis* porém, a *Lutzomyia cruzi* já foi incriminada como transmissor deste protozoário no Estado do Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 2003).

As leishmanias são parasitos intracelulares de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) (SÃO PAULO, 2007). Seu ciclo biológico inicia-se quando os flebotomíneos infectados com as formas promastigotas realizam o repasto sanguíneo. As formas infectantes são inoculadas na pele do hospedeiro, fagocitadas pelas células do SMF e, no interior dos macrófagos, diferenciam-se em formas amastigotas. Estas, multiplicam-se por divisão binária intracelular até romperem os macrófagos e serem novamente fagocitadas. Desta forma, disseminam-se para órgãos linfóides tais como o fígado, baço, linfonodos e medula óssea, assim como para outras partes do organismo, por via linfática e hematogena. Ao picar o hospedeiro vertebrado infectado, o vetor ingere macrófagos parasitados que se romperão em seu intestino. As formas amastigotas são então liberadas, diferenciam-se em

formas flageladas promastigotas, as quais originarão as formas infectantes. O ciclo evolutivo do parasito no vetor completa-se em torno de 72 horas (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012; SÃO PAULO, 2006).

Os flebotomíneos realizam oviposição em ambiente sombreado e rico em matéria orgânica, e seu ciclo biológico, de ovo, larva, pupa a adulto, leva em torno de 30 dias para se completar (MORRISON et al., 1993). A atividade hematofágica é realizada pelas fêmeas, predominantemente à noite, iniciando-se cerca de uma hora após o crepúsculo (CAMARGO-NEVES, 2004). A vida média das fêmeas é de 20 dias (MORRISON et al., 1993).

A doença, que durante muitos anos se manifestava predominantemente em áreas rurais, nos últimos 15 anos vêm se apresentando em áreas urbanas. Esta inversão é atribuída à grande migração da população rural para os subúrbios das áreas urbanas, levando à formação de locais densamente populosos, muitas vezes sem estrutura mínima de saneamento, criando assim um local propício para a proliferação do flebotomo. Nesses assentamentos, o parasita recém-introduzido encontra um grande número de indivíduos com baixa imunidade e desnutridos, mais vulneráveis a doença (WHO, 2006).

Apesar de alguns estudos aventarem a possibilidade da ocorrência da transmissão da leishmaniose visceral por meio de outros vetores invertebrados, como o *Rhipicephalus sanguineus* (COUTINHO et al., 2005, SOLANO-GALLENO et al., 2012) e a *Ctenocephalides felis* (FERREIRA et al., 2009), ainda não existe comprovação de tal fato. No homem já foi reportada a transmissão da doença sem a necessidade de um vetor, como ocorre nos casos de transfusão sanguínea, ou pelo compartilhamento de agulhas contaminadas com sangue infectado (PEARSON; SOUSA, 1996).

A prevalência de leishmaniose visceral em cães em áreas endêmicas pode atingir de 20 a 40% da população. Acredita-se que em áreas com alta infecção em cães a incidência na população humana varie de 1 a 2% (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012; CASTRO, 1996; SANTA-ROSA, 1997).

O quadro clínico em cães é semelhante ao de humanos, exceto pelo desenvolvimento de lesões de pele. Desta forma, a espécie canina assume singular papel como modelo experimental da doença no homem (KOUTINAS et al, 1993). Os cães podem apresentar sintomas inespecíficos, tais como febre, anemia, linfadenopatia, hepato e esplenomegalia e perda progressiva de peso

evoluindo para caquexia (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012; GENARO, 1993). As lesões cutâneas são frequentes e apresentam padrões variados, que compreendem uma excessiva descamação da epiderme, áreas de alopecia, ulcerações e onicogribose (FEITOSA et al., 2000). O período de incubação da doença no cão pode variar de três meses a dois anos (GENARO, 1993).

A principal causa da morte de cães com a doença é a insuficiência renal, decorrente de quadros de glomerulonefrite e nefrite intersticial. Alguns cães apresentam alterações digestórias devido à presença de ulcerações na mucosa gástrica e intestinal. Pode-se verificar também diáteses hemorrágicas, tais como epistaxe, e alterações oftálmicas como ceratoconjuntivite e uveíte. Muitos cães desenvolvem problemas locomotores com manifestações clínicas decorrentes de poliartrite, polimiosite e até osteomielite (ALEXANDRE-PIRES, 2008; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012; CORREIA, 2008; FEITOSA et al., 2005; NOLI, 1999).

Apesar de pouco frequentes, existem relatos de alterações neurológicas em cães com leishmaniose visceral, com ou sem a participação de outros agentes oportunistas. Dentre elas destacam-se convulsões generalizadas, mioclonias, vocalização, anisocoria, midríase bilateral, nistagmo, lesão de nervos cranianos, inclinação da cabeça, andar em círculos, ataxia, tremor de intenção, tetraparesia e tetraplegia (MARCONDES, 2008). Apesar desses relatos, a patogenia da doença no sistema nervoso não está totalmente esclarecida. De 215 cães naturalmente acometidos por LV avaliados clinicamente em Araçatuba-SP, área endêmica para a doença, 4% apresentaram sintomas neurológicos (FEITOSA et al., 2000).

Mais recentemente, José-Lopez et al. (2011) relataram a provável ocorrência de infartos cerebrais em dois cães com leishmaniose visceral que apresentaram quadros agudos de prostração, paralisia de nervos faciais, andar em círculos e déficits proprioceptivos. Os dois animais apresentaram melhora dos sintomas após um mês da instituição do tratamento para LV, sugerindo um envolvimento da doença no desenvolvimento das alterações neurológicas.

Em seres humanos acometidos por leishmaniose visceral é incomum a observação de sinais clínicos que envolvam o SNC, sendo o comprometimento dos nervos periféricos uma apresentação mais frequente (SNYDMAN et al., 2006). Hashim et al. (1995), relataram que 46% das pessoas com LV

desenvolveram sinais de neuropatias periféricas, cujo sintoma mais frequentemente observado foi uma sensação de queimação nos pés. São descritos, ainda, casos de disfunção de nervos cranianos, meningite e alterações semelhantes à síndrome de Guillain-Barré (SNYDMAN et al., 2006).

Um dos poucos relatos de alterações neurológicas centrais em seres humanos data de 1996, quando Prasad e Sen descreveram um quadro de meningite crônica em um menino de 10 anos, portador de leishmaniose visceral. O quadro neurológico iniciou-se um ano após o diagnóstico da doença e foi tratado sem sucesso, com ocorrência de várias recidivas, durante um ano e oito meses. Muito embora várias amostras de líquor tenham sido colhidas no decurso da enfermidade, nenhuma delas evidenciou a presença de formas amastigotas. Somente após uma esplenectomia é que foram observadas leishmanias no líquor.

Em condições normais o sistema nervoso central (SNC) é menos susceptível a infecções, devido à presença da barreira hematoencefálica (BHE). A função da barreira é limitar a passagem de leucócitos e macromoléculas para dentro do sistema nervoso, protegendo-o, desta forma, contra patógenos e células encontradas na circulação periférica (ABBOTT et al., 2010; GALEA et al., 2007). A BHE é composta por células endoteliais cujas junções intercelulares, denominadas “tight junctions”, são responsáveis por limitar a passagem de macromoléculas para o interior do SNC (BALLABH et al., 2004). No entanto, em condições inflamatórias a presença de citocinas pode aumentar a permeabilidade da barreira e, desta forma, facilitar a entrada de patógenos e leucócitos (BALLABH et al., 2004).

A BHE está presente em todo o SNC, com exceção do plexo coróide e dos órgãos circunventriculares, regiões onde os capilares sanguíneos são fenestrados e encontra-se a barreira hematoliquórica (BHL) (WOLBURG; PAULUS, 2010). Em decorrência da presença de fenestrações nos capilares sanguíneos, essas regiões são, por vezes, tidas como portas de entrada de células inflamatórias e patógenos ao SNC (MARQUES et al., 2007).

Devido à estruturação do SNC, na tentativa de não permitir que seu isolamento seja quebrado, autores tem proposto diferentes teorias para tentar elucidar como ocorre a entrada de agentes infecciosos no mesmo. Dentre elas citam-se: invasão direta do agente por meio das células epiteliais do plexo-

coroide (STRAZZIELLE; GHERSI-EGEA, 2000), do endotélio capilar, por células da barreira hematoencefálica ou hematoliquórica ou, ainda, no interior de leucócitos infectados que ultrapassam as barreiras (HUANG; JONG, 2001; LOSSINSKY; SHIVERS, 2004).

Alguns patógenos como a *Escherichia coli*, *Streptococcus sp*, *Cryptococcus neoformans*, *Borrelia burgdorferi*, *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma brucei gambiense*, são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e causar lesões no tecido nervoso (CHARLIER et al., 2005; DORAN et al., 2005; GRAB et al., 2005; KIM, 2002; NIKOLSKAIA et al., 2006; TRIPATHI et al., 2007).

Uma possível evidência de ruptura da BHE em cães com leishmaniose visceral é a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp no liquor desses animais. Garcia-Alonso et al. (1996), Feitosa et al. (2000), Lima et al. (2003) e Melo et al. (2009), identificaram a presença de IgG liquórica em cães naturalmente acometidos por LV, mesmo na ausência de sintomas neurológicos. De acordo com os primeiros autores, a origem das imunoglobulinas presentes no liquor não está clara; entretanto, elas podem ser provenientes de uma lesão da BHE, uma vez que foram encontrados extensos depósitos de antígenos de *Leishmania* sp. e de imunoglobulinas nos espaços intersticiais e intravasculares do plexo coroide desses cães. Outra possibilidade é de que a transferência de antígenos de leishmania para o sistema nervoso central leve a uma produção intratecal de anticorpos, como ocorre na malária.

