

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

**ASSOCIAÇÕES ENTRE AS CARGAS PARASITÁRIAS
COM O ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES
CLÍNICO-LABORATORIAIS NA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**

Rafaela Beatriz Pintor Torrecilha
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2015

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

**ASSOCIAÇÕES ENTRE AS CARGAS PARASITÁRIAS
COM O ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES
CLÍNICO-LABORATORIAIS NA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**

**Rafaela Beatriz Pintor Torrecilha
Orientador: Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini**

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

ARAÇATUBA – SP
2015

Catálogo na Publicação (CIP)

Torrecilha, Rafaela Beatriz Pintor

T689a Associações entre as cargas parasitárias com o estresse oxidativo e alterações clínico-laboratoriais na Leishmaniose visceral canina / Rafaela Beatriz Pintor Torrecilha.

Araçatuba: [s.n], 2015

65 f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2015

Orientador: Prof. Adj. Paulo César Ciarlini



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



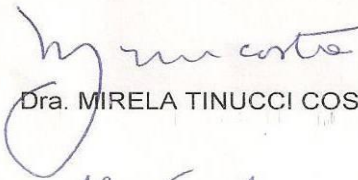
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Associações entre as cargas parasitárias com o estresse oxidativo e alterações clínico-laboratoriais na leishmaniose visceral canina.


AUTORA: RAFAELA BEATRIZ PINTOR TORRECILHA

ORIENTADOR: Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dra. MIRELA TINUCCI COSTA


Dra. CÁRIS MARONI NUNES


Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

DATA DA REALIZAÇÃO: 2 de fevereiro de 2015.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAELA BEATRIZ PINTOR TORRECILHA – Natural de Araçatuba, São Paulo, nascida em 18 de setembro de 1989, filha de Maria Aparecida Pintor Dias Torrecilha e Sidney Torrecilha Basso. Em 2007, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade de Marília-UNIMAR, onde se graduou como Médica Veterinária em julho de 2012 com Trabalho de Conclusão de Curso sobre Anestesiologia e Unidade de Terapia Intensiva de cães. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba-SP, em agosto de 2013, sob orientação do Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini. Desde então tem participado dos Projetos de Pesquisa do grupo sob auxílio financeiro da FAPESP de onde também obteve bolsa de mestrado pela CAPES, sempre em relação aos temas de estresse oxidativo, metabolismo oxidativo, estresse oxidativo em doença periodontal, estresse oxidativo na haemoncose em ovinos da raça Suffolk e Santa Inês e estresse oxidativo na obesidade de cães.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."

(Chico Xavier)

Aos meus familiares e ao meu companheiro Yuri, por todo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por todas as energias benéficas despejadas sob todos ao meu redor, a todas as horas de fraqueza e desconforto em que ele me atendia e me socorria, pois sem os momentos de alegrias e dificuldades não conseguiria chegar onde cheguei.

Agradeço a todos os animais em cruzaram minha vida, domésticos e/ou selvagens, pois eles me ensinam que a vida é simples, curta e que temos o poder de influenciar na existência alheia e que cabe a cada um tomar a decisão certa e acredito que eles apresentam a forma mais pura do amor que pode existir.

A minha família, sem a qual eu não viveria. Independente de qualquer coisa, que sempre estão presentes para dar apoio, palavras de conforto, afeto e auxílio em qualquer momento. Em especial à minha mãe, Maria Aparecida ou Cidoca, para a qual eu nem tenho palavras a descrever o quão imenso é meu sentimento por essa mulher que sempre foi uma grande heroína e na qual me espelho todos os dias, pois um dia queria poder ter um terço da sabedoria, paciência e amor que ela distribui. Ao meu pai, Sidney, a quem sempre fez de tudo para nunca faltar nada para seus filhos, ao qual eu devo muito o meu crescimento espiritual e intelectual. Aos meus irmãos, Maria Helena e Francis, os quais se tornam pai e mãe sempre que podem para manter meu bem-estar e minha felicidade: sem vocês eu não saberia descrever o que é ter uma família feliz.

Aos meus colegas de trabalho, Anelise, Breno, Luís, Priscila, Daniela, Lillian, Gabriela, Luciana, Mirtes, Renata, Laine. Sem trabalho em equipe nada aconteceria. Queria agradecer a todos e pedir desculpas pelas brincadeiras, mas que nosso "Galinheiro" continue sempre a produzir ovos e risadas, apesar do trabalho que as vezes parece não ter fim. No dia a dia vemos que marcamos e somos marcados pelas pessoas e saibam que não irei me esquecer de nenhum de vocês, pois levo comigo um pouco de cada um, algum transtorno obsessivo compulsivo, alguns sotaques, mas o mais importante, a amizade mesmo nos dias difíceis. Em especial ao meu orientador Paulo, o qual

me abriu uma porta e me mostrou um mundo no qual me encontrei, acredito que a função de um real professor é fazer o aluno se apaixonar pelo que faz, e esta foi a marca deste grande mestre em mim, que apesar de problemas pessoais estava presente e teve paciência em um momentos complicados desta jornada.

Agradeço ao grupo de pesquisa da Universidade de Warwick na Inglaterra pela colaboração em parte desse projeto. E também à Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP e ao curso de pós-graduação da unidade de Araçatuba.

Ao laboratório de bioquímica animal e biologia molecular, à Fernanda, Silvana, Flavinha, Adam, Anirene, Pier, Ludmilla, Dandara e aos professores Cáris e Fernando. A todos meus amigos de infância e do decorrer da vida, Marcela, Bruno, Yasmin, Valeska, Suelen, Kelly, Daiene, Carolina, entre outros aos quais não me recorro neste momento, mas que ao nos encontrarmos parece que o tempo não passou nem um minuto longe.

Por último e não menos importante, ao meu namorado Yuri, sem sua ajuda qual eu nem estaria escrevendo essas palavras e por sua compreensão em todos os momentos. Conseguiria escrever um livro sobre o caráter e personalidade forte e bondosa deste homem que me acompanha todos os dias, e a única coisa que consigo pensar é em como tenho sorte em ter uma pessoa tão especial ao meu lado. Sua generosidade é radiante e sua humildade é surpreendente. Admiro tudo e amo até seus defeitos e agradeço por me fazer sorrir todos os dias.

Agradeço a todos e peço desculpas se esqueci de alguém, mas saibam que cabe mais no coração o que cabe em páginas de agradecimentos.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1 Contextualização do Problema	15
2 Pesquisa Bibliográfica	15
3 Leishmaniose e seus Sinais Clínico- Laboratoriais	16
4 Leishmaniose, Sinais Clínicos e Laboratoriais e suas associações com a Carga Parasitária.....	18
5 Relação entre o Estresse Oxidativo e a Anemia na Leishmaniose	20
6 Objetivos.....	23
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARGA PARASITÁRIA TOTAL E TECIDUAL COM O ESTRESSE OXIDATIVO E A ANEMIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	32
1 Introdução.....	34
2 Material e Métodos	35
2.1 Seleção dos Animais	35
2.2 Obtenção de amostras	35
2.3 Análises Laboratoriais	36
2.4 Avaliação da carga parasitária por reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR).....	37
2.5 Análise Estatística	39
3 Resultados.....	40
3.1 Caracterização do quadro anêmico, dos marcadores de estresse oxidativo do plasma e dos eritrócitos de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral	40
3.2 Carga parasitária tecidual e total.....	40

3.3 Associação entre a carga parasitária, o estresse oxidativo e a anemia	42
4 Discussão	43
5 Conclusão.....	46
6 Agradecimentos.....	47
REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO 3- ASSOCIAÇÕES ENTRE AS ALTERAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS E CARGA PARASITÁRIA TOTAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	54
1 Introdução.....	56
2 Material e Métodos	58
2.1 Seleção dos Animais.....	58
2.2 Alterações clínicas e avaliações laboratoriais	58
2.3 Avaliação da carga parasitária por qPCR.....	60
2.4 Análise Estatística	61
3 Resultados.....	62
3.1 Alterações de sinais clínicos, hematológicas e do perfil bioquímico de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral.	62
3.2 Análise de componentes principais	64
3.3 Associação entre alterações clínicas e parasitismo	65
4 Discussão	67
5 Conclusão.....	70
6 Agradecimentos.....	70
REFERÊNCIAS	70

ASSOCIAÇÕES ENTRE AS CARGAS PARASITÁRIAS E COM O ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

RESUMO - A leishmaniose visceral (LV) canina é uma zoonose de grande importância epidemiológica. Seu amplo espectro de sinais clínicos dificultam o diagnóstico na rotina clínica e laboratorial, sendo necessário a utilização de técnicas mais específicas, como o qPCR, o qual possui grande sensibilidade e especificidade. A anemia é um sinal clínico muito comum nesta doença, sendo que sua causa ainda é muito discutida. O estresse oxidativo é caracterizado por desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, sendo que esta alteração pode ser um dos fatores da presença de anemia em cães com LV. Considerando-se que a anemia seja causada pelo estresse oxidativo, propusemos investigar a hipótese de que alterações hematológicas, bioquímicas e sinais clínicos de cães com LV variam com a carga parasitária (CP). Para tal, foram avaliados marcadores de estresse oxidativo plasmático (albumina, ácido úrico, bilirrubina, capacidade antioxidante total-TAC, capacidade oxidante total-TOC, índice de estresse oxidativo TOC/TAC e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico-TBARS) e eritrocitário (TBARS em papa de hemácias). Para avaliação geral dos animais foram analisados perfil bioquímico e hemograma completo e os animais foram classificados com presença e ausência de sinais clínicos. A CP foi obtida através de coleta de pele, conjuntivas, sangue e papa de leucócito, a partir da quantificação dos tecidos foi calculada a CP total, através de análise de componentes principais. Os parâmetros hematológicos não se alteram conforme ocorre aumento da carga parasitária e não foi observado qualquer tipo de hemólise ou icterícia nas amostras coletadas. Ao contrário do perfil hematológico, os sinais clínicos e laboratoriais se alteram conforme ocorre aumento da carga parasitária. Conclui-se que a anemia independe da CP e que a sua causa não está associada ao metabolismo oxidativo, peroxidação lipídica ou mecanismos hemolíticos. Já a linfadenomegalia do poplíteo e alterações dermatológicas possuem forte associação com alto parasitismo, indicando que as manifestações clínicas da doença podem ser utilizadas como preditores da extensão da infecção sistêmica.

Palavras-chave: Oxidantes, Antioxidantes, Reação em cadeia da polimerase em tempo real, Anemia.