Apesar de Nieto et al. (1996) e Viñuelas et al. (2001) terem identificado formas amastigotas de *Leishmania* sp. em células endimárias, e macrófagos do plexo coroide e das meninges de cães acometidos pela doença, evidenciando uma quebra da BHE em alguns casos de LV, Ikeda et al. (2007) e Melo et al. (2009) não encontraram, por meio de imunohistoquímica (IHQ), evidências do parasito no sistema nervoso central. Ikeda et al. (2007), porém, verificaram intensa marcação antigênica no interior de vasos sanguíneos no encéfalo desses animais, sugerindo a presença do parasito na circulação cerebral.

Apesar da ausência de formas amastigotas no liquor e no tecido nervoso da grande maioria de cães acometidos por leishmaniose visceral, Gonçalves et al. (2004) identificaram o DNA do parasito no líquido cefalorraquidiano de cães

naturalmente acometidos pela doença, sugerindo que há passagem de parasitos ou fragmentos destes pela barreira hematoencefálica.

Mais recentemente, Márquez et al. (2012) descreveram a presença de *Leishmania infantum* no liquor, nervos espinhais, medula espinhal, parênquima cerebral e plexos coróides de um cão que apresentava quadro de tetraplegia, depressão e ausência de reflexos posturais. Os autores salientaram a capacidade da *Leishmania infantum* alcançar e afetar o parênquima do SNC de cães, levando a quadros de radiculoneurite, mielite e encefalite.

Em camundongos inoculados experimentalmente com *L. amazonensis* foram detectadas lesões inflamatórias no SNC caracterizadas por infiltrados inflamatórios nas meninges, compostos por células mononucleares e neutrófilos. Embora o parasito não tenha sido detectado nas meninges, este foi encontrado no parênquima cerebral, no interior de macrófagos, mastócitos, linfócitos e em polimorfonucleares. Os autores concluíram que a *L. amazonensis* foi capaz de atravessar a BHE e causar lesões significativas no SNC (ABREU-SILVA et al., 2003). Em um estudo para avaliar a infecção experimental por *L. infantum chagasi* em hamsters utilizando-se 18 animais, foi possível verificar, através do exame parasitológico direto, a presença do parasito no encéfalo de 83,3% dos animais (OLIVEIRA, et al., 2011).

Na tentativa de melhor elucidar o quadro neurológico de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, Marcondes (2008), avaliou 39 animais, dos quais 21 apresentavam sintomas neurológicos. Todos os cães possuíam alterações histopatológicas no sistema nervoso central, independente da presença ou não de sintomas neurológicos. A avaliação imunohistoquímica do SNC desses cães não permitiu a identificação de formas amastigotas de *Leishmania* sp., no entanto, em apenas quatro cães foram identificados outros agentes etiológicos que poderiam causar os sintomas neurológicos apresentados pelos animais.

Estudos anteriores demonstraram a ocorrência de lesões inflamatórias e degenerativas no SNC de cães naturalmente acometidos por LV. As alterações mais comumente observadas foram coroidite, degeneração waleriana das células de Purkinge, satellitose, degeneração neuronal, neuronofagia, leptomeningite com intenso infiltrado inflamatório e gliose, mesmo em animais sem sintomas neurológicos (GARCIA-ALONSO et al., 1996; IKEDA et al., 2007;

NIETO et al., 1996). Entretanto, os estudos realizados não puderam associar o tipo, ou a intensidade das lesões, com o tempo de evolução da doença. Como nos estudos de Ikeda et al. (2007) os cães foram submetidos à eutanásia em cumprimento a legislação brasileira, não foi possível determinar se, com a evolução da doença, apareceriam sintomas neurológicos naqueles cães que não os apresentavam, mas que possuíam alterações histopatológicas em SNC

Em outro estudo realizado com cães com LV sem sintomas neurológicos verificou-se que as células da micróglia encontravam-se em maior número na região subependimária, quando comparada com áreas corticais (MACHADO, 2010). A presença de agentes infecciosos, lesões no tecido nervoso e uma interação com linfócitos, são estímulos para a ativação da micróglia (KREUTZBERG, 1996; STREIT, 2002). A micróglia possui importante função relacionada com a restrição da disseminação de agentes infecciosos, tais como o *Toxoplasma gondii* (CHAO et al., 1993) e o *Cryptococcus neoformans* (BLASI et al., 1992). Juntamente com a ativação de astrócitos, parece estar envolvida na patogenia das lesões cerebrais em casos de malária (MEDANA, 2000). A estimulação da produção de citocinas por astrócitos e pela micróglia pode contribuir para a propagação da resposta inflamatória e imunológica no SNC (BENVENISTE, 1994).

As reações imunes que ocorrem no tecido nervoso acontecem de uma forma distinta do resto do organismo, provavelmente devido as características particulares locais. Deste modo, a relativa ausência de drenagem linfática do parênquima, de células endógenas apresentadoras de antígenos e a existência da BHE, interferem na resposta imune (MARCONDES, 2008). Schwardt (2011), avaliando cães com LV com e sem sintomas neurológicos, detectou diferenças significativas entre os dois grupos de animais no que tange a presença de linfócitos TCD3<sup>+</sup>, com evidente aumento de marcação nos animais com distúrbios neurológicos. Desta forma, a autora sugeriu que estas células participam da patogenia da doença no SNC. Tal observação foi confirmada por Melo et al. (2009).

Após a inoculação de parasitos na pele, os macrófagos infectados agem como apresentadores de antígeno, estimulando preferencialmente linfócitos T auxiliares do subtipo Ta1, que participam da resposta imune celular, ou Ta2,

que estimulam o desenvolvimento de resposta imune humoral (LOPEZ et al., 1996; NOLI, 1999).

Quando ativadas, as células Ta1 produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), as interleucinas IL-2, IL 6 e IL12 e o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), um potente indutor da formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos. Esses radicais livres são tóxicos para os parasitas, podendo levar ao controle do parasitismo, com eliminação da infecção. A IL-12, liberada no início do processo inflamatório, desempenha um papel crucial no controle da doença, já que influencia a resposta imune inata e a subsequente ativação de células TCD4<sup>+</sup> do tipo Ta1 (ABBAS et al., 2008; PINELLI et al., 1999; WEAVER et al., 2007).

Por outro lado, quando a infecção induz a uma resposta de linfócitos Ta2, há síntese de citocinas anti-inflamatórias como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-13, bem como o fator de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), com subsequente proliferação de linfócito B e produção de anticorpos (MARTÍNEZ-MORENO et al., 1995; SANTOS-GOMES et al., 2002; WEAVER et al., 2007). A produção de anticorpos, principalmente IgG, é elevada e promove mais danos do que proteção ao hospedeiro, devido à formação de grande quantidade de imunocomplexos circulantes, que se depositam em vários órgãos e tecidos (ABBAS et al., 2008; PINELLI et al., 1999).

Em um estudo realizado por Melo (2012), cujo objetivo era detectar a expressão gênica de citocinas no SNC de cães com LV, verificou-se um incremento na expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , aliada à diminuição na expressão gênica das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ . Desta forma, conclui-se que mesmo animais com LV sem sintomas neurológicos possuem um ambiente de caráter pró-inflamatório no SNC.

Nas infecções causadas por protozoários, citocinas e quimiocinas podem cruzar a BHE e provocar alterações no tecido nervoso ou, ainda, antígenos solúveis de patógenos podem atravessar a barreira e estimular a produção de citocinas e quimiocinas por astrócitos e pela micróglia (HUNT et al., 2006; MEDANA et al., 1997).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de enzimas com atividade proteolítica, que diferem entre si estruturalmente e em



sua habilidade em degradar um grupo particular de proteínas da matriz extracelular (MEC), como por exemplo as gelatinases dos tipos 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9) (MANDAL et al., 2003; ROSEMBERG, 2002). Um estudo envolvendo a MMP-9 em cães com LV verificou que a forma ativa da enzima encontrava-se em maior quantidade no liquor dos animais doentes, quando comparado ao grupo controle, sugerindo que uma maior quantidade das MMPs pode facilitar a entrada de células inflamatórias ou de outros fatores que participam do desenvolvimento de lesões encefálicas (MARANGONI, 2011). No liquor de cães com LV com sintomas neurológicos a forma ativa da MMP-2 foi encontrada em maior quantidade quando comparada a cães sem LV (MELO et al., 2012). A análise da atividade gelatinásica da MMP-9 em cães com LV, com e sem sintomas neurológicos, não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos; porém, sua atividade foi maior do que a observada em animais sem a doença (MACHADO et al., 2010).

A forma mais segura de diagnóstico de LVC é a observação direta de formas amastigotas do parasito em esfregaços de órgãos linfóides. A especificidade deste método é virtualmente 100% entretanto, dependendo do tempo de evolução da doença e da presença ou não de sintomas, a sensibilidade diminui. Ela depende da carga parasitária e do tipo de material biológico coletado. Este problema pode ser solucionado com a utilização de técnicas mais sensíveis tais, como a imunohistoquímica. Nessas técnicas, imunoglobulinas conjugadas a enzimas são utilizadas para identificar antígenos em cortes histológicos ou em exames citológicos. O alto grau de contraste obtido entre os parasitos e as células hospedeiras permite um rápido diagnóstico da infecção, mesmo quando o número de parasitos é baixo (FEITOSA et al., 2000; IKEDA et al., 2007; LAURENTI, 2009). Entretanto, apesar da IHQ apresentar uma elevada sensibilidade, Xavier et al. (2006), demonstraram que a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresentou maior sensibilidade do que esta na detecção do parasito em fragmentos de pele de cães com LV. Enquanto a primeira identificou 90% dos animais infectados, a IHQ só revelou imunomarcção para leishmanias em 68% dos cães.

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes, utilizando técnicas sorodiagnósticas tais como a imunofluorescência indireta (RIFI) (ALVES; BEVILACQUA, 2004; METTLER et al., 2005) e o ensaio imunoenzimático

(ELISA) (LAURENTI et al., 2005; VERCAMMEN et al., 1997), constitui-se num instrumento essencial para o diagnóstico da LVC. Animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral e, portanto, produzem geralmente altos títulos de anticorpos. Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e falham em detectar cães infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, cães que nunca farão soroconversão, e cães soropositivos que se convertem em soronegativos, mas ainda permanecem infectados (FEITOSA et al., 2000; IKEDA et al., 2007).

Técnicas moleculares também podem ser utilizadas no diagnóstico da leishmaniose visceral. A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, aspirados de linfonodos, baço e fígado, biopsias cutâneas, conjuntiva, sangue, liquor e em cortes histológicos de tecidos parafinados e congelados (LOMBARDO et al., 2012; MAIA et al., 2009; NUNES et al., 2007; QUARESMA et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). A escolha do tecido onde será realizada a pesquisa do DNA do parasito influencia a sensibilidade da reação. 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; PALTRINIEIRI et al., 2010).

A PCR em Tempo Real (qPCR) apresenta maior sensibilidade do que a PCR convencional. Como utiliza um sistema fechado, o risco de contaminação das amostras é menor, elevando também a especificidade do teste. Essa técnica permite amplificar quantidades muito menores de DNA, tais como  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  DNA do parasito por mL, o que corresponde a menos de um parasito por mL de amostra (CARSON et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2009; FRANCINO et al., 2006; PRINA et al., 2007).

Em um estudo na Espanha avaliando 92 bolsas de sangue para transfusão, oriundas de cães de área endêmica que apresentavam sorologia negativa para LV, identificou-se o DNA do parasito por PCR em Tempo Real em 19,6% das mesmas, salientando a importância da associação das duas técnicas para a detecção de infecção por *Leishmania* sp. (TABAR et al., 2008).

Outra evidência da grande sensibilidade da PCR em Tempo Real na detecção do parasito foi obtida por meio de um estudo onde 100% dos animais infectados foram identificados por PCR, 74% por meio de cultura e 33% em exame direto por microscopia, utilizando-se aspirado de medula óssea de cães (SILVA et al., 2010).

A comparação das técnicas de PCR convencional e PCR em Tempo Real para a detecção da presença de DNA do parasito no sangue de cães e de seus ectoparasitos como *Ctenocephalides felis*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Heterodoxus spiniger* também demonstrou que a segunda apresenta maior eficiência (MORAIS, et al., 2012).

Durante infecções naturais, múltiplos métodos diagnósticos devem ser utilizados, já que uma única técnica não identifica todos os animais infectados (MAIA; CAMPINO, 2008; MIRÓ et al., 2008; REITHINGER et al., 2002). De maneira geral a técnica de PCR é mais eficiente em detectar estágios iniciais de infecções, enquanto a sorologia é melhor para diagnosticar estágios mais avançados. No entanto, a sensibilidade da PCR se eleva quando a pesquisa é realizada em órgãos linfoides, tais como o baço e fígado (NASCIMENTO, 2011; PALTRINIERI et al., 2010; SOLCÁ et al., 2012).

Uma vantagem da PCR em Tempo Real é a possibilidade de quantificar o número de cópias de DNA presente em diferentes amostras biológicas, fornecendo uma importante informação quanto à carga parasitária (AOUN et al., 2009, CAVALCANTI et al., 2009; FERREIRA et al., 2012; FRANCINO et al., 2006, PRINA et al., 2007; QUARESMA et al., 2009; SOLCÁ et al., 2012; TABAR et al., 2008). Desta forma, tem sido utilizada para avaliar a carga parasitária em vários tecidos de seres humanos e animais, na tentativa de determinar o papel de diferentes espécies como possíveis reservatórios da doença (JULIÃO, 2011; NASCIMENTO, 2011). Além disso, pode ser utilizada para monitorar a carga parasitária durante o tratamento da doença (ANDRADE et al., 2011; MANNA et al., 2004; MANNA et al.; 2008; MARY et al, 2004; PRINA et al., 2007). A PCR em Tempo Real tem sido descrita como um teste de alta confiabilidade para ser utilizada como marcador de prognóstico em pacientes humanos portadores de LV submetidos à quimioterapia ou infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Nestes casos, a imunossupressão pode levar a um aumento da parasitemia, que necessita ser

monitorada através da quantificação parasitária no decorrer do tratamento (MARY et al., 2004; PRINA et al., 2007).

Um estudo realizado por Nascimento (2011), avaliou por meio de qPCR, diferentes amostras biológicas de cães naturalmente acometidos por LV com e sem sintomas da doença. A autora verificou que a carga parasitária no sangue periférico dos animais não ultrapassou  $10^3$  parasitos/mL, sendo mais comumente detectados de um a 10 parasitos/mL. A carga parasitária em *swabs* de conjuntiva ocular foi semelhante à encontrada no sangue periférico. Por outro lado, em pele, medula óssea e linfonodos foram identificados mais de  $10^4$  parasitos/mL, com os maiores valores detectados em aspirado de linfonodo.

Em outro estudo, que utilizou 44 cães com sinais clínicos de leishmaniose visceral, comparou-se a carga parasitária por meio da qPCR em amostras de sangue periférico e de aspirado de medula óssea coletadas simultaneamente. A quantidade de amastigotas de *Leishmania* sp. foi de quatro a 5000 vezes maior na medula óssea do que no sangue periférico. Na primeira, foram detectados de 13 a 12.287.840 de parasitos/mL, enquanto no sangue os valores variaram de sete a 14.000 parasitos/mL (FRANCINO et al., 2006).

De forma semelhante, Quaresma et al. (2009), ao compararem a carga parasitária no sangue e aspirado de medula óssea de cães com LV, relataram que os maiores valores foram observados na medula óssea, sem diferenças entre animais sintomáticos e assintomáticos. A técnica de qPCR foi capaz de detectar quantidades de DNA tão baixas quanto 0,1fg/ $\mu$ L.

Em um estudo realizado na Itália por Manna et al. (2008), avaliando a carga parasitária de diferentes órgãos em 18 cães naturalmente infectados por LV, antes e após tratamento, verificou-se que, no momento do diagnóstico a carga parasitária em aspirados de linfonodos e na pele variou de 1000 a mais de 10.000 parasitos/mL. Por outro lado, no sangue total as quantidades variaram de um a 1000 parasitos/mL.

Embora muitos autores tenham realizado a detecção de *Leishmania* sp. em cães infectados através do método da PCR em Tempo Real, poucos são os estudos que avaliaram a carga parasitária em diferentes tecidos (CARSON et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2009; FERREIRA et al., 2012; FRANCINO et al., 2006; NASCIMENTO, 2011; QUARESMA et al., 2009) e, até onde é de nosso conhecimento, não existem relatos na literatura de determinação da mesma no sistema nervoso central de cães ou seres humanos com LV.

### 3. OBJETIVOS

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo pesquisar, por meio da PCR em Tempo Real, a presença de DNA e determinar a carga parasitária de *Leishmania* sp. no encéfalo de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS:

### 4.1 Animais

Vinte e quatro cães, 14 fêmeas e 10 machos, com idade variando entre um e oito anos, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, foram incluídos no presente estudo. Todos animais foram encaminhados para atendimento clínico no Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, câmpus de Araçatuba, área endêmica para a doença. Dois cães, com ausência de anticorpos séricos anti-*Leishmania* sp. e exame parasitológico direto de órgãos linfoides negativo para presença de formas amastigotas do parasito, cuja morte não foi relacionada com envolvimento neurológico, foram incluídos como grupo controle.

Os animais com leishmaniose visceral foram subdivididos em dois grupos experimentais: o primeiro constituído por 22 cães sem evidências de comprometimento neurológico, e o segundo por dois cães com sintomas neurológicos. O diagnóstico de LV baseou-se nos resultados da pesquisa de formas amastigotas do parasito por meio de exame citológico de punção biopsia aspirativa de linfonodos ou de medula óssea.

Após o diagnóstico da doença e realização de exame físico e neurológico, os cães foram submetidos à eutanásia, autorizada pelos proprietários, em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Senado Federal, que estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser sacrificados. A eutanásia foi realizada de acordo com a Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012). Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico<sup>1</sup> e posteriormente receberam uma dose letal de cloreto de potássio<sup>2</sup> por via intravenosa.

---

<sup>1</sup> Hypnol 3%, Fontoveter, Itapira, SP, Brasil

<sup>2</sup> Cloreto de Potássio 19,1%, Darrow, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

## **4.2. Exame citológico de linfonodos e medula óssea**

O exame citológico dos linfonodos poplíteos ou pré-escapulares foi realizado após colheita do material por meio de punção biopsia aspirativa, com uma agulha hipodérmica 25X7 mm acoplada a uma seringa de 10mL. A colheita de medula óssea foi realizada com agulha hipodérmica 40X16 mm, acoplada a uma seringa de 10mL, mediante punção na crista ílíaca, com os animais contidos em decúbito lateral. Os esfregaços foram realizados imediatamente após a colheita, secos ao ar, corados com corante hematológico de rotina<sup>3</sup> e observados em microscópio óptico com objetiva de 100X, para realização da pesquisa de forma de amastigotas de *Leishmania* sp.