ASSOCIATIONS BETWEEN PARASITE LOAD WITH OXIDATIVE STRESS AND CLINICAL AND LABORATORY ALTERATIONS IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT - Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a zoonosis of great epidemiological relevance. Infected dogs usually present nonspecific clinical and laboratory alterations that hampers the diagnosis of the disease in routine screening, and the use of techniques with higher sensitivity and sensibility, such as the detection of the parasite by polymerase chain reaction (PCR), are often necessary. Among the nonspecific alterations, anemia is one of the most frequently found, but the mechanism underlying its occurrence is still under dispute. Oxidative stress, the imbalance between oxidants and antioxidants, has been recently incriminated as one of the possible triggers of anemia in CVL. Here, we investigated the putative relationships between parasite load and markers of oxidative stress and hematologic, biochemical and clinical alterations in dogs naturally infected with *Leishmania* spp. Markers of oxidative stress included albumin, uric acid, bilirubin, total antioxidant capacity (TAC), total oxidant capacity (TOC), oxidative stress index (TOC/TAC) and serum and packed red cells Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Additional laboratory analysis included complete blood count (CBC) and biochemical profile. Observation of clinical alterations was scored as present or absent. Quantitative PCR (qPCR) of tissue samples of skin, conjunctiva, whole blood and packed white cells was used to estimate tissue-specific parasite load. In order to represent the total parasite load (i.e., the parasitism across different analyzed tissues), we applied a principal components analysis to the matrix of tissue-specific qPCR results to create a single synthetic variable that captures the information content present in the four different original variables. We found no significant associations between hematologic parameters and parasite load, and previously reported alterations such as sample hemolysis or icteric serum were not observed. However, significant differences in average parasite load were found between animals with presence and absence of clinical alterations, especially popliteal lymphadenomegaly and dermatological alterations. Therefore, we found no evidence that anemia is associated with the extent of the parasitism, and our data do not support a possible role of the oxidative metabolism on the occurrence of anemia. On the other hand, the presence of popliteal lymphadenomegaly and dermatological alterations are strongly associated with high parasitism, indicating that these clinical signs are valuable predictors of the extent of the infection in multiple tissues.

Keywords: Oxidants, Antioxidants, Real-time polymerase chain reaction, Anemia.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Contextualização do Problema

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de grande importância epidemiológica, da qual o principal reservatório urbano é o cão. O protozoário é inoculado através da picada de um vetor (fêmeas de flebotomíneos) e atinge diversos tecidos, causando os mais variados sintomas clínicos. A anemia é um sinal clínico comum em cães e pessoas infectadas com este protozoário, sendo que sua origem ainda é considerada multifatorial e pouco compreendida. A anemia hemolítica observada em humanos tem sido associada ao estresse oxidativo, embora a redução de antioxidantes e aumento de oxidantes também já foi descrita em cães acometidos por esta doença, até o momento não foi estabelecida a relação entre aumento do estresse oxidativo, a anemia e alterações clínicas em cães com leishmaniose visceral canina (LVC).

O diagnóstico da LVC deve ser feito através da soma de sinais clínicos, epidemiológicos e métodos laboratoriais. Os métodos moleculares são altamente sensíveis e específicos, sendo que a carga parasitária obtida através de método quantitativo (qPCR) é uma alternativa muito eficaz para determinar a infecção do animal. A associação entre carga parasitária e sinais já foi descritos, mas necessitam de maiores estudos para estabelecer uma avaliação preditiva que facilite a rotina clínica, laboratorial e epidemiológica da doença.

2 Pesquisa Bibliográfica

Foi realizada uma revisão de literatura sistemática sobre o tema, tendo como base as perguntas:

O estresse oxidativo, as alterações hematológicas e os sinais clínicos de cães variam conforme aumenta a carga parasitária de cães infectados com LVC?

As alterações clínicas podem prever a carga parasitária tecidual?

Para tal, uma pesquisa avançada foi realizada em três bancos de dados do portal da pesquisa da CAPES (Pubmed, Web Science, Scielo). As perguntas foram estruturadas com três elementos conceituados na medicina baseada em evidências, conforme preconizado por Castro (2001). Com base na estrutura da primeira pergunta de investigação (situação: Leishmaniose; Intervenção: estresse oxidativo; desfecho: anemia), no banco Pubmed foram adotadas diferentes estratégias de busca: ((“leishmaniasis”) AND “oxidative stress”) AND “anemia” (resultado= 4 artigos); ((“leishmaniasis”) AND “oxidative stress”) AND “hemolysis” (resultado= 1 artigo); ((“leishmaniasis”) AND “oxidative stress) AND “erythrocyte” (resultado= 3 artigo); ((“leishmaniasis”) AND “oxidative stress”) AND RBC (resultado= 1 artigo); ((“leishmaniasis”) AND “oxidative stress”) AND qPCR (resultado= 4 artigos); ((“leishmaniasis”) AND “oxidative stress”) AND "parasite load" (resultado= 2 artigos), sendo excluídas as duas publicações que se repetiram nas diferentes estratégias.

Com base na estrutura da segunda pergunta de investigação (situação: Leishmaniose; Intervenção: qPCR; desfecho: alterações clínicas), as estratégias de busca utilizadas foram: ((leishmaniasis) AND “qPCR” AND “clinical” (resultado= 91 artigos); ((leishmaniasis) AND “parasite load” AND “clinical” (resultado= 126 artigos). As repetições de publicação foram excluídas. O período da revisão se estendeu até o dia 02 de janeiro de 2015, não sendo adotados filtros quanto ao idioma e espécie, uma vez que não foi localizada publicação sobre a relação entre o estresse oxidativo e a carga parasitária na leishmaniose visceral canina. No mesmo período foram realizadas pesquisas complementares no Google Acadêmico.

3 Leishmaniose e seus Sinais Clínico- Laboratoriais

A leishmaniose é uma doença causada por protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987), sem parasita intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear (BRASIL, 2014).

Esta zoonose apresenta um grande potencial de letalidade na Europa, Ásia, África e Américas (BANETH et al., 2008). Sendo que 90% da forma cutânea ocorrem em sete países (Afeganistão, Algéria, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria) e 90% da forma visceral em cinco países (Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil) (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Esta doença apresentava-se em áreas rurais e atualmente houve uma expansão para áreas urbanas, principalmente na região Sudeste e Centro-oeste do Brasil (BRASIL, 2014).

Como reservatórios silvestres prevalecem as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) e já em centros urbanos prevalecem os cães (*Canis familiaris*), sendo estes importantes para manutenção da doença (BRASIL, 2014; REITHINGER et al., 2004). Como medida de controle da LV no Brasil, os cães infectados são submetidos a eutanásia, entretanto esse tipo de abordagem gera controvérsias quanto sua eficácia. Apesar destas estratégias de controle, a mortalidade em humanos no Brasil tem aumentado, sendo que medidas de vigilância e controle devem ser priorizadas, assim como o diagnóstico precoce e tratamento dos infectados são fundamentais para redução da letalidade (MARTINS-MELO et al., 2014).

A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization- WHO, 2014) reconhece a leishmaniose de humanos em quatro grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral, sendo a forma visceral acompanhada de alta mortalidade quando não tratada. Inicialmente o parasito se localiza na pele e depois se dissemina para outros tecidos (BRASIL, 2014).

Humanos infectados com LVC podem apresentar lesões cutâneas pelo tropismo do protozoário pelo tecido (HANDMAN, 2001), todavia as lesões cutâneas mais observadas em cães com leishmaniose visceral são as descamações e eczema, principalmente em espelho nasal e orelha, além de pequenas úlceras em orelhas, focinho, cauda e articulações e pêlo opaco (BRASIL, 2014). Estas lesões cutâneas podem ser sutis ou úlceras severas podem ter cura espontânea, dependendo da imunidade e resistência individual (HANDMAN, 2001). Em áreas endêmicas a infecção é generalizada e a fração

de doença clínica é menor do que a taxa de infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; BANETH et al., 2008). As manifestações clínicas e a parasitemia dependem das interações entre fatores genéticos e imunocompetências (HANDMAN, 2001).

Nas fases mais avançadas, observam-se onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivites, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de membros e vômito, além da hiperqueratose. E na fase final pode ocorrer paresia de membros pélvicos, caquexia, inanição e morte (BRASIL, 2014). Na revisão feita por Baneth et al. (2008), observaram que alterações dermatológicas foram as mais prevalentes representando de 81-89%, seguidas de aumento de linfonodos com 62-90%, alterações oftálmicas com 16-81%, mucosas hipocoradas com 58%, esplenomegalia com 10-48%, caquexia com 10-48%, febre com 4-36%, epistaxe com 6-10% e onicogribose com 20-31%.

Nos parâmetros laboratoriais, as alterações de proteínas plasmáticas são comumente observadas, geralmente a hipoalbuminemia e hiperglobulinemia em cães sintomáticos e oligossintomáticos (REIS et al., 2006), sendo que cães com maior título de anticorpos podem apresentar redução de albumina (AMUSATEGUI et al., 2003). A anemia é também um importante achado, sendo observado principalmente em cães sintomáticos, com diminuição de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito (REIS et al., 2006). A redução de hemoglobina já foi descrita em cães adultos com a doença estabelecida, sendo que a associação de sinais cutâneos e viscerais podem estar relacionados a redução de albumina, hemoglobina e eritrócitos (AMUSATEGUI et al., 2003). Em relação aos leucócitos, a leucopenia em animais sintomáticos tem sido associada à redução de eosinófilo e monócito (REIS et al., 2006).

4 Leishmaniose, Sinais Clínicos e Laboratoriais e suas associações com a Carga Parasitária

O diagnóstico de PCR, qPCR e ELISA são de sensibilidades acima de 80%, sendo importantes para o diagnóstico da doença, e amostras esplênicas são efetivas e sensíveis para a detecção da doença (SOLCÀ et al., 2012). O tecido conjuntival tem alta taxa de positividade, sensibilidade e especificidade na PCR, sendo superior o baço e linfonodo (STRAUSS-AYALI et al., 2004). Os testes de imunofluorescência indireta (IFAT) apresentam reações cruzadas entre a *Leishmania spp* e *Trypanossoma cruzi* havendo necessidade de associar esse teste a PCR (TRONCARELLI et al., 2009).

Humanos com alta carga parasitária quantificada por qPCR poderia estar correlacionadas com as alterações clínicas (MARY et al., 2004), também observado em cães com LVC em carga parasitária de linfonodos, pele (MANNA et al., 2009; REIS et al., 2006; SANCHEZ et al., 2004), e baço (SOLCÀ et al., 2012). Diferente dos linfonodos, não foi verificada associações entre a quantidade de parasita no tecido adrenal e os sinais clínicos (MOMO; ROCHA, 2014).

Cães com LV sintomáticos apresentam também maior carga parasitária em relação aos oligossintomáticos e assintomáticos (REIS et al., 2006). Em cães, a presença do parasita no baço foi associada aos sinais clínicos, com as seguintes associações: 77% de positividade na pele, 72% linfadenomegalia, 19% alterações oftálmicas e 4% caquexia (BARROUIN-MELO et al., 2006). Manna et al. (2009) observaram que a carga parasitária em sangue e linfonodo de cães se associam com a frequência de linfadenomegalia (90%), seguido de alterações dermatológicas, lesões oculares e perda de peso. Além da importância desta associação entre carga parasitária e sinais clínicos, o qPCR é de extrema importância, pois consegue quantificar cargas extremamente baixas, facilitando o diagnóstico e acompanhamento em humanos (MARY et al., 2004).