## **4.3. Colheita de material do sistema nervoso central**

Todos os cães foram necropsiados pela técnica empregada rotineiramente no Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, câmpus de Araçatuba. O encéfalo foi retirado da cavidade craniana e foram colhidos fragmentos de aproximadamente 1cm<sup>3</sup> das seguintes regiões: meninges, córtex frontal, tálamo, cerebelo, ventrículos laterais e plexo coroide dos ventrículos laterais e do quarto ventrículo. Os fragmentos foram armazenados em solução preservadora de RNA<sup>4</sup>, mantidos por 24 horas a 4°C e então a -20°C até o processamento das amostras.

## **4.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para pesquisa de DNA de *Leishmania* sp.**

### **4.4.1.Extração do DNA**

Após descongelamento em temperatura ambiente, as amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando-se kit comercial<sup>5</sup>. Em um tubo cônico

---

<sup>3</sup> Panótico Rápido- Laborclin- Curitiba, PR

<sup>4</sup> RNAlater AM7020, Applied Biosystems®, Austin, TX, USA

<sup>5</sup> QIAamp DNA Mini Kit Blood and Tissue, QIAGEN, Valencia, CA, USA

de plástico de 1,5 mL foram colocados aproximadamente 4mg de cada um dos fragmentos do encéfalo do mesmo animal. Estes foram macerados mecanicamente com auxílio de um pistilo até a obtenção de uma amostra homogênea de cerca de 25mg de material do encéfalo. Em seguida o material foi processado através da utilização do kit comercial<sup>6</sup> segundo as recomendações do fabricante.

#### 4.4.2. Quantificação e pureza do DNA

O DNA total foi quantificado em espectrofotômetro<sup>7</sup> e somente amostras com valor da relação de absorbância no comprimento de onda 260/280 entre 1,8 e 2,0 foram incluídas nas análises subsequentes. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento da realização da PCR em Tempo Real.

#### 4.4.3. Determinação da curva padrão

A curva padrão para posterior quantificação da carga parasitária foi determinada utilizando-se DNA de *L. infantum chagasi* (cepa MHOM/BR/72/LD46) extraído de  $1,6 \times 10^7$  promastigotas/mL, pelo método do fenol-clorofórmio. As promastigotas foram submetidas a cinco ciclos de congelamento e descongelamento (1' em nitrogênio líquido seguido de 2 min a 56°C). Na sequência, realizou-se a incubação com tampão de lise contendo acetato de sódio (200 mM), SDS (10%, p/v) e proteinase K<sup>8</sup> (20 µg/mL) por 1 hora a 56°C sob agitação. As promastigotas foram então tratadas com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)<sup>9</sup> e o DNA foi precipitado em etanol absoluto gelado e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM). Sete diluições seriadas (de  $1,6 \times 10^4$  a  $1,6 \times 10^{-2}$  promastigotas/mL) foram realizadas para composição da curva. Através da obtenção dos Thresholds cycles (Cts) das amostras pela curva de ampliação de DNA (figura 2), foi realizada uma regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se os Cts como variáveis dependentes, e Log 10 da

---

<sup>6</sup> QIAamp DNA Mini Kit Blood and Tissue, QIAGEN, Valencia, CA, USA

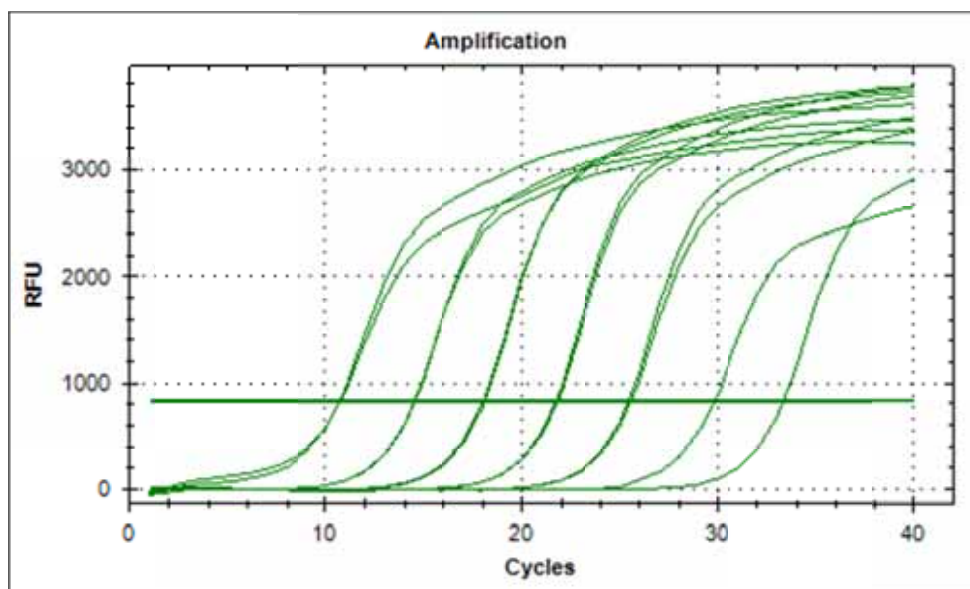
<sup>7</sup> NanoDrop ND-1000, Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE, USA

<sup>8</sup> P2308, Sigma- Aldrich®, Saint Louis, MO, USA

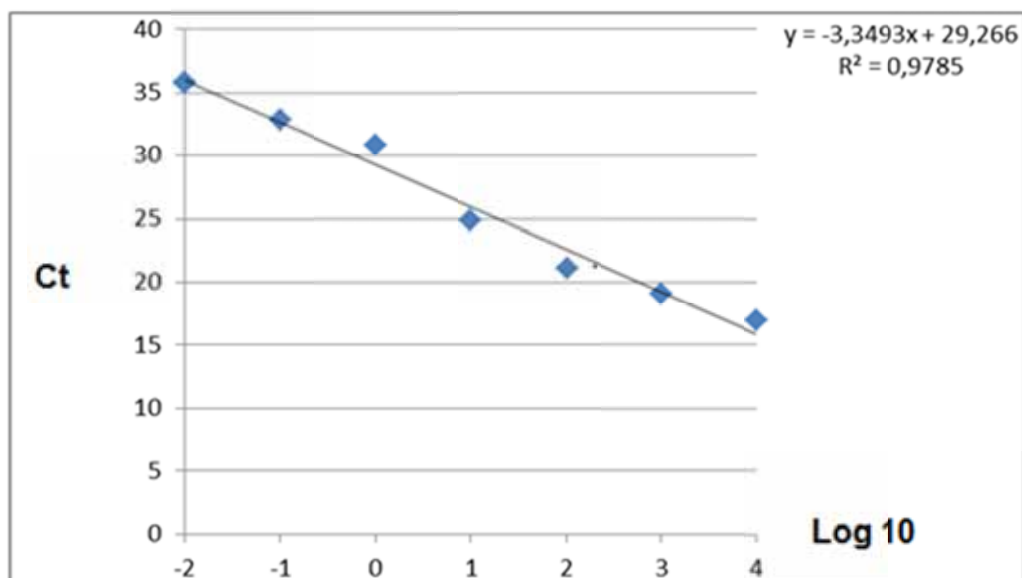
<sup>9</sup> P3803, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA



diluição como variável preditiva. A eficiência da curva foi de 98,8%, o coeficiente de determinação foi de 0,978 e o coeficiente angular foi de -3,3493. O gráfico representativo da curva padrão encontra-se apresentado na figura 3. Por meio da equação da curva padrão determinou-se que amostras com Ct acima de 29,26 seriam consideradas negativas.



**Figura 2:** Curvas de ampliação do DNA de *L. infantum chagasi* obtido em diluições seriadas de  $1,6 \times 10^4$  a  $1,6 \times 10^{-2}$  promastigotas/mL



**Figura 3:** Curva padrão obtida pela realização de diluições seriadas de  $1,6 \times 10^4$  a  $1,6 \times 10^{-2}$  promastigotas/mL de *Leishmania infantum chagasi*

#### 4.4.4. PCR em Tempo Real

Para a amplificação do DNA de *Leishmania* sp. foram selecionados os oligonucleotídeos iniciadores senso (5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3') e anti-senso (5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3') que amplificam um fragmento de 116 pb do minicírculo do kDNA de *Leishmania* (RANASINGHE et al., 2008).

A reação de PCR em Tempo Real foi realizada utilizando-se um mastermix comercial com o fluoróforo SYBR Green<sup>10</sup>, 900 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 5µL de DNA, num volume total de 25µL. As amostras, em triplicata, foram amplificadas em termociclador<sup>11</sup> com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto, momento onde os dados de fluorescência foram coletados. Na sequência, as amostras foram submetidas a uma curva de dissociação (*melt curve*), de 60°C até 95°C, com incremento de 0,5°C a cada 5 segundos. Um valor de Ct foi calculado para cada amostra, pela determinação do ponto onde a fluorescência ultrapassou o limiar de detecção.

Em cada placa de PCR acrescentou-se um controle negativo de reação, em triplicata, constituído pelo mastermix acrescido de água livre de nucleases substituindo a amostra; dois controles negativos em triplicata, constituídos de amostras de SNC de cães não infectados por *Leishmania* sp. e, um controle positivo, em triplicata, constituído por promastigotas de *L. infantum chagasi* cepa MHOM/BR/72/LD46 na diluição de 1,6x 10<sup>4</sup>/ mL.

---

<sup>10</sup> SYBR® Green JumpStart Taq ReadMix S4438, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA.

<sup>11</sup> CFX96TM Real-Time System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Animais

As alterações observadas ao exame físico nos animais com leishmaniose visceral encontram-se apresentadas no quadro 1. Os sintomas mais comumente observados foram caquexia, afecções dermatológicas, onicogribose, linfadenomegalia e alterações oftálmicas.

**Quadro 1-** Alterações clínicas observadas durante o exame físico de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, sem (C1 a C22) e com (N1 e N2) evidências de alterações neurológicas.

ANIMAIS	ALTERAÇÕES CLÍNICAS
C1	Caquexia, letargia, turgor cutâneo diminuído, alterações dermatológicas, secreção nasal muco purulenta
C2	Caquexia, letargia, palidez de mucosas, alterações dermatológicas, onicogribose
C3	Linfadenomegalia, alterações dermatológicas
C4	Caquexia, letargia, alterações dermatológicas, onicogribose, esplenomegalia, secreção ocular muco purulenta bilateral, otite externa bilateral
C5	Caquexia, linfadenomegalia, alterações dermatológicas, onicogribose, epistaxe
C6	Caquexia, palidez de mucosa, alterações dermatológicas, onicogribose, esplenomegalia
C7	Linfadenomegalia, alterações dermatológicas, onicofrigose, secreção ocular bilateral, úlcera de córnea, edema de membros, edema articular, equimose em mucosa oral, úlcera em ponta de língua, esplenomegalia
C8	Caquexia, linfadenomegalia, secreção ocular bilateral muco purulenta
C9	Caquexia, linfadenomegalia, alterações dermatológicas, onicogribose
C10	Linfadenomegalia, alterações dermatológicas, secreção ocular bilateral
C11	Caquexia, letargia, linfadenomegalia, secreção ocular bilateral, onicogribose

continua

continuação

<b>C12</b>	Caquexia, alterações dermatológicas, onicogribose, secreção ocular bilateral, esplenomegalia
<b>C13</b>	Caquexia, linfadenomegalia, mucosa oral hipocorada, úlcera em cavidade oral, onicofrigose
<b>C14</b>	Caquexia, secreção ocular bilateral, úlceras hemorrágicas em cavidade oral
<b>C15</b>	Caquexia, linfadenomegalia, secreção mucosa ocular bilateral, onicogribose
<b>C16</b>	Alterações dermatológicas, onicogribose
<b>C17</b>	Caquexia, alterações dermatológicas, esplenomegalia
<b>C18</b>	Caquexia, alterações dermatológicas
<b>C19</b>	Alterações dermatológicas
<b>C20</b>	Caquexia, alterações dermatológicas, onicogribose
<b>C21</b>	Assintomático
<b>C22</b>	Assintomático
<b>N1</b>	Letargia, linfadenomegalia, alterações dermatológicas, ataxia, tremor de intenção, hipermetria
<b>N2</b>	Alterações dermatológicas, ataxia e tremor de intenção.

## 5.2 Quantificação e pureza do DNA

A quantidade total de DNA extraído das amostras de sistema nervoso central variou de 31.3 a 104.1 ng/ $\mu$ L e o valor da absorbância de 1.89 a 1.98. Os valores individuais encontram-se apresentados no quadro 2.

**Quadro 2:** Resultados individuais da quantidade total de DNA extraído das amostras de sistema nervoso central, e os respectivos valores de absorvância, de cães com leishmaniose visceral sem (C1 a C22) e com (N1 e N2) evidências de alterações neurológicas, e de cães do grupo controle.

<b>Animal</b>	<b>Quantidade de DNA (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Absorvância</b>
<b>C1</b>	49.0	1.93
<b>C2</b>	54.2	1.93
<b>C3</b>	76.7	1.89
<b>C4</b>	62.2	1.97
<b>C5</b>	70.9	1.93
<b>C6</b>	79.1	1.96
<b>C7</b>	76.9	1.97
<b>C8</b>	83.6	1.95
<b>C9</b>	71.4	1.95
<b>C10</b>	33.7	1.95
<b>C11</b>	62.8	1.98
<b>C12</b>	67.0	1.89
<b>C13</b>	57.2	1.91
<b>C14</b>	50.6	1.92
<b>C15</b>	39.9	1.94
<b>C16</b>	44.0	1.89
<b>C17</b>	40.5	1.89
<b>C18</b>	50.4	1.98
<b>C19</b>	42.2	1.97
<b>C20</b>	31.3	1.97
<b>C21</b>	36.7	1.97
<b>C22</b>	84.8	1.93
<b>N1</b>	56.7	1.98
<b>N2</b>	35.0	1.97
<b>Controle 1</b>	104.1	1.89
<b>Controle 2</b>	61.1	1.95

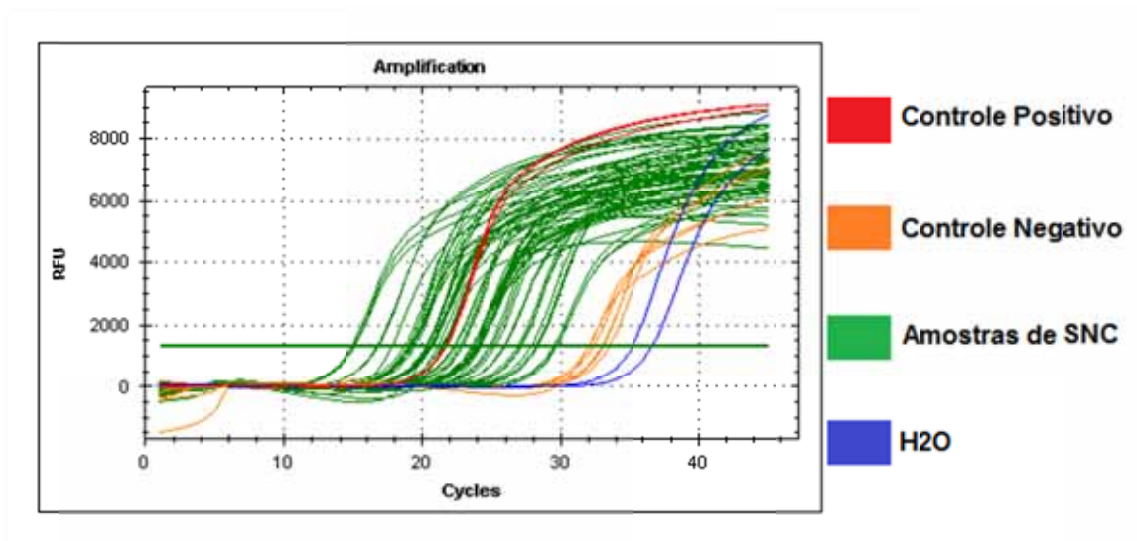
### 5.3 PCR em Tempo Real

Ocorreu a amplificação do DNA de *Leishmania* sp. no encéfalo de 23/24 (95,8%) cães. Somente em um animal (C5), sem alterações neurológicas, não foi amplificado o DNA do parasita.

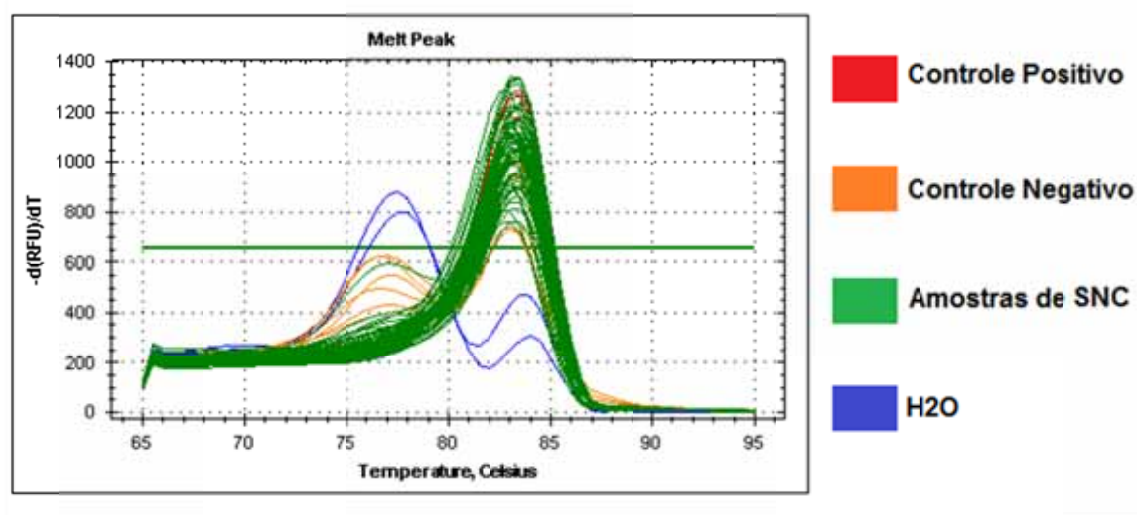
O gráfico de amplificação das amostras encontra-se apresentado na figura 4. Os resultados individuais dos Cts, em triplicata, de cada uma das amostras avaliadas encontram-se dispostos no Anexo 1. Em casos onde um dos valores apresentava uma disparidade em relação aos outros dois, este foi excluído do cálculo. Os valores médios dos Cts de cada animal estão dispostos no quadro 3.

Não houve amplificação de DNA nos cães do grupo controle ou nos controles negativos da reação. A curva de dissociação (*Melt Curve*) indicou a formação de primer-dimer (Figura 5).