As alterações dermatológicas são comuns e podem ocorrer na presença ou ausência de outros sinais clínicos (CARDOSO; CABRAL, 1998), sendo que animais assintomáticos pode-se detectar a presença de parasitas na pele (MARZOCHI et al., 1985), demonstrando que a pele de cães infectados por LV

possui altas taxas de parasitas (SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Assim como o fígado de cães com LV, também apresentam maior carga parasitária que o baço em cães assintomáticos e sintomáticos (SANCHEZ et al., 2004). O problema da quantificação da carga por qPCR seria a obtenção da amostra, que geralmente é invasiva, sendo que o aspirado de baço e medula óssea possuem alta sensibilidade (MAIA; CAMPINO, 2008; SOLCÀ et al., 2014). Como a distribuição do protozoário da *Leishmania* spp. é ampla e já foi observada até em tecidos oculares de cães (PEÑA et al., 2008), a utilização de *swab* de conjuntiva para diagnóstico molecular pode reduzir estes procedimentos invasivos nestes animais (STRAUSS-AYALI et al., 2004), sendo que a conjuntiva pode possuir sensibilidade semelhante a nódulos linfáticos (LOMBARDO et al., 2012) e medula óssea (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012), podendo até ser útil para primeiro diagnóstico da doença (CECCARELLI et al., 2014) nesta espécie. O sangue apesar de ser menos invasivo para sua obtenção ainda é considerado de pouco valor diagnóstico em cães com LV (REALE et al., 1999).

5 Relação entre o Estresse Oxidativo e a Anemia na Leishmaniose

O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e as defesas antioxidantes do organismo (PEAKE; SUZUKI, 2004). O sistema de defesa endógena contra agentes oxidantes é constituído por vitaminas antioxidantes (vitamina A, C e E), ácido úrico, glutathione (GSH), bilirrubina, albumina e por enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase (YU, 1994). Os antioxidantes atuam na defesa antioxidante intracelular, eliminando o superóxido, hidroperóxidos e conseqüentemente prevenindo reações em cadeia de espécies reativas de oxigênio (ERO), que oxidam os substratos celulares (JI, 1995). A produção exagerada e contínua de ERO leva ao consumo das defesas antioxidantes orgânicas, de modo que o seu excesso passa a reagir com componentes celulares e teciduais causando a peroxidação

lipídica e danos ao DNA celular que levam à apoptose (ZAMZAMI et al., 1996). A elevação das ERO e as lesões teciduais são geralmente causadas por traumas, infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos: conjuntos de processos que auxiliam na formação de radicais livres, ativação de fagocitose, liberação de ferro ou cobre ou alteração da cadeia transportadora de elétrons (ROCK et al., 1996).

Os eritrócitos não possuem a capacidade de sintetizar novos lipídeos e proteínas para substituir os oxidados, por isso é importante a manutenção dos antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001). A oxidação e seu efeito cumulativo nos eritrócitos são normais no processo de envelhecimento e destruição desta célula (HARVEY, 1997). As lesões oxidativas neste tipo celular podem causar formações de metahemoglobina, corpúsculo de Heinz, lesão de membrana, excentrócitos e até mesmo morte celular (HARVEY, 1997). Eritrócitos normais possuem a capacidade de circular em capilares de pequeno diâmetro (JAIN, 1993) e as alterações relacionadas as oxidações alteram sua deformabilidade e fluidez e conseqüentemente estão associadas a destruição destas células (TANG et al., 2007), por reconhecimento de macrófagos e aumento da fagocitose (CHRISTIAN, 2000).

A peroxidação lipídica, quantificada pela presença de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), podem ser utilizadas como índice de estresse oxidativo (MACHADO et al., 2007). Bildik et al. (2004) observaram que a leishmaniose está correlacionada com o estresse oxidativo, pela redução de antioxidantes e aumento de TBARS em cães. Assim como Almeida et al. (2013), que observaram que no estágio moderado da doença ocorre aumento de superóxido e no estágio final redução de superóxido com aumento de apoptose em neutrófilos.

O principal antioxidante responsável pela remoção de radicais livres na membrana de eritrócitos é a vitamina E, atuando na prevenção da hemólise e mantendo a estabilidade da membrana (MACHADO et al., 2009). Quando oxidada, a vitamina E pode ser reciclada pela vitamina C, que é um agente redutor, tornando a vitamina E novamente ativa (HALLIWELL, 1994). Quando

oxidada, a vitamina E é captada e reduzida pelos eritrócitos, e este mecanismo é importante para a manutenção da forma ativa da vitamina C no plasma (BILDIK et al., 2004). Os antioxidantes eritrocitários formam um complexo eficiente de manutenção da integridade e funcionalidade durante seu período de vida circulante em uma produção normal de ERO, sendo que as lesões oxidativas eritrocitárias estão presentes em inúmeras enfermidades animais (MACHADO et al., 2009).

A anemia na leishmaniose é comum e multifatorial, e em hamsters Lafuse et al. (2013) observaram que a presença do parasita resultou em uma anemia severa com aumento da eritropoietina, mas com efeito negativo na diferenciação de eritroblastos em baço e medula óssea. Segundo estes autores, este efeito ocorre devido a citocinas de eritroblastos que inibem a eritropoiese na medula óssea por apoptose destas células precursoras. Outro estudo com hamsters que também avaliou a presença da anemia concomitante a leishmaniose, observaram que a presença da hemólise foi evidente e conjunta ao estresse oxidativo observado por aumento de peroxidação lipídica conforme a progressão da doença, redução de eritrócitos com aumento de carga parasitária em baço e aumento de corpúsculo de Heinz (SEN et al., 2001).

Em humanos, observou-se que o conjunto de fatores, como estresse oxidativo, fragilidade de membrana dos eritrócitos, peroxidação lipídica, eritrofagocitos entre outros, sugerem que o aumento da hemólise está associada ao comprometimento da integridade da membrana de eritrócitos de humanos infectados, sendo uma explicação em potencial para o envolvimento da hemólise relacionada a anemia nestes pacientes (SAMANTA et al., 2012).

Na espécie canina já foi descrito que a anemia presente na LV pode ser decorrente da redução de fluidez e membrana do eritrócito maior, facilitando o sequestro esplênico pelo aumento da rigidez celular, mas pode também estar associada a alterações no receptor, podendo gerar citoaderências, ambas resultando na redução da fluidez da membrana e contribuindo para a anemia em cães infectados por leishmaniose (DE LUNA et al., 2000). Da mesma

forma, Bildik et al. (2004) descrevem que deve ocorrer aumento de peroxidação lipídica na anemia hemolítica na leishmaniose de cães.

6 Objetivos

Testar a hipótese de que a carga parasitária total e de diversos tecidos possuem relações com o estresse oxidativo e parâmetros hematológicos em animais naturalmente infectados por LVC.

Testar a hipótese de que sinais clínicos da doença podem ser preditivos da carga parasitária total e de diversos tecidos em animais naturalmente infectados por LVC.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B.F.M.; NARCISO, L.G.; MELO, L.M.; PREVE, P.P.; BOSCO, A.M.; LIMA, V.M.F.; CIARLINI, P.C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 599–605, 2013.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUEZ, F.; TESOURO, M.A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v.18, p. 147–156, 2003.

ANDRADE, A. M.; QUEIROZ, L.H.; NUNES, G.R.; PERRI, S.H.V.; NUNES, C.M. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 594–595, 2007.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an

expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.

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

BILDIK, A.; KARDIN, F.; SEYREK, K.; PASA, S.; OZENSOY, S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n. 1, p. 63–66, 2004.

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

CASTRO, A. A. **Revisão sistemática e meta-análise**. 2001. Disponível em: <<http://www.metodologia.org/meta1.PDF>> Acesso em: 07 de Jan de 2015.

CARDOSO, L.; CABRAL, M. *Leishmania* e Leishmaniose canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.93, n.527, p.119-170, 1998.

CECCARELLI, M.; GALLUZI, L.; SISTI, D.; BIANCHI, B.; MAGNANI, M. Application of qPCR in conjunctival swab samples for the evaluation of canine leishmaniasis in borderline cases or disease relapse and correlation with clinical parameters. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 460, 2014.

CHRISTIAN, J.A. Red blood cell survival and destruction. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap.20, p.117- 124.

DE ALMEIDA FERREIRA, S.F.; LEITE, R.S.; ITAUSSU, L.T.; ALMEIDA, G.G.; SOUZA, D.M.; FUJIWARA, R.T.; DE ANDRADE, A.S.; 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 Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.

DE LUNA, R.; FERRANTE, M.; SEVERINO, L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; GRADONI, L.; LUCISANO, A.; PERSECHINO, A. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, n. 2-3, p. 213–6, 2000.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1169–1680, 2005.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 936 p. 2001.

HANDMAN, E. Leishmaniasis : current status of vaccine development. **Clinical Microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

HARVEY, J.W. The erythrocyte: physiology, metabolism, and biochemical disorders. In: KANEKO, J.J. HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical**

biochemistry of domestic animals. San Diego: Academic Press, 1997. p. 157-203.

JAIN, N.C. Hemolytic anemias of noninfectious origin. In: **Essential of veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.193- 209.

JI, L. L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radical Biology & Medicine**, v.18, n.6, p.1079-1086, 1995.

LAFUSE, W. P.; STORY, R.; MAHYLIS, J.; GRUPTA, G.; VARIKUTI, S.; STEINKAMP, H.; OQHUMU, S.; SATOSKAR, A.R. *Leishmania donovani* infection induces anemia in hamsters by differentially altering erythropoiesis in bone marrow and spleen. **PloS one**, v. 8, n. 3, 2013.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS W, KILLICK-KENDRICK R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-120.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M.G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRI, 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. 10–7, 2012.

MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; DA SILVEIRA, V. F.; YONEZAWA, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84–94, 2009.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274–87, 2008.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A.E. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 76–78, 2009.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA, M.S.; RAMOS JUNIOR, A.N.; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACH, J. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e93770, 2014.

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

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; TOLEDO, L. M.; GRIMALD JUNIOR.; MOMEN, H.; PACHECO, R. S.; SABROZA, P. C.; DE SOUZA, M. A.; RANGEL JÚNIOR, F.B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutically and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80,n.3, p. 349-357. 1985.

MOMO, C.; ROCHA, N. Morphological changes and parasite load of the adrenal from dogs with visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 30–35, 2014.

PEAKE, J.; SUZUKI, K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induce oxidative stress. **Exercise Immunology Review**, v. 10, p.129-141, 2004.

PEÑA, M. T.; KLAUSS, N.G; FONDEVILA,D.; LEIVA,M.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.; DUBIELZIG, R.R. Histopathological features of ocular

leishmaniosis in the dog. **Journal of Comparative Pathology**, v. 138, n. 1, p. 32–39, 2008.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO,A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA,R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in veterinary science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P.G.; ALEZANDER, B.; VIEIRA, E.P.; ASSIS, G.; DAVIES, C.R. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 55–62, 2004.

ROCK, C.L.; JACOB, R.A.; BOWEN, P.E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrientes: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, v.96, p.693-702, 1996.