A partir da equação preditiva obtida por meio da curva-padrão, foi possível quantificar a presença do DNA de *Leishmania* sp. no sistema nervoso central dos animais avaliados. A concentração estimada de promastigotas por mL foi obtida por meio da exponenciação de Log na base 10. A carga parasitária encontrada no SNC dos cães variou entre 2 e 16.964 amastigotas/mL (quadro 3), com a mediana de 116 parasitos/mL, média e desvio padrão de  $1.166 \pm 3546$  parasitos/mL. A média de parasitos nos cães com LV com alterações neurológicas, nos animais sintomáticos sem alterações neurológicas e nos assintomáticos foi, respectivamente, 2.010, 1.119 e 772 parasitos/mL.



**Figura 4:** Curva de ampliação de DNA de *Leishmania* sp. em amostras de encéfalos de cães com leishmaniose visceral.



**Figura 5:** Curva de dissociação (*Melt Curve*) da amplificação de DNA de *Leishmania* sp. em amostras de encéfalo de cães.

**Quadro 3:** Resultados individuais dos valores médios do Threshold cycle (Ct) e da carga parasitária de *Leishmania* sp. no encéfalo de cães acometidos por leishmania visceral sem (C1- C22) e com (N1 – N2) sintomas neurológicos.

<b>Animais</b>	<b>Média dos Cts</b>	<b>Carga parasitária (amastigotas/mL)</b>
<b>C1</b>	24,15	33
<b>C2</b>	19,22	998
<b>C3</b>	23,65	47
<b>C4</b>	22,34	116
<b>C5</b>	29,64	AUSENTE
<b>C6</b>	23,77	43
<b>C7</b>	15,10	16.964
<b>C8</b>	26,21	9
<b>C9</b>	20,67	368
<b>C10</b>	24,18	33
<b>C11</b>	23,72	45
<b>C12</b>	20,91	312
<b>C13</b>	20,88	319
<b>C14</b>	24,06	35
<b>C15</b>	27,10	4
<b>C16</b>	18,96	1.194
<b>C17</b>	21,47	212
<b>C18</b>	22,16	81
<b>C19</b>	28,16	2
<b>C20</b>	20,35	459
<b>C21</b>	19,69	722
<b>C22</b>	19,50	823
<b>N1</b>	17,20	4.004
<b>N2</b>	25,08	17



## 6. DISCUSSÃO

Dos cães avaliados neste estudo, 91,7% (22/24) apresentavam sintomas da doença ao exame físico tais como caquexia, linfadenomegalia, lesões oculares e lesões cutâneas, comumente observados em animais acometidos por leishmaniose visceral, concordando com os relatos de Baneth; Solano-Gallego (2012) e Nascimento (2011).

Embora a LVC seja uma doença multisistêmica, a literatura a respeito de animais com comprometimento neurológico é escassa. Os sintomas neurológicos observados nos dois animais com LV do presente estudo sugerem comprometimento cerebelar, devido à presença de tremor de intenção e ataxia em ambos, associados à hipermetria em um deles. Como não foram realizados exames complementares para excluir a possibilidade de co-infecção por outros agentes infecciosos, tais como o vírus da cinomose ou o *Toxoplasma gondii* (LORENZ; KORNEGAY, 2006), que poderiam estar associados ao desenvolvimento dos transtornos neurológicos, não é possível afirmar que os sintomas eram decorrentes exclusivamente da LV. Entretanto, fica evidente que, em áreas endêmicas para a doença, cães com disfunção neurológica devem ser investigados quanto a uma possível infecção por *L. infantum chagasi*, mesmo quando da ocorrência de outras doenças infecciosas. Em um estudo realizado por Marcondes (2008), utilizando 21 cães com LV e alterações neurológicas, a autora verificou que somente quatro animais apresentavam comorbidades que poderiam justificar os sintomas neurológicos destes. Nos outros cães o desenvolvimento de alterações neurológicas ocorreu, provavelmente, em decorrência da leishmaniose visceral. Tais achados chamam a atenção para o risco de sub diagnóstico da doença.

Em 23 cães do presente estudo identificou-se a presença de DNA de *Leishmania* sp. no SNC, o que discorda dos achados de Dias et al (2010), Marcondes (2008) e Schwardt (2011), que não conseguiram identificar o parasito no tecido nervoso de cães com LV, mesmo quando da presença de sintomas neurológicos. A discrepância entre tais resultados pode ser decorrente do método empregado na detecção do parasito. Enquanto na presente pesquisa utilizou-se a PCR em Tempo Real, nos estudos anteriores a

técnica empregada foi a imunohistoquímica que, de acordo com Xavier et al. (2006), apresenta sensibilidade inferior à PCR.

Entretanto, a amplificação do DNA do parasito em 96% dos cães corrobora os achados de Nieto et al. (1996) e Viñuelas et al. (2001), que evidenciaram formas amastigotas no SNC de cães com LV e propuseram que estas seriam responsáveis pelas alterações histopatológicas encefálicas identificadas nos animais.

Apesar da PCR ser uma técnica altamente sensível e específica, há que se considerar que esta amplifica fragmentos de DNA (AOUN et al., 2009; NASCIMENTO, 2011), não indicando necessariamente que exista a presença do parasito íntegro no local. Desta forma, o fato de vários autores (IKEDA et al., 2007; MARDONDES, 2008; MELO et al., 2009; SCHWARDT, 2011) não terem identificado o parasito no tecido nervoso pode refletir diferentes respostas imunes do hospedeiros e, não só, uma menor sensibilidade da técnica empregada. Os parasitos podem penetrar no SNC destes cães e, devido a uma resposta imune celular, no momento da avaliação histopatológica não ser possível identifica-los, fato que foi sugerido por Ikeda et al. (2007), que encontraram somente marcações antigênicas no interior de vasos sanguíneos encefálicos de cães com LV.

Os resultados de estudos pretéritos realizados por Garcia-Alonso et al. (1996), Lima et al. (2003), Feitosa et al. (2005) e Melo et al. (2009), também sugerem que o parasito penetra no tecido nervoso, uma vez que os autores identificaram anticorpos anti-*Leishmania* sp no liquor de cães com LV, inclusive em quantidades superiores às dos anticorpos séricos (LIMA et al., 2003), sugerindo uma produção local e não só uma quebra da BHE.

A carga parasitária observada no sistema nervoso central dos cães do presente estudo foi de 2 a 16.964 amastigotas/mL, variação esta também identificada por Francino et al. (2006), Manna et al. (2008), Nascimento (2011) e Quaresma et al. (2009), em diferentes órgãos de cães com LV. Apesar do número de cães com alterações neurológicas ter sido pequeno (dois animais), não permitindo a realização de uma análise estatística, verifica-se que os cães com alterações neurológicas apresentaram uma média de amastigotas/mL aproximadamente duas vezes superior a de cães sintomáticos e, três vezes maior do que a média observada nos cães assintomáticos com LV, sugerindo

uma possível participação do parasito na etiopatogenia das lesões neurológicas.

Até onde é de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a carga parasitária de *Leishmania* sp. no sistema nervoso central de cães com LV. A comparação dos resultados obtidos no presente estudo com aqueles descritos por Nascimento (2011), faz crer que o DNA amplificado nestes animais não deve ser proveniente de sangue periférico, por uma quebra da barreira encefálica, ou de capilares presentes nas áreas avaliadas.

Enquanto a autora afirmou que na maioria dos 98 cães avaliados a carga parasitária no sangue periférico foi de um a 10 parasitos/mL, não ultrapassando 1000 parasitos/mL; no presente estudo o valor médio de amastigotas/mL foi de 1.166, chegando a atingir valores de 16.964 parasitos/mL. Tais resultados são também superiores aos descritos por Francino et al. (2006) e Manna et al. (2008). Enquanto os primeiros identificaram um máximo de 1000 parasitos/mL em 86,6% dos cães avaliados, os últimos verificaram que em nenhum cão a carga parasitária foi superior a 1000 parasitos/mL de sangue periférico. Na dependência do tempo de evolução da LV, a chance de amplificação do DNA de *Leishmania* sp. no sangue periférico é reduzida, comparativamente a outros órgãos, tais como medula óssea e linfonodos (PALTRINIERI et al., 2010). Isto se deve ao fato de que a parasitemia diminui à medida que o parasito se dissemina pelo organismo, atingindo outros órgãos.

No que diz respeito aos animais com alterações neurológicas e sintomas compatíveis com lesão cerebelar, não foi possível determinar se havia uma diferença de carga parasitária entre os vários fragmentos de SNC, uma vez que a PCR foi realizada agrupando-se todas as regiões coletadas. Quando do delineamento experimental, optou-se por trabalhar desta forma já que o objetivo não era determinar em que região o DNA do parasito estaria presente, mas sim se seria amplificado no tecido nervoso. Utilizando-se um macerado de vários fragmentos, as chances de detecção do parasito seriam maiores.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

- Existe DNA de *Leishmania* sp. no encéfalo de cães com leishmaniose visceral, mesmo na ausência de sintomas neurológicos;
- A carga parasitária de *Leishmania* sp. no encéfalo variou de 2 a 16.964 parasitos/mL, com mediana de 116 parasitos/mL e média e desvio padrão de  $1.166 \pm 3546$  parasitos/mL na população estudada.

## 8. REFEREÊNCIAS

ABBAS, A.B.; LINHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Citocinas. In: **Imunologia celular e molecular**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. P.267-301.

ABBOTT, N.J.; PATABENDIGE, A.A.K.; DOLMAN, D.E.M.; YUSOF, S.R.; BEGLEY, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiology of Disease**, v.37, n.1, p.13-25, 2009.

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; TEDESCO, R.C.; MORTARA, R.A.; COSTA, S.C. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.6, p.661-665, 2003.

ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Novo Mundo. **Publicações Médicas**, n.196, p.71-87, 1956.

ALEXANDRE-PIRES, G.M.; CORREIA, J.J. Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In: SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I.P. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira, 2008. p.53-67.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.1, p.259-265, 2004.

ANDRADE, H.M.; TOLEDO, V.P.; PINHEIRO, M.B.; GUIMARÃES, T.M., OLIVEIRA, N.C.; CASTRO, J.A.; SILVA, R.N.; AMORIM, A.C.; BRANDÃO, R.M.; YOKO, M.; SILVA, A.S.; DUMONT, K.; RIBEIRO, M.L.; BARTCHEWSKY, W.; MONTE, S.J. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (=L. chagasi) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.181, n.2-4, p.83-90, 2011.

AOUN O.A.; MARY, B.C.; ROQUEPLO, C.C.; MARIE, C.J.; TERRIER C.O.; LEVIEUGE, C.A.; DAVOUST, B. Canine leishmaniasis in south-east of France:

screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. **Veterinary Parasitology**, v.166, n.1-2, p.27–31, 2009.

BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiology of Diseases**, v.16,n.1, p.1-13, 2004.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Canine Leishmaniasis. In: Greene, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. p.735-748.

BENVENISTE, E.N.; KWON, J.; CHUNG, W. J.; SAMPSON, J.; PANDAY, K.; TANG, L.P. Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF- $\beta$ . **The Journal of Immunology**, v.153, n.11, p.5210-5221, 1994.

BLASI, E.; BARLUZZI, R.; MAZZOLLA, R.; MOSCI, P.; BISTONI, F. Experimental modelo of intracerebral infection with *Criptococcus neoformans*: role of phagocytes and opsonization. **Infection and Immunity**, v.60, n.9, p.3682-3688, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Aspectos epidemiológicos**. 2012. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv\\_obitos\\_05\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_obitos_05_09_11.pdf)>. Acesso em: 25 de set. 2012.

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

CARSON, C.; QUINNELL, R.J.; HOLDEN, J.; GARCEZ, M.L.; DEBORGGRAEVE, S.; COURTENAY, O. Comparison of *Leishmania* Oligo C-TesT PCR with conventional and real-time PCR for the detection of canine

Leishmania infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n.9, p.3325-3330, 2010.

CASTRO, A.G.; SILVA, A.R.; COSTA, C.H.N.; SCHERLOCK, I. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar): normas técnicas**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86 p.

CAVALCANTI, M.P.; BRITO, M.E.F.; SOUZA, W.V.; GOMES, Y.M.; ABATH, F.G.C. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v.182, n.2, p. 356–358, 2009.

CHAO, C.C.; ANDERSON, W.R.; HU, S.H.; GEKKER, G.; MARTELLA, A.; PETERSON, P.K. Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.67, n.2, p.178-183, 1993.

CHARLIER, C.; CHRETIEN, F.; BAUDRIMONT, M.; MORDELET, E.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. **The American Journal of Pathology**, v.166, n.2, p.421-432, 2005.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº1000, de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 17 maio 2012, seção 1, p.124-125.

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, n.1-2, p.149-155, 2005.

DIAS, M.L.M.; CASTRO, M.B.; BARROS, R.M. Estudo histopatológico do sistema nervoso de animais com leishmaniose visceral canina no Distrito Federal. In: Reunião Anual da SBPC, 62., 2010, Natal. **Anais...** Natal, 2010.

DORAN, K.S.; ENGELSON, E.J.; KHOSRAVI, A.; MAISEY, H.C.; FEDTRE, I.; EQUILS, O. MICHELSEN, K.S.; PESCHEL, A.; NIZET, V. Blood-brain barrier invasion by group B Streptococcus depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n.9, p.2499-2507, 2005.

SILVA, R.N.; AMORIM, A.C.; BRANDÃO, R.M.; ANDRADE, H.M.; YOKOO, M.; RIBEIRO, M.L.; BARTCHEWSKY, W.; SOCORRO-SILVA, A.; CASTRO, J.A.; DO MONTE S.J. Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.104, n.2, p.137-143, 2010.

HUNT, N.H.; GOLENSER, J.; CHAN-LING, T.; PAREKH, S.; RAE, C.; POTTER, S.; MEDANA, I.M.; MIU, J.; BALL, H. J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v.36, n.5, p.569-582, 2006.

FEITOSA, M.M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1. 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 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**, v.5, n.28, p.36-44, 2000.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; BONELLO, F.L.; CIARLINI, P.C.; GONÇALVES, M.E.; LIMA, V.M.F.; PERRI, S.H.V. Avaliação líquórica de cães, com e sem sintomatologia neurológica naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. **Veterinária Notícias**, v.11, n.2, p.61-69, 2005.

FERREIRA, M.G.P.A.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.; LIMA, V.M.F. Potencial role of dog fleas in the cycle of *Leishmania spp.* **Veterinary Parasitology**, v.165, n.1-2, p.150-154, 2009.

FERREIRA, S.A.; LEITE, R.S.; ITUASSU, L.T.; ALMEIDA, G.G.; SOUZA, D.M.; FUJIWARA, R.T.; ANDRADE, A.S.R.; MELO, M.N. Canine skin and



conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **Plos Neglected Tropical Disease**, v.6, n. 4, e1596, 2012.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X.; GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, V.H. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.137, n.3-4, p.214–221, 2006.

GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, V.H. What is immune privilege (not)? **Trends in Immunology**, v.28, n.1, p.12-18, 2007.

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

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. 202f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 1993.

GONÇALVES, M.E.; PEREIRA, F.V.; DIAS, A.K.K.; IRIKURA, S.; NUNES, C.M.; MARCONDES, M. Detecção de DNA de *Leishmania* sp. em liquor de cães procedentes de área endêmica para leishmaniose visceral canina. In: **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 13.; Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**, 2004, Ouro Preto, Anais...

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

GRAB, D.J.; PERIDES, G.; DUMLER, J.S.; KIM, K.J.; PARK, J.; KIM, Y.V.; NIOLSKAIA, O.; CHOI, K.S.; STINS, M.F.; KIM, K.S. *Borrelia burgdorferi*, host-derived, and the blood-brain barrier. **Infection and Immunity**, v.73, n.2, p.1014-1022, 2005.

HASHIM, F.A.; AHMED, A.E.; EL HASSAN, M.; EL MUBARAK, M.H.; YAGI, H.; IBRAHIM, E.N.; ALI, M.S. Neurologic changes in visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.52, n.2, p.149-154, 1995.

HUAN, S.H.; JONG, A.Y. Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. **Cellular Microbiology**, v.3, n.5, p.277-287, 2001.

IKEDA, F.A.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; FEITOSA, M.M.; MACHADO, G.F.; PERRI, S.H.V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.1, p.5-11, 2007.

JOSÉ-LOPEZ, R.; LA FUENTE, C.D.; AÑOR, S. Presumed brain infarctions in two dogs with systemic leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53,n.9, p.554–557, 2012.

JULIÃO, F.S. **Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR *real-time*) na avaliação de reservatórios para leishmaniose visceral**. 2011 86f. Tese (Doutorado). Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

KIM, K.S. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. **The Journal of Infectious Disease**, v.186, Suppl.2, p. S220-S224, 2002.

KOUTINAS, A.F.; SCOTT, D.W.; KANTOS, V.; LEKKAS, S. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. **Vetererinary Dermatology**, v.3, n.3, p.121-130, 1992.

KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neuroscienc.**, v.19, n.8, p.312-318, 1996.

LAURENTI, M.D. Correlação entre diagnóstico parasitológico e sorológico na LVA canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.67, p.13-23, 2009.

LAURENTI, M.D.; LEMOS, E.M.; REIS, A.B.; MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; CORBETT, C.E.P.; DIETZE, R. Evaluation of Kalazar detect rapid test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 3., 2005, Italy. **Abstract book...** Italy, 2005. p.160.

LIMA, V.M.F; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinalfluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.4, p.485-489, 2003.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M.G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRÌ, A.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of Leishmania infantum DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v.184, n.1, p. 10–17, 2012.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALES, M.; GINEL, P.J.; MARTIN, E.; MOLLEDA, J.M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Zentralblatt fuer Veterinarmedizin**, v.43, n.8 p.469-474, 1996.

LOSSINSKY, A.S.; SHIVERS, R.R. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. **Histology and Histopathology**, v.19, n.2, p.535-564, 2004.

MACHADO, G.F. Avaliação imuno-histoquímica das alterações morfológicas das células gliais – astrócitos e micróglia – em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. 2010. 77f. Tese (Livre-docência). Faculdade de

Odontologia e Curso de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araçatuba, 2010.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v.158, n.4, p. 274–287, 2008.

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

MANDAL, M.; MANDAL, A.; DAS, S.; CHAKRABORTI, T.; SAJAL, C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 252, n.1-2, p. 305-329, 2003.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, LM.; GRAVINO, A.E. Real –Time PCR assay in Leishmania - infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The Veterinary Journal**, v.177, n.2, p.279-282, 2008.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R.D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, M.; GRAVINO, A.E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.125, n. 3-4, p. 251–262, 2004.

MARANGONI, N.R.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; PERRI, S.H.V.; MACHADO, G.F. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.33, n.6, p.330-334, 2011.

MARCONDES, M. **Envolvimento do sistema nervoso central na leishmaniose visceral canina**. 2008. 154f. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araçatuba, 2008.

MARCONDES, M. Leishmaniose uma zoonose. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 7., 2007, São Paulo, São Paulo, **Anais...** São Paulo, p. 211, 2007.