SAMANTA, S.; GHSHAL, A.; BHATTACHARYA, K.; SAHA, B.; WALDEN, P.; MANDAL, C. Sialoglycosylation of RBC in visceral leishmaniasis leads to enhanced oxidative stress, calpain-induced fragmentation of spectrin and hemolysis. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e42361, 2012.

SANCHEZ, M. A.; DIAZ, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F.J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **The American Journal of tropical medicine and hygiene**. v. 70, n. 6, p. 618–624, 2004.

SEN, G.; MUKHOPADHAYA, R.; GHOSAL, J.; BISWAS, T. Oxidative damage of erythrocytes: a possible mechanism for premature hemolysis in experimental visceral leishmaniasis in hamsters. **Annals of Hematology**, v. 80, n. 1, p. 32–37, 2001.

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

SOLCÀ, M. D. S.; GUEDES, C.E.; NASCIMENTO, E.G.; OLIVEIRA, G.G.; DOS SANTOS, W.L.; FRAGA, D.B.; VERAS, P.S. 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. 133–40, 2012.

SOLCÀ, M. D. S.; BASTOS, L.A.; GUEDES, C.E.S.; BORDONI, M.; BORJA, L.S.; LARANGEIRA, D.F.; DA SILVA ESTRELA TUY, P.G.; AMORIM, L.D.; NASCIMENTO, E.G.; DE SÁ OLIVEIRA, G.G.; DOS SANTOS, W.L.; FRAGA, D.B.; VERAS, P.S. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e103635, 2014.

STRAUSS-AYALI, D.; JEFFE, C.L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples , for the

Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 189, p. 1729–1733, 2004.

TANG, X.; XIA, Z.; YU, J. An experimental study of hemolysis induced by onion (*Allium cepa*) poisoning in dogs. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.31,n. 2, p.143-149, 2008.

TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J.B.; MACHADO, J.G.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 118–123, 2009.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. Fact Sheets. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acesso em 02 jan 2015.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, n.1, p.139-161, 1994.

ZAMZAMI, B. N; SUSIN, S.A.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GOMEZ-MONTERREY, I.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 4, p. 1533-1544, 1996.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARGA PARASITÁRIA TOTAL E TECIDUAL COM O ESTRESSE OXIDATIVO E A ANEMIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

TORRECILHA, R.B.P¹; ALMEIDA, B.F.M.¹; BOSCO, A.M.¹; NARCISO, L.G.¹; BAPTISTIOLLI, L.¹; UTSUNOMIYA, Y.T.²; COURTENAY, D. A. O.³; CALVO-BADO, L.³; DINGER, E.³; NUNES, C.M.⁴; CIARLINI, P.C.⁵

RESUMO - A leishmaniose visceral canina é uma zoonose de importância epidemiológica, tem o cão (*Canis lupus familiaris*) como principal reservatório urbano. O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes no organismo que recentemente foi associado à anemia nesta doença. O presente estudo objetivou testar a hipótese de que há associação entre a anemia e o estresse oxidativo e que tais alterações são proporcionais as cargas parasitárias (CP) total e de diversos tecidos em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. Para tal, foram coletadas amostras de sangue periférico e tecidos (pele, sangue, leucócitos e conjuntivas) de 39 cães para a quantificação de marcadores de estresse oxidativo (capacidade de antioxidante total do plasma-TAC, capacidade de oxidante total do plasma-TOC, relação TOC/TAC, peroxidação lipídica-TBARS hemácia e plasma, albumina, ácido úrico e bilirrubinas) e para CP (pele, sangue, papa de leucócitos, conjuntiva direita e esquerda). Após a quantificação das cargas dos diversos tecidos foi calculada a carga parasitária total. Todos os marcadores de estresse oxidativo se correlacionaram com as CP, tendo sido observado aumento significativo ($p < 0,05$) de antioxidantes (TAC e Ácido úrico) e redução de oxidantes (TOC, TOC/TAC, TBARS hemácia), e não houve associação entre parâmetros hematológicos e CP. Estes achados sugerem que o grau de anemia e sua causa independem da CP e não está associada ao estresse oxidativo ou qualquer mecanismo hemolítico na leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: Oxidantes, Antioxidantes, Eritrócitos, Anemia hemolítica, qPCR

1 Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.

*autor para correspondência: rafaeltorrecilha@gmail.com

2 Pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ. Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

3 The University of Warwick, School of Life Sciences, United Kingdom

4 Docente, Departamento Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.

5 Docente, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.

CHAPTER 2 – ASSOCIATIONS BETWEEN TOTAL AND TISSUE-SPECIFIC PARASITE LOAD AND OXIDATIVE STRESS AND ANEMIA IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

TORRECILHA, R.B.P¹; ALMEIDA, B.F.M.¹; BOSCO, A.M.¹; NARCISO, L.G.¹; BAPTISTIOLLI, L.¹; UTSUNOMIYA, Y.T.²; COURTENAY, D. A. O.³; CALVO-BADO, L.³; DINGER, E.³; NUNES, C.M.⁴; CIARLINI, P.C.⁵

ABSTRACT - Visceral leishmaniasis is a zoonosis of great epidemiological relevance whose main urban reservoir is the domestic dog (*Canis lupus familiaris*). Oxidative stress, the imbalance between oxidants and antioxidants, has been recently incriminated as one of the possible triggers of anemia in canine visceral leishmaniasis (CVL). Here, we investigated the putative relationship between parasite load, anemia, and markers of oxidative stress in dogs naturally infected with *Leishmania spp.* We extracted DNA from peripheral blood, skin, right and left conjunctiva, and packed white cells of 39 dogs for parasite load estimation via quantitative polymerase chain reaction (qPCR). In order to represent the total parasite load (i.e., the parasitism across different analyzed tissues), we applied a principal components analysis to the matrix of tissue-specific qPCR results to create a single synthetic variable that captures the information content present in the four different original variables. Markers of oxidative stress included albumin, uric acid, bilirubin, total antioxidant capacity (TAC), total oxidant capacity (TOC), oxidative stress index (TOC/TAC) and serum and packed red cells Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Additional laboratory analysis included complete blood count (CBC) and biochemical profile. We found that all markers of oxidative stress are associated with parasite load, with significant increase ($p < 0.05$) in antioxidants (TAC and uric acid) and reduction in oxidants (TOC, TOC/TAC, packed red cells TBARS) conditional on increased parasitism. However, hematologic parameters presented no significant association with parasite load. These findings suggest that anemia is independent of the extent of tissue parasitism, occurrence of oxidative stress, or hemolytic mechanisms in CVL.

Keywords: Oxidants, Antioxidants, erythrocytes, hemolytic anemia, qPCR

1 College of Veterinary Medicine of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author : rafaelatorrecilha@gmail.com

2 College of Veterinary Medicine of Jaboticabal, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

3 The University of Warwick, School of Life Sciences, United Kingdom

4 Department of Animal Health and Production, Veterinary Medicine, São Paulo State University, Araçatuba, Brazil

5 Department of Clinical, Surgery and Animal Reproduction, College of Veterinary Medicine of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba, São Paulo, Brazil

1 Introdução

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp, que ocorre em regiões tropicais e subtropicais. Em cães, após a picada da fêmea do vetor, principalmente em zonas com poucos pelos como na cabeça (principalmente em regiões nasal e auricular) e nas áreas inguinal e perianal. Com a inoculação do parasita na derme, o protozoário se multiplica em macrófagos e se dissemina para outros tecidos (SOLANO- GALLEGO et al., 2009). Há uma relação direta entre o quadro clínico e a carga parasitária em de cães (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007). A anemia é umas das alterações laboratoriais mais frequente em cães infectados (REIS et al., 2006) e os mecanismos que causam a anemia na LVC são multifatoriais e até o momento não estão bem esclarecidos.

O estresse oxidativo foi recentemente descrito na LVC (ALMEIDA et al., 2013), e Bildik et al. (2004) observaram uma relação entre anemia, o aumento da peroxidação lipídica e a diminuição de antioxidantes em cães e o dano eritrocitário pode estar associado à peroxidação lipídica devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (STOCKS; DORMANDY, 1971), principalmente por este tipo celular não possuir capacidade de sintetizar novos lipídeos e proteínas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001). A perda de fluidez e deformabilidade eritrocitária decorrente das lesões oxidativas na membrana celular favorecem a fagocitose destas células por macrófagos (CHRISTIAN, 2000).

Em hamsters infectados com *Leishmania* spp. já foi observada hemólise, aumento da peroxidação lipídica e aumento da carga parasitária (SEN et al., 2001), bem como alterações na eritropoiese da medula óssea (LAFUSE et al., 2013). Com base nestas evidências, foi investigada a hipótese de que há associações entre a anemia e o estresse oxidativo e que tais alterações são proporcionais à carga parasitária (CP) total e de diversos tecidos na LVC.

2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido de acordo com os princípios éticos em uso de animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Protocolo CEUA-FOA 01984-2012).

2.1 Seleção dos Animais

Foram selecionados 39 cães adultos sem raça definida, naturalmente infectados com *Leishmania* spp., todos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da Cidade de Araçatuba-SP e diagnosticados por meio da identificação da forma amastigota ao exame citológico de aspirado de linfonodo poplíteo. Os cães positivos foram submetidos a eutanásia compulsória seguindo a legislação vigente do país.

2.2 Obtenção de amostras

Foram colhidos 5 mL de sangue total de cada animal por punção da veia jugular, dos quais 4 mL foram acondicionados em tubos heparinizados estéreis para realização de análises bioquímicas plasmáticas, 1 mL foi acondicionado em tubo com EDTA para a realização do hemograma. A carga parasitária de sangue e papa de leucócitos foram obtidas também através da punção de jugular, a qual 10 mL foi acondicionado em tudo com EDTA para separação de papa de leucócito e 2 mL para impregnação em papel filtro Whatman® (DNA-FTA Cards) . Para quantificação da CP em tecidos, imediatamente após a eutanásia, foram coletados "swab" conjuntival bilateral com material estéril e armazenado em tubo plástico. As biópsias de pele foram obtidas por *punch* de ponta de orelha e armazenadas em tubo eppendorf contendo 200 µL de RNA lather. As amostras sanguíneas foram mantidas refrigeradas a -20°C até o momento do processamento laboratorial.

2.3 Análises Laboratoriais

As análises bioquímicas plasmáticas dos antioxidantes endógenos foram realizadas em espectrofotômetro automatizado (BS 200, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China), previamente calibrado com calibrador e soros controles níveis I e II, utilizando-se reagentes comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain). A albumina foi determinada pelo método do verde de bromocresol; bilirrubina pelo método sulfanílico diazotado e o ácido úrico pelo método enzimático uricase/peroxidase. A capacidade antioxidante total plasmática (TAC) foi determinada pelo método colorimétrico do cátion ABTS (2,2'-Azino diethyl-bezothiazoline sulfonic acid) em que antioxidantes presentes no plasma inibem a oxidação dos substratos presentes nos reagentes, impedindo a mudança de cor do meio, assim determinando a capacidade antioxidante do plasma. Os resultados foram expressos em mmol de equivalente de Trolox/L pós comparação das amostras com curva padrão de diversas concentrações de Trolox (EREL, 2004). A capacidade de oxidante total plasmática (TOC) foi quantificada pelo método colorimétrico do laranja de xinelol, conforme Erel (2005). Os resultados de TOC foram expressos em mmol de peróxido de hidrogênio equivalente/L, antes da comparação das amostras com a curva padrão de concentrações variadas de peróxido de hidróxido. O índice de estresse oxidativo foi calculada com a seguinte fórmula: $TOC/TAC = 100 \times [(TOC, H_2O_2 \text{ equivalente } \mu\text{mol/L}) / (TAC, \mu\text{mol Trolox equivalente/L})]$, sendo seu resultado expresso em taxa percentual (AYCICEK et al., 2005). Todas as reações bioquímicas foram processadas em duplicata, a 37°C, conforme orientações dos fabricantes.

Os valores do eritrograma foram obtidos com auxílio de contador automatizado de células para uso veterinário (BC-2800Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China). A contagem de reticulócitos foi realizada conforme Jain (1986). Ao obter 100µL de papa de leucócitos foi

adicionado 1700µL de solução de lise de eritrócitos (Solução de cloreto de amônio), centrifugado, posteriormente retirado sobrenadante e lavado com solução de PBS, este último procedimento repetido até cinco vezes, seguido de armazenamento a -20°C .

A peroxidação lipídica de plasma sanguíneo e da papa de hemácias foi determinada pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Hunter (1985), com auxílio de leitor automático de placas de 96 poços (Readwell Touch, Robonik PVT LTD, Thane, India), em 545 nm. Os valores foram expressos em µmol/L após comparação das amostras com uma curva de calibração com diversas concentrações de malondialdeído (MDA).

2.4 Avaliação da carga parasitária por reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR)

O DNA das amostras de pele foi extraído utilizando-se reagentes comerciais (Ear Tissue-ET®, Chemagen cmg-1011, Perkin Elmer), de acordo com as instruções do fabricante, exceto a lise que foi realizada utilizando-se 50-100µL dependendo do tamanho (espessura e peso) da pele da orelha. Foram adicionados 200µL de solução tampão ao DNA e acondicionado a -20°C. O DNA dos "swab" conjuntivais foram extraídos utilizando-se o kit Chemagen (PerkinElmer, cmg-1211), de acordo com as recomendações do fabricante, exceto para lise de células da amostra, que foi utilizado um volume de 500µL de tampão de lise por 30 minutos, a 56°C. O DNA foi acondicionado em 70µL de solução tampão e armazenado a -20°C.

O DNA da amostra de sangue colhida em papel filtro Whatman® (DNA-FTA cards) e armazenado a -4°C, foi extraído utilizando-se o kit Chemagen (PerkinElmer®), seguindo-se as instruções do fabricante, tendo sido mantido a -20°C até o processamento. Para extração de DNA de papa de leucócitos foi utilizada kit Chemagen (PerkinElmer®), sendo utilizados 25µL de papa de leucócitos adicionados a 400µL de tampão de lise de eritrócitos (Blood Lise SDS) e 8µL de Proteinase K, incubando-se a solução em 56°C por 18 horas

(overnight). Após este período foram realizadas três sucessivas lavagens com soluções tampões e separadas por esferas magnéticas, em seguida o sobrenadante foi removido e realizou-se a secagem por aproximadamente 20 minutos sendo as amostras eluídas posteriormente em 200µL de tampão.

A qPCR foi realizada utilizando-se 900nM dos oligonucleotídeos iniciadores previamente validados por Francino et al. (2006) para amplificação de 120 pares de bases do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania infantum*: Leish F (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e Leish R (5'-ACCCCAGTTTTCCGCC-3') e 250 nM da sonda Leish prob (5'-AAAATgggTgCAgAAACCCcgTTC-3'), em um volume total de 13µL com 2x TaqMan master mix (Applied Biosystems®). As reações foram realizadas em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, em termociclador 7500 Fast- Real Time PCR System (Applied Biosystems®). A quantificação do DNA da *Leishmania* spp. foi feita com base em comparações de valores de Ct (do inglês- Cycle threshold) com curva padrão construída a partir de 10 séries de diluições (0,01 a 10⁵ parasitos/mL) de DNA de culturas de promastigotas de *Leishmania infantum* (ITAMP-263 DD8). Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Considerou-se positiva a amostra que apresentasse resultado de carga maior que zero em Ct menor ou igual a 36. Amostras de DNA de controles negativos foram obtidos através de sangue de 30 cães saudáveis da Inglaterra, sem histórico de viagem ao exterior (controle de área não endêmica) e 40 cães da cidade de São Paulo (controle de área endêmica).

O controle endógeno da região foi realizada por meio da amplificação de 187 pares de bases a partir do gene β - actina, usando-se os oligonucleotídeos iniciadores ACTB F 5'-CCTgCggCATCCATgAAA-3', ACTB R 5'-ggggTgCgATgATCTTgATCTT-3' e ACTB TM 5'-AggACCTCTATgCCAACACAgTgCTgT-3' (FAM-labelled TaqMan, TIB MOLBIOL, Alemanha). As curvas padrões foram preparadas utilizando-se número de cópias do gene β - actina (10⁵ a 10¹ por reação) a partir de plasmídeo contendo fragmento de 187 pares de bases deste gene. O fragmento de DNA foi previamente clonado em TOPO PCR 2.1 (Invitrogen) em

E. coli transformada. O gene β - actina foi quantificado a partir de uma reação qPCR separada para ensaio TaqMan *Leishmania*. Parasitas possuem duas cópias do gene β - actina. Para comparação da CP em diferentes tipos de amostras, o valor de parasitas foi normalizado, dividindo-se este valor pelo número de β - actina detectado na amostra.

A avaliação da carga parasitária foi realizada na School of Live Science da Universidade de Warwick, Inglaterra.

2.5 Análise Estatística

As cargas parasitárias (CP) obtidas por qPCR em diferentes tecidos são compostas por uma distribuição de mistura: amostras podem apresentar CP = 0 com probabilidade π , ou distribuição log-normal com probabilidade $1 - \pi$. Deste modo, a distribuição resultante possui alta assimetria à direita, não atendendo à pressuposição de normalidade da maioria dos testes estatísticos convencionais. Assim, a relação entre CP e cada uma das variáveis hematológicas e de estresse oxidativo foi testada a partir do ajuste do seguinte modelo linear exponencial:

$$\log_{10}(y_i+1)=\mu+x_i b+e_i$$

Onde, relativo a amostra i , y_i é a CP, μ é a média geral, x_i é a variável testada, b é o coeficiente angular da regressão, e e_i é o termo residual. O modelo pressupõe $e \sim N(0, \sigma_e^2)$, onde σ_e^2 é a variância residual, sendo que a aproximação exponencial da variável dependente atende ao pressuposto. Esta parametrização do modelo permite uma interpretação direta da estimativa de b . Espera-se que o acréscimo de uma unidade em x multiplique a carga parasitária por um fator 10^b . Além disso, o sinal da estimativa de b indica se a associação é positiva ou negativa.

A fim de representar a CP total, uma variável sintética combinando as CP nos diferentes tecidos foi produzida por meio de uma análise de componentes principais. De forma breve, a matriz de CP log-transformadas e

padronizadas foi fatorizada por meio da técnica de decomposição em valores singulares. As contribuições relativas de cada CP original para a variância dos componentes principais foram utilizadas como critério de escolha da nova variável sintética. Todas as análises apresentadas foram realizadas no software R v3.0.2 (disponível em: www.r-project.org/)

3 Resultados

3.1 Caracterização do quadro anêmico, dos marcadores de estresse oxidativo do plasma e dos eritrócitos de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral

Os valores de eritrócitos, volume globular e hemoglobina apresentaram grande variação nos cães com LVC (**Tabela 1**), e anemia do tipo normocítica hipocrômica não responsiva foi observada em 100% dos casos. Apenas um cão apresentou leve reticulocitose (JAIN, 1986). Nenhum cão apresentou plasma hemolisado ou icterico, e todos apresentaram hipoalbuminemia, não obstante 56,41% terem apresentado hiperproteinemia (**Tabela 1**).

3.2 Carga parasitária tecidual e total

A carga parasitária apresentou alta assimetria e variou amplamente em todos os tecidos analisados (**Tabela 2**), sendo que o sangue foi o material biológico que menos expressou a infecção na LVC. A pele, por sua vez, apresentou a maior amplitude de carga parasitária, variando de 0 a 41,31 milhões de parasitos por mililitro. As conjuntivas apresentaram-se como o tecido mais sensível para detecção da infecção, uma vez que a maioria das amostras colhidas foram positivas para *Leishmania spp.*

Tabela 1- Análise estatística descritiva (Mediana, média \pm desvio-padrão e amplitude) do eritrograma, marcadores de estresse oxidativo

plasmático e eritrocitário de cães naturalmente parasitados por *Leishmania* spp.

Parâmetro	Mediana	Média	Valor de referência*
Volume globular (L/L)	0,25	0,26±0,06 (0,17-0,44)	0,37-0,55
Hemácias (x10 ¹² /L)	3,78	3,70±1,13 (1,86-6,22)	5,5-8,5
Hemoglobina (g/L)	75	73,80±21,80(36,00-122,00)	120-180
VCM (fL)	68,30	68,32±4,59(61,00-78,90)	60-77
CHCM (%)	29	29,19±1,16(26,90-31,80)	32-36
Albumina (g/L)	13,08	14,11±3,56(8,83-22,31)	26-33
Proteína total (g/L)	73,49	71,55±19,19(19,99-98,92)	54-71
Ácido Úrico (mmol/L)	0,03	0,04±0,02 (0,008-0,14)	0-0,11
Bilirrubina Total (mmol/L)	1,53	2,05±1,53 (0,03-4,78)	1,71-8,55
TOC (µmol/L)	64,67	89,75±100,26(0,02-273,80)	NE
TAC (mmol/L)	0,52	23,55±54,29(0,34-231,90)	NE
TOC/TAC (%)	29,18	24,13±20,00(0,0024-53,69)	NE
TBARS plasmático (µmol/L)	29,24	33,33±19,89(13,27-111,60)	NE
TBARS eritrocitário (µmol/L)	28,16	30,09±8,97(13,75-46,84)	NE

VCM – Volume corpuscular médio; CHCM – Concentração hemoglobina corpuscular média; TOC – Capacidade de oxidantes total plasmática; TAC– Capacidade de Antioxidantes total plasmática; NE- não encontrado, TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. * Valores de referência hematológicos (JAIN, 1986), bioquímicos (KANEKO, 1997).

Tabela 2- Análise estatística descritiva (Mediana, Média ± Desvio-Padrão e Amplitude) para carga parasitária quantificada em diferentes tecidos em cães naturalmente parasitados por *Leishmania* spp.

Tecido	Mediana	Média
Pele	132.400,00	2.455.000,00±7.245.184,00(0- 41.310.000,00)
Sangue	0,00	2.757,00 ± 11.558,88 (0-65.940,00)
Leucócitos	361,70	13.630,00 ± 74.610,83 (0-467.100,00)
C.D	459,80	11.980,00 ± 28.553,45 (0-320.900,00)
C.E	403,10	39.440,00 ± 80.761,80 (0-320.900,00)

C.D- conjuntiva direita; C.E- conjuntiva esquerda.