MARCONDES, M. Detecção de DNA de *Leishmania* sp em líquido de cães procedentes de área endêmica para leishmaniose visceral canina. In **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**. Ouro Preto, MG, 2004.

MARQUES, F.; SOUSA, J.C.; CORREIA-NEVES, M.; OLIVEIRA, P.; SOUSA, N.; PALHA, J.A. The choroid plexus response to peripheral inflammatory stimulus. **Journal of Neuroscience**, v.144, n.3, p.424-430, 2007.

MÁRQUEZ, M.; PEDREGOSA, J.R.; LÓPEZ, J.; MARCO-SALAZAR, P.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.24, n.4, p. 1234-1239, 2012.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNÁNDEZ, S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, n.3-4, p.209-220, 1995.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, n.42, n.11, p.5249-5255, 2004.

MEDANA, I. M.; CHANG-LING, T.; HUNT, N.H. Reactive changes of retinal microglia during fatal murine cerebral malaria: effects of dexamethasone and experimental permeabilization of the blood-brain barrier. **The American Journal of Pathology**, v.156, n.3 p. 1055-1065, 2000.

MEDANA, I. M.; HUNT, N.H.; CHAUDURI, G. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for

production by microglia and astrocytes. **The American Journal Pathology**, v. 150, n.4, p.1473-1486, 1997.

MELO, G.D. **Expressão gênica de citocinas no encéfalo de cães com leishmaniose visceral**. 2012. 86f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araçatuba, 2012

MELO, G.D.; MARCONDES, M.M.; MACHADO, G.F. Canine cerebral leishmaniasis: Potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.148, n.3-4, p.260 – 266, 2012.

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R.O.; MACHADO, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.162, n.3-4, p.248-256, 2009.

METTLER, M.; GRIMN, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p.5515-5519, 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, n.8, p.371-377, 2008.

MORAIS, R.C.S.; GONÇALVES, S.C.; COSTA, P.L.; SILVA, K.G.; SILVA, F.J.; SILVA, R.P.; BRITO, M.E.F.; FILHO, S.P.B.; TORRES, F.D.; CAVALCANTI, M.P. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental and Applied Acarology**. v. 35, n.3-4, p.1749-1755, 2012.

MORRISON, A.C.; FERRO, C.; TESH, R.B. Host preference of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American Visceral Leishmaniasis in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.49, n.1, p. 68-75, 1993.

NASCIMENTO, C.S. **Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR real Time) na avaliação da carga parasitária em cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*** 2011. 80f. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

NIETO, C.G.; VIÑUELAS, J.; BLANCO, A.; GARCÍA-ALONSO, M.; VERDUGO, S.G.; NAVARRETE, I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Veterinary Record**, v.139, n.14, p.346-347, 1996.

NIKOLSKAIA, O.V.; KIM, Y.V.; KOVBASNJUK, O.; KIM, K.J.; GRAD, D.J. Entry of Trypanosoma brucei gambiense into microvascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. **International Journal for Parasitology**, v.36, n.5, p.513-519, 2006.

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

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

OLIVEIRA, E.D.; OSHIRO, E.T.; PINTO, R.V.; CASTRO, B.C.; DANIEL, K.B.; OLIVEIRA, J.M.D.; COSTA, M.S.C.L.; GUIMARÃES, E.B.; SILVA, J.M.; DORVAL, M.E.C. Presence of amastigotes in the central nervous system of hamsters infected with *Leishmania sp.* **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p.97-102, 2011.

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, n.11, p. 1184-1191, 2010.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, n.1, p.1-13, 1996.

PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S.Y.; SLAPPENDEL, R.; FRAGIO, C.; RUITENBERG, E.J.; BERNADINA, W.; RUTTEM, V.P.M.G. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.69, n.2-4, p.121-126, 1999.

PRASAD, L.S.N.; SEN, S. Migration of leishmania donovani amastigotes in the cerebrospinal fluid. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, n.6, p. 652-654, 1996.

PRINA, A.E.; ROUX, B.E.; MATTEI, B.D, MILON, G. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**. v.9, n.11, p.1307-1315, 2007.

QUARESMA, F.P.; MURTA, S.M.F.; FERREIRA, E.C.; ROCHALIMA, A.C.V.M.; XAVIER, A.M.P.; GONTIJO, C.M.F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v.111, n.3, p. 289–294, 2009.

RANASINGHE, S.; ROGERS, M.E.; HAMILTON, J.G.C.; BATES, P.A.; MAINGON, R.D.C. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, n.9, p.875-882, 2008.



REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p.2352–2356, 2002.

ROSEMBERG, G.A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **Glia**, v.39, n.3, p.279-291, 2002.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clinica Veterinária**, v.2, n.11, p.24–28, 1997.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.88, n.1-2, p.21-30, 2002.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.R.; HOFFMANN, M.P.; FURLAN, M.B.; FERREIRA, W.F PEREIRA, C.; FERREIRA, L. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul state. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p. 633-634. 2003.

SÃO PAULO (Estado). Centro de vigilância epidemiológica da saúde de São Paulo. Leishmaniose visceral americana humana-casos autóctones e óbitos de leishmania visceral americana, segundo município de residência, 2010-2012. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/lvah\\_lpi.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/lvah_lpi.htm)>. Acesso em 03 de outubro de 2012.

SÃO PAULO (Estado). Centro de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Estado da Saúde. **Manual da vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. 2006, 161p. Disponível em: <[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/zoo/lva06\\_manual.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/lva06_manual.pdf)>. Acesso em: 03 out. 2012.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Grupo de Estudos em Leishmanioses. Classificação epidemiológica dos municípios para leishmaniose visceral americana. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v.4, n.39, p.27-39, 2007.

SCHWARDT, T.F. **Contribuição ao estudo da patogenia das lesões no encéfalo de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.** 2011. 73f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araçatuba, 2011.

SNYDMAN, D.R.; WALKER, M.; KUBLIN, J.G.; ZUNT, J.R. Parasitic central nervous system infections in immunocompromised hosts: malaria, microsporidiosis, leishmaniasis, and african trypanosomiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, n.1, p.115-125, 2006.

SOLANO-GALLEGO, L.; ROSSI, L.; SCROCCARO, A.M.; MONTARSI, F.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T.; TROTTA, M. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v.5, p.98-104, 2012.

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

SOLCÁ, M.S.; GUEDES, C.ES.; NASCIMENTO, E.G.; OLIVEIRA, G.G.S.; SANTOS, W.L.C.; FRAGA, D.B.M.; VERAS, P.S.T. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.184, n.2-4, p.133–140, 2012.

STRAZIELLE, N.; GHERSI-EGEA, J.F. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. **Journal of Neurophathology and Experimental Neurology**, v.59, n.7, p.561-574, 2000.

STREIT, W.J. Microglia as neuroprotective immunocompetent cells of the CNS. **Glia**, v.40, n.2, p.133-139, 2002.

TABAR, M.D.; ROURA, X.; FRANCINO, O.; ALTET, L.; RUIZ DE GOPEGUI, R. Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. **The Journal of Small Animal Practice**, v.49, n.7, p. 325-328, 2008.

TRIPATHI, A.K.; SULLIVAN, D.J.; STINS, M.F. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes decrease the integrity of human blood-brain barrier endothelial cell monolayers. **The Journal of Infectious Diseases**, v.195, n.7, p. 942-950, 2007.

VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; LERAY, D.; JACQUET, D.; VERVOORT, T. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. **Veterinary Record**, v.141, n.13, p.328-330, 1997.

VIÑUELAS, J.; GARCIA-ALONSO, M.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRÓN, C.; CARCELÉN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.101, n.1, p.23-27, 2001.

XAVIER, S.C.; DE ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **Veterinary Research**, v.2, n.17, p.1-7, 2006.

WEAVER, C.T.; HATTON, R.D.; MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annual Reviews Immunology**, v.25, p.821-852, 2007.

WOLBURG, H.; PAULUS, W. Choroid plexus: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v.119, n.1, p.75-88, 2010.

WHO. World Health Organization. Magnitude of problem, 2006. Disponível em: <[www.who.int/en/index.html](http://www.who.int/en/index.html)>. Acesso em: 20 jun. 2010.

WHO. World Health Organization. **Programmes and project. renponse.** 2012. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/response\\_more/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/response_more/en/index.html)>. Acesso em: 01 out. 2012.

## ANEXOS

**Anexo 1** – Resultados individuais dos Threshold cycle (Ct) para amplificação de DNA de *Leishmania* sp. no encéfalo de cães com leishmaniose visceral

Animal	Ct	Ct	Ct
C1	24,16	24,11	24,18
C2	19,31	19,19	19,17
C3	23,67	23,65	23,63
C4	22,39	22,34	29,51
C5	29,68	29,73	29,51
C6	24,03	23,62	23,65
C7	15,17	15,12	15,00
C8	25,96	26,04	26,03
C9	20,73	20,58	20,70
C10	24,22	24,12	24,20
C11	23,86	23,69	23,60
C12	20,79	21,00	20,69
C13	21,00	20,57	20,58
C14	23,97	23,95	24,24
C15	27,18	27,14	26,97
C16	19,04	18,77	19,08
C17	21,41	21,57	21,43
C18	22,93	22,69	22,96
C19	28,22	27,90	28,35
C20	20,43	20,39	20,34
C21	20,41	19,33	19,33
C22	4,32	19,50	4,37
N1	17,89	16,81	16,91
N2	25,28	24,88	25,08
Controle 1	24,16	24,11	24,18
Controle 2	19,31	19,19	19,17