A decomposição em valores singulares da matriz da carga parasitária (CP) log-transformadas e padronizadas deu origem a cinco variáveis sintéticas ortogonais (i.e., não correlacionadas). Cada variável nova (componente principal - PC) capturou diferentes porcentagens da variância original: PC1 =

53,72%, PC2 = 19,27%, PC3 = 18,85%, PC4 = 6,43%, e PC5 = 1,73%. Além de capturar a maior parte da variância inicial, a variável PC1 apresentou contribuição mais equilibrada de cada uma das variáveis originais: pele = 25,34%, sangue = 8,81%, papa de leucócitos = 11,36%, olho direito = 26,60% e olho esquerdo = 27,89%. Logo, PC1 foi escolhida como variável composta para representar a carga parasitária total dos animais.

3.3 Associação entre a carga parasitária, o estresse oxidativo e a anemia

A carga parasitária de todos os tecidos analisados apresenta pelo menos uma associação com os marcadores de estresse oxidativo (**Tabela 3**). Em relação aos parâmetros eritrocitários, apenas o CHCM apresentou associação com as conjuntivas. Por outro lado, a peroxidação lipídica eritrocitária foi o marcador de estresse oxidativo que apresentou a maior associação com a carga parasitária dentre todos os tecidos analisados, exceto o sangue.

A conjuntiva foi o tecido que menos se mostrou negativo para carga parasitária e também o que mais se associou aos diferentes marcadores de estresse oxidativo analisados (**Tabela 3**), havendo correspondência entre os resultados obtidos em ambas conjuntivas. Embora a pele tenha apresentado as maiores cargas parasitárias (**Tabela 2**), este tecido demonstrou menor associação com os marcadores de estresse oxidativo, seguido do sangue e leucócitos (**Tabela 3**). Acredita-se que a pele possui maiores cargas por ser a porta de entrada da infecção e pelo protozoário possuir tropismo pela área.

O ácido úrico apresentou associação positiva e significativa em quatro das seis cargas parasitárias analisadas ($p < 0,05$). Apesar de a albumina ter apresentado associações sugestivas com as mesmas cargas parasitárias que o ácido úrico ($p < 0,01$), estas associações foram negativas. A pele e o sangue foram os tecidos que apresentaram menor número de variáveis associadas nesta análise.

Tabela 3- Níveis de significância para associação entre a carga parasitária de tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. e parâmetros eritrocitários e de estresse oxidativo.

	Pele	Sangue	Leucócitos	C.D	C.E	PC1
Albumina	NS	(-)0,0795 *	NS	(-)0,0359 **	(-)0,0249 **	(-)0,0622 *
Ácido úrico	NS	0,0227 **	NS	0,0256 **	0,0105 **	0,0338 **
CHCM	NS	NS	NS	0,0342 **	0,0793 *	NS
TAC	NS	NS	0,0055***	NS	NS	NS
TOC	NS	NS	NS	(-)0,0840 *	(-)0,0301 **	NS
TOC/TAC	NS	NS	NS	(-)0,0188 **	(-)0,0244 **	NS
TBARS eritrocitário	(-) 0,0046 **	NS	(-) 0,0050***	(-)0,0535 *	(-)0,0522 *	(-)0,0139 **

qPCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real; C.D- conjuntiva direita; C.E- conjuntiva esquerda; TOC – Concentração de oxidante total plasmático; TAC– Capacidade de antioxidantes plasmática.;TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PC1: carga parasitária total; (-) associação negativa entre a variável e a carga parasitária; NS- não significativa; * $0,05 \leq p < 0,10$ sugestivo; ** $0,01 \leq p < 0,05$ significante; *** $p < 0,01$ muito significante.

4 Discussão

A difusão da *Leishmania* spp no organismo é ampla e já foi observada em diferentes tecidos oculares de cães infectados (PEÑA et al., 2007). As conjuntivas foram os tecidos que mais obtiveram associações com as CP, reforçando outros estudos que igualmente demonstram que o *swab* da conjuntiva é uma boa alternativa para o diagnóstico molecular em LVC por evitar procedimentos invasivos (BERRAHAL et al., 1996; STRAUSS-AYALI et al., 2004) e possuem sensibilidade semelhante aos nódulos linfáticos (LOMBARDO et al., 2012) e à medula óssea (DE ALMEIDA et al., 2012). Recentemente, Ceccarelli et al. (2014) também observaram que a conjuntiva ocular é útil para o primeiro diagnóstico da doença. Os resultados da qPCR do sangue no presente estudo reforçam a observação de estudos anteriores de que este tecido apresenta baixo valor diagnóstico (LACHAUD et al., 2002; REALE et al., 1999).

No presente estudo a CP sistêmica calculada a partir da qPCR de vários tecidos surge como uma boa alternativa para estabelecer associações com alterações laboratoriais. Como não há outros estudos similares sobre CP sistêmica na LVC para fins de comparação, outras investigações são necessárias para melhor avaliar o potencial analítico desse parâmetro.

Embora a causa da anemia na LV seja considerada multifatorial, alguns estudos têm associado à forma hemolítica ao estresse oxidativo (BILDIK et al., 2004; STOCKS; DORMANDY, 1971;). As anemias hemolíticas se caracterizam pelo aumento do índice ictérico plasmático, bilirrubina plasmática, e por serem do tipo responsiva, com aumento dos reticulócitos circulantes que resultam muitas vezes em aumentos de VCM e CHCM (THRALL et al., 2006). Em humanos com LV, o conjunto de fatores como estresse oxidativo, fragilidade de membrana do eritrócito, peroxidação lipídica, eritrofagocitose sugerem que a hemólise observada está associada com comprometimento da integridade da membrana dos eritrócitos (SAMANTA et al., 2012). Diferentemente os cães do presente estudo não apresentaram sinais de hemólise. Estes e outros mecanismo necessitam ser investigados a fim de melhor entender o mecanismo da anemia na LVC. Há de ser considerado ainda que o presente estudo se limita a um pequeno número de casos de LVC e que co-infecções podem mascarar o quadro hematológico e afetar a sua relação com os marcadores de estresse oxidativo.

Reis et al. (2006), igualmente não identificaram sinais hematológicos de hemólise na LVC, tendo classificado a anemia como normocítica normocrômica não responsiva. Divergindo parcialmente de Reis et al. (2006), não foi observada relação entre a CP e o grau da anemia estimada pelo VG, assim como todos os cães apresentaram a forma hipocrômica. A hipocromia expressa anemia por deficiência de ferro de origem nutricional uma vez que todos animais selecionados foram capturados na rua e apresentavam baixo escore corporal. A má condição nutricional dos cães pode também explicar em parte a hipoalbuminemia observada. Baixas concentrações de albumina plasmática e a hiperproteinemia também tem sido associadas à resposta humoral policlonal da

LVC (REIS et al., 2006; STRAUSS- AYALI; BANETH, 2001) à nefropatia (ALMEIDA et al., 2013). Além disso, o baixo escore corporal pode estar relacionado a hiporexia, manifestação clínica comum em cães em fases avançadas da doença.

Segundo Reis et al. (2006), o grau de anemia e disproteinemia na LVC são maiores em cães sintomáticos e com a maior CP na medula óssea, porém o mesmo não ocorreu em relação a CP de outros tecidos. Diferentemente, no presente estudo somente o CHCM apresentou uma associação positiva com as CPs conjuntivais. Há de se ressaltar que Reis et al. (2006) estimaram a CP a partir da contagem de formas infectantes em tecidos em diferentes estágios clínicos da LVC fazendo associação à sintomatologia. Utilizando qPCR foi possível estabelecer uma associação negativa entre os valores de albumina plasmática com a CP total, assim como uma associação igualmente negativa com o sangue e as conjuntivas direita e esquerda.

A albumina é o antioxidante endógeno plasmático mais importante e sua diminuição hipoteticamente poderia contribuir para o estresse oxidativo já descrito na LVC (ALMEIDA et al., 2013). De modo aparentemente compensatório, houve uma associação positiva e similar entre a CP total e tecidual (sangue e conjuntivas) e outro antioxidante importante, o ácido úrico, que atua também como antioxidante não enzimático, protegendo o organismo contra ERO e radicais hidroxila (BECKER et al., 1993). A interpretação desses resultados e o confronto com outros deve ser feita com cautela, uma vez que não encontramos em nossa revisão outros estudos que tenham quantificado a associação entre alterações hematológicas com a CP total estimada por qPCR.

Talvez a diferença metodológica empregada possa em parte justificar a divergência com outro estudo no qual havíamos observado um decréscimo na concentração plasmática de ácido úrico proporcional ao avanço da LVC, estágios II e IV, classificado de acordo com a sinais clínicos (ALMEIDA et al., 2013).

Neste último estudo, com o avanço clínico da LVC foi observada uma diminuição de albumina, somada a uma queda de ácido úrico e consequente

aumento do TBARS plasmático, caracterizando um típico quadro de estresse oxidativo por decréscimo dos valores de TAC. Comparado ao estudo de Almeida et al. (2013), o TOC foi superior e os antioxidantes plasmáticos (albumina, ácido úrico e TAC) inferiores, entretanto não houve associação entre a CP e TBARS plasmático. Já as associações negativas da CP com TOC, positiva em relação ao TAC e o índice de estresse oxidativo (TOC/TAC) sugerem que nos cães com LVC investigados o estresse oxidativo não está associado a CP. Considerando a similaridade entre métodos analíticos e equipamentos empregados no estudo de Almeida et al. (2013), é provável que aparente contradição entre este dois estudos seja resultante da diferença de abordagem do tema de investigação, sendo que neste estudo não houve classificação do grau de infecção dos cães com leishmaniose. Paltrinieri et al. (2010) também não observaram diferença entre substâncias derivadas de ERO em cães com leishmaniose, enquanto que Almeida et al. (2013) observaram no estágio mais severo da LVC uma diminuição de superóxido e aumento de apoptose de neutrófilos.

Diferentemente de relatos em humanos e animais de laboratório, com base no conjunto dos resultados obtidos, não foi possível estabelecer em cães com LV uma relação entre o estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e anemia hemolítica. O fato de não ter sido observado qualquer alteração hematológica compatível com hemólise e oxidação no presente estudo, assim como a observação de que há uma associação negativa entre a TBARS eritrocitário e a CP total e tecidual (pele, leucócitos e conjuntivas) sugerem que este tema merece ser melhor investigado.

5 Conclusão

O grau de anemia independe da CP e a sua causa não está associada ao estresse oxidativo, à peroxidação lipídica ou qualquer outro mecanismo hemolítico.

6 Agradecimentos

CAPES pela bolsa auxílio de mestrado, a Laine Margareth Gabas pelo auxílio, aos integrantes do laboratório clínico, ao Centro de Controle de Zoonose (CCZ), aos veterinários participantes e aos membros da Universidade de Warwick.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B.F.M.; NARCISO, L.G.; MELO, L.M.; PREVE, P.P.; BOSCO, A.M.; LIMA, V.M.F.; CIARLINI, P.C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**. v. 198, n. 3, p. 599–605, 2013.

AYCICEK, A.; EREL, O.; KOCYIGIT, A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. **Pediatrics International**, v. 47 , p. 635–639, 2005.

BAGCHI, D.; HASSOUN, A.; BAGCHI, M.; STOHS, S. J. Protective effects of antioxidants against endrin- induced hepatic lipid peroxidation, DNA damage, and excretion of urinary lipid metabolites. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15, p. 217-222, 1993.

BARRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOROUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55,n. 3, p. 273-277, 1996.

BECKER, B.F. Towards the physiological function of uric acid. **Free Radical & Biology Medicine**, v.14, n.6, p.615-631, 1993.

BILDIK, A.; KARDIN, F.; SEYREK, K.; PASA, S.; OZENSOY, S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n. 1, p. 63–66, 2004.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. Roca: São Paulo, 2004. 376 p.

CECCARELLI, M.; GALLUZI, L.; SISTI, D.; BIANCHI, B.; MAGNANI, M. Application of qPCR in conjunctival swab samples for the evaluation of canine leishmaniasis in borderline cases or disease relapse and correlation with clinical parameters. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 460, 2014.

CHRISTIAN, J.A. Red blood cell survival and destructuon. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.C.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 117-124.

DE ALMEIDA FERREIRA, S.F.; LEITE, R.S.; ITAUSSU, L.T.; ALMEIDA, G.G.; SOUZA, D.M.; FUJIWARA, R.T.; DE ANDRADE, A.S.; 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 Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 12, 1103-1111. 2005.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v., n. 4, p. 277-285. 2004.

EREL, O.; KOÇYIGIT, A.; AKTEPE, N.; AVCI, S. Leukocyte adenosine deaminase, superoxide dismutase activities and lipid peroxidation in cutaneous Leishmaniasis. **Acta Parasitologica Turcica**, v. 21, p. 160-162, 1997.

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 leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.214-221, 2006.

HUNTER, M. I.; MOHAMED, J. B. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in Duchenne muscular dystrophy. **Clinica Chimica Acta**, v. 155, p. 123-131, 1986.

JAIN, N. C. Hematologic techniques. In: JAIN, N. C. (Ed). **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, cap.2, p.20-86.

JI, L. L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radical Biology & Medicine**, v.18, n.6, p.1079-1086, 1995.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. California: Academic Press. 1997.

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

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRI, 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, p. 10-17, 2012.

PALTRINIERI, S.; RAVICINI, S.; ROSSI, G.; ROURA, X. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v.186, p.393-395, 2010.

PEAKE, J.; SUZUKI, K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induce oxidative stress. **Exercise Immunology Review**, v. 10, p.129-141, 2004.

PEÑA, M. T.; KLAUSS, N.G; FONDEVILA,D.; LEIVA,M.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.; DUBIELZIG, R.R. Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. **Journal of Comparative Pathology**, v. 138, n. 1, p. 32–39, 2008.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO,A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FURTES, L.; TIMÓN, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.; ALBEROLA, J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v.37, p.683-693, 2007.

SAMANTA, S.; GHSHAL, A.; BHATTACHARYA, K.; SAHA, B.; WALDEN, P.; MANDAL, C. Sialoglycosylation of RBC in visceral leishmaniasis leads to enhanced oxidative stress, calpain-induced fragmentation of spectrin and hemolysis. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e42361, 2012.

SEN, G.; MUKHOPADHAYA, R.; GHOSAL, J.; BISWAS, T. Oxidative damage of erythrocytes: a possible mechanism for premature hemolysis in experimental visceral leishmaniasis in hamsters. **Annals of Hematology**, v. 80, n. 1, p. 32–37, 2001.

STOCKS, J.; DORMANDY, T.L. The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. **British Journal of Haematology**, v.20, 95-111, 1971.

STRAUSS-AYALI, D.; BANTH, G. Canine visceral leishmaniasis. In: CARMICHAEL, L. (Ed.), Recent advances in canine infectious diseases. **International Veterinary Information Service**, Ithaca. <http://www.ivis.org>. 2001.

STRAUSS-AYALI, D.; JEFFE, C.L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples , for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 189, p. 1729–1733, 2004.

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.; De NICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.;WEISER, G. **Hematologia e bioquímica veterinária**. Roca: São Paulo, 2006. 582 p.

VURAL, H.; TATLI, N. Erythrocyte lipid peroxidation, reduced glutathione and serum Vitamin C levels in patients with cutaneous Leishmania. **Acta Parasitologica Turcica**, v. 21, 154p, 1997.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, n.1, p.139-161, 1994.

ZAMZAMI, B. N; SUSIN, S.A.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GOMEZ-MONTERREY, I.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 4, p. 1533-1544, 1996.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3- ASSOCIAÇÕES ENTRE AS ALTERAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS E CARGA PARASITÁRIA TOTAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

TORRECILHA, R. B. P¹; UTSUNOMIYA, Y. T.²; COURTENAY, D. A. O.³; CALVO-BADO, L.³; DINGER, E.³; NUNES, C. M.⁴; CIARLINI, P.C.⁵

RESUMO- A leishmaniose visceral é uma antropozoonose cujo principal reservatório urbano é o cão doméstico. O número e a intensidade das manifestações clínicas são variáveis, sendo sua relação com a extensão do acometimento sistêmico ainda pouco caracterizada. Este estudo teve como objetivo avaliar associações entre as principais alterações clínicas e laboratoriais encontradas na doença com a carga parasitária (CP) quantificada por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) de diversos tecidos, incluindo sangue, papa de leucócitos, pele e conjuntivas. Aditivamente, foi realizada uma análise de componentes principais da variância do parasitismo em diferentes tecidos em uma única variável representativa da CP total. Foram realizados exame físico completo, hemograma e perfil bioquímico de 39 animais naturalmente infectados. Exceto pelo sangue, as associações entre as alterações clínico-laboratoriais e a CP dos diferentes tecidos e a CP total foram semelhantes. Os resultados obtidos sugerem que a presença de caquexia, onicogribose, linfadenomegalia poplítea e alterações dermatológicas são as alterações que melhor se associaram com o grau de parasitismo. A variável mais significativa foi a linfadenomegalia do poplíteo ($p = 2,99 \times 10^{-3}$), seguida das alterações dermatológicas ($p = 5,45 \times 10^{-3}$). O conjunto dos resultados permitem concluir que algumas das alterações clínicas comuns e de fácil avaliação refletem a extensão do parasitismo na leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: Sinais clínicos, parasitismo, qPCR, *Leishmania* spp., *Canis lupus familiaris*

1 College of Veterinary Medicine of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author : rafaelatorrecilha@gmail.com

2 College of Veterinary Medicine of Jaboticabal, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

3 The University of Warwick, School of Life Sciences, United Kingdom

4 Department of Animal Health and Production, Veterinary Medicine, São Paulo State University, Araçatuba, Brazil

5 Department of Clinical, Surgery and Animal Reproduction, College of Veterinary Medicine of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba, São Paulo, Brazil

CHAPTER 3- ASSOCIATIONS BETWEEN CLINICAL AND LABORATORY ALTERATIONS AND PARASITE LOAD IN VISCERAL LEISHMANIASIS

TORRECILHA, R. B. P¹; UTSUNOMIYA, Y. T.²; COURTENAY, D. A. O.³; CALVO-BADO, L.³; DINGER, E.³; NUNES, C. M.⁴; CIARLINI, P.C.⁵

ABSTRACT- The number and intensity of clinical alterations in canine visceral leishmaniasis (CVL) are widely variable, and the relationship between these alterations and the extent of parasitism across tissues is still poorly characterized. We aimed at assessing associations between major clinical and laboratory alterations and parasite load across different tissues in naturally infected dogs. Parasitism in peripheral blood, skin, right and left conjunctiva, and packed white cells was estimated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Additionally, we used the principal components analysis technique to summarize the parasite load observed in multiple tissues into a single variable. Complete physical examination, blood cell count, and biochemical profile were performed in a total of 39 animals. Except for the peripheral blood, associations between clinical and laboratory alterations and parasitism was similarly significant across tissues. Significant differences in the average parasite load was detected between the groups of animals with presence or absence of cachexy, onychogryphosis, popliteal lymphadenomegaly, and dermatological alterations. The most significant variable was popliteal lymphadenomegaly ($p = 2.99 \times 10^{-3}$), followed by dermatological alterations ($p = 5.45 \times 10^{-3}$). These findings indicate that common clinical alterations of effortless measurement, reflect the extension of the parasitism across tissues in CVL.

Keywords: Clinical signs, parasitism , qPCR , *Leishmania spp* , *Canis lupus familiaris*

1 College of Veterinary Medicine of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author : rafaelatorrecilha@gmail.com

2 College of Veterinary Medicine of Jaboticabal, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

3 The University of Warwick, School of Life Sciences, United Kingdom

4 Department of Animal Health and Production, Veterinary Medicine, São Paulo State University, Araçatuba, Brazil

5 Department of Clinical, Surgery and Animal Reproduction, College of Veterinary Medicine of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba, São Paulo, Brazil

1 Introdução

A leishmaniose visceral é uma enfermidade parasitária endêmica em regiões tropicais e subtropicais, causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp. Distribuída em 21 estados brasileiros, a doença é responsável por uma média de 3.500 casos humanos e 277 mortes anuais (MARTINS-MELO et al., 2014). Somente no estado de São Paulo, entre 1999 a 2013, foram registrados 192 óbitos e 2.204 casos (SÃO PAULO, 2014). Nas áreas urbanas, o cão é o principal reservatório da forma visceral, e só na cidade de Araçatuba, entre 1999 e 2004, 41.774 animais foram submetidos a eutanásia pelo Centro de Controle de Zoonoses, de forma que a prevalência da doença na cidade é de cerca de 9% (ANDRADE et al., 2007).

Em cães, após a fêmea do vetor, principalmente em zonas com poucos pelos como na cabeça (principalmente em regiões nasal e auricular) e nas áreas inguinal e perianal. Com a inoculação do parasita na derme, o protozoário se multiplica em macrófagos e se dissemina para outros tecidos (SOLANO- GALLEGO et al., 2009). Molina (1997) observou que o aumento de flebotomíneos infectados está associado aos sinais clínicos mais severos em cães, provavelmente pelo aumento do parasitismo.

As alterações clínicas na leishmaniose visceral canina (LVC) são amplas (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), e as mais comuns incluem lesões de pele, onicogribose, linfadenomegalias, perda de peso, atrofia muscular, intolerância a exercícios, hiporexia, letargia, hepatoesplenomegalia, poliúria e polidipsia, lesões oftálmicas, epistaxe, claudicação, vômito e diarreia (BANETH et al., 2008; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Entre as várias alterações hematológicas encontradas em cães naturalmente ou experimentalmente infectados estão a anemia normocítica normocrômica, a leucopenia por eosinopenia e/ou linfopenia, e a

hiperproteinemia. Nas alterações bioquímicas destacam-se o aumento de globulinas e a hipoalbuminemia (REIS et al., 2006).

A LVC pode ser diagnosticada por meio de exames parasitológicos, sorológicos, ou métodos moleculares associados a parâmetros clínicos e epidemiológicos (MIRO et al., 2008). Os testes sorológicos para o diagnóstico da LVC são os procedimentos mais utilizados (GOMES et al., 2008), no entanto, o diagnóstico da doença se torna difícil quando os animais apresentam baixos títulos de anticorpos ou há reatividade cruzada (COURA-VITAL et al., 2011; FERREIRA et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; TRONCARELLI et al., 2009). O diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. proporciona alta sensibilidade e especificidade (GRAMICCIA, 2005; SOLCA et al., 2012), sendo a utilização da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase) quantitativo em tempo real (qPCR) altamente sensível até em pequenas cargas parasitárias (FRANCINO et al., 2006; MANNA et al., 2009; MARY et al., 2004). As amostras mais utilizadas para este diagnóstico molecular são: baço, medula óssea, linfonodos e pele (MAIA et al., 2008; MIRO et al., 2008; SOLCA et al., 2012).

Apesar da caracterização da extensão da infecção por *Leishmania* spp. em diferentes tecidos ser possível por meio de qPCR, relatos de associações entre carga parasitária e ocorrência de sinais clínicos ou alterações hematológicas e bioquímicas ainda se restringem a poucos estudos (MANNA et al., 2009; REIS et al., 2006). Assim, o presente trabalho objetivou investigar associações entre a carga parasitária na pele, conjuntiva, sangue e papa de leucócitos, com alterações clínicas em cães naturalmente infectados. Adicionalmente foi realizada as mesmas associações com CP total calculada a partir de diferentes tecidos.

2 Material e Métodos

2.1 Seleção dos Animais

O estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos em uso de animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Protocolo CEUA-FOA 01984-2012).

Foram selecionados 39 cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp., provenientes do Centro de Controle de Zoonose da Cidade de Araçatuba-SP. O diagnóstico de infecção foi realizado por exame citológico de aspirado de linfonodo poplíteo. Foi realizada a coleta de sangue seguida de eutanásia e coleta de amostras de tecidos. As amostras sanguíneas foram mantidas a -4°C até o momento do processamento laboratorial. Animais negativos ao exame citológico não foram utilizados.

2.2 Alterações clínicas e avaliações laboratoriais

Foram realizados exames físicos completos e os animais foram classificados de acordo com presença ou ausência de sinais clínicos característicos da LVC. As alterações dermatológicas foram consideradas na presença de alopecia, descamação cutânea, hiperpigmentação e hiperqueratose. Por representar uma alteração dermatológica de maior gravidade, a presença de ulcerações na pele foi tratada como uma variável independente. De forma semelhante, alterações oftálmicas foram definidas como presença de uveítes e/ou conjuntivites. Os animais foram classificados quanto ao aspecto nutricional como caquético, normal e obeso.

Considerou-se portador de lesão hepática cães com níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT) acima de 66 U/L e 102 U/L, respectivamente. Cães com valores de creatinina e ureia, acima de 132,6 mmol/L e 8,33 mmol/L, respectivamente foram classificados

como nefropatas. No presente estudo foram adotados os valores de referência de normalidade para perfil bioquímico e hematológico de cães considerados por Kaneko et al. (1997) e Jain, (1986).

Para análises laboratoriais foram colhidos cinco mililitros de sangue total de cada animal, por punção jugular, dos quais quatro mililitros foram acondicionados em tubos heparinizados estéreis para realização de análises bioquímicas, após obtenção do plasma. O restante do sangue foi acondicionado em tubo com EDTA para realização do hemograma em contador automatizado de células veterinário (BC-2800 Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China).

Amostras de urina foram obtidas por cistocentese para realização do exame de urina tipo I, sendo a densidade urinária obtida por refratometria, e o exame químico realizado utilizando-se tiras reagentes comerciais (Combur10 test®, Roche, Mannheim, Germany). A análise do sedimento foi feita segundo recomendações de Osborne et al.(1995).

As análises bioquímicas plasmáticas foram realizadas em espectrofotômetro automatizado (BS 200, Biosystems, Barcelona, Spain) previamente calibrado com calibrador e soros controles níveis I e II, utilizando-se reagentes comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain). Foi determinado o teor de ureia (método enzimático UV urease/glutamato desidrogenase); creatinina (método cinético do picrato alcalino); albumina (método do verde de bromocresol); colesterol (método enzimático oxidase/peroxidase); triglicerídeos (método de glicerol fosfato oxidase/peroxidase); proteína plasmática total (método do biureto); bilirrubina total (método sulfanílico diazotado); ácido úrico (método enzimático uricase/peroxidase); aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (ambas pelo método cinético UV segundo IFCC); os níveis de globulina foram determinados pela diferença entre proteína total e albumina. Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C, conforme orientações dos fabricantes.

2.3 Avaliação da carga parasitária por qPCR

O DNA das amostras de pele foi extraído utilizando-se reagentes comerciais (Ear Tissue-ET®, Chemagen cmg-1011, Perkin Elmer), de acordo com as instruções do fabricante, exceto a lise que foi realizada utilizando-se 50-100µL dependendo do tamanho (espessura e peso) da pele da orelha. Foram adicionados 200µL de solução tampão ao DNA e acondicionado a -20°C. O DNA dos "swab" conjuntivais foram extraídos utilizando-se o kit Chemagen (PerkinElmer, cmg-1211), de acordo com as recomendações do fabricante, exceto para lise de células da amostra, que foi utilizado um volume de 500µL de tampão de lise por 30 minutos, a 56°C. O DNA foi acondicionado em 70µL de solução tampão e armazenado a -20°C.

O DNA da amostra de sangue colhida em papel filtro Whatman® (DNA-FTA cards) e armazenado a -4°C, foi extraído utilizando-se o kit Chemagen (PerkinElmer®), seguindo-se as instruções do fabricante, tendo sido mantido a -20°C até o processamento. Para extração de DNA de papa de leucócitos foi utilizada kit Chemagen (PerkinElmer®), sendo utilizados 25µL de papa de leucócitos adicionados a 400µL de tampão de lise de eritrócitos (Blood Lise SDS) e 8µL de Proteinase K, incubando-se a solução em 56°C por 18 horas (overnight). Após este período foram realizadas três sucessivas lavagens com soluções tampões e separadas por esferas magnéticas, em seguida o sobrenadante foi removido e realizou-se a secagem por aproximadamente 20 minutos sendo as amostras eluídas posteriormente em 200µL de tampão.

A qPCR foi realizada utilizando-se 900nM dos oligonucleotídeos iniciadores previamente validados por Francino et al. (2006) para amplificação de 120 pares de bases do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania infantum*: Leish F (5'-AACTTTTCTGGTCTCCGGGTAG-3') e Leish R (5'-ACCCCAGTTTTCCGCC-3') e 250 nM da sonda Leish prob (5'-AAAATgggTgCAgAAACCCcgTTC-3'), em um volume total de 13µL com 2x TaqMan master mix (Applied Biosystems®). As reações foram realizadas em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, em termociclador 7500

Fast- Real Time PCR System (Applied Biosystems®). A quantificação do DNA da *Leishmania* spp. foi feita com base em comparações de valores de Ct (do inglês- Cycle threshold) com curva padrão construída a partir de 10 séries de diluições (0,01 a 10^5 parasitos/mL) de DNA de culturas de promastigotas de *Leishmania infantum* (ITAMP-263 DD8). Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Considerou-se positiva a amostra que apresentasse resultado de carga maior que zero em Ct menor ou igual a 36. Amostras de DNA de controles negativos foram obtidos através de sangue de 30 cães saudáveis da Inglaterra, sem histórico de viagem ao exterior (controle de área não endêmica) e 40 cães da cidade de São Paulo (controle de área endêmica).

O controle endógeno da região foi realizada por meio da amplificação de 187 pares de bases a partir do gene β - actina, usando-se os oligonucleotídeos iniciadores ACTB F 5'-CCTgCggCATCCATgAAA-3', ACTB R 5'-ggggTgCgATgATCTTgATCTT-3' e ACTB TM 5'-AggACCTCTATgCCAACACAgTgCTgT-3' (FAM-labelled TaqMan, TIB MOLBIOL, Alemanha). As curvas padrões foram preparadas utilizando-se número de cópias do gene β - actina (10^5 a 10^1 por reação) a partir de plasmídeo contendo fragmento de 187 pares de bases deste gene. O fragmento de DNA foi previamente clonado em TOPO PCR 2.1 (Invitrogen) em *E. coli* transformada. O gene β - actina foi quantificado a partir de uma reação qPCR separada para ensaio TaqMan *Leishmania*. Parasitas possuem duas cópias do gene β - actina. Para comparação da CP em diferentes tipos de amostras, o valor de parasitas foi normalizado, dividindo-se este valor pelo número de β - actina detectado na amostra.

A avaliação da carga parasitária foi realizada na School of Live Science da Universidade de Warwick, Inglaterra.

2.4 Análise Estatística

As cargas parasitárias (CP) obtidas por meio da qPCR em diferentes tecidos são compostas por uma distribuição de mistura: amostras podem

apresentar $CP = 0$ com probabilidade π , ou distribuição log-normal com probabilidade $1 - \pi$. Deste modo, a distribuição resultante possui alta assimetria à direita, não atendendo à pressuposição de normalidade da maioria dos testes estatísticos convencionais. Assim, a fim de obter uma melhor aderência dos dados aos requisitos dos procedimentos de inferência estatística, as CP foram transformadas por meio da função logarítmica $\log_{10}(y+1)$, onde y representa a CP.

A seguir, diferenças na distribuição das CP log-transformadas entre animais com presença ou ausência de cada uma das alterações clínicas foram testadas a partir do teste não-paramétrico U de Mann-Whitney. Apesar de menos robusto do que o teste t não pareado em dados que aderem à normalidade, o teste U não possui pressuposições distribucionais explícitas, sendo apropriado ao teste dos dados log-transformados.

A fim de representar a CP total, uma variável sintética combinando as CP nos diferentes tecidos foi produzida por meio de uma análise de componentes principais. De forma breve, a matriz de CP log-transformadas e padronizadas foi fatorizada por meio da técnica de decomposição em valores singulares. As contribuições relativas de cada CP original para a variância dos componentes principais foram utilizadas como critério de escolha da nova variável sintética. Todas as análises apresentadas foram realizadas no software R v3.0.2 (disponível em: www.r-project.org/).

3 Resultados

3.1 Alterações de sinais clínicos, hematológicas e do perfil bioquímico de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral.

As alterações clínicas características da doença foram observadas na maioria dos animais (**Figura 1**). Foram realizadas 17 análises hematológicas, sendo anemia a alteração mais frequente. Todos os animais apresentaram anemia normocítica hipocrômica. Somente três animais não apresentaram

alterações no número de plaquetas, os demais (82,35%) apresentaram trombocitopenia. Três dos cães apresentaram leucopenia e dois apresentaram leucocitose por neutrofilia, sendo que um desses animais apresentava lesão ulcerativa purulenta em membro pélvico.

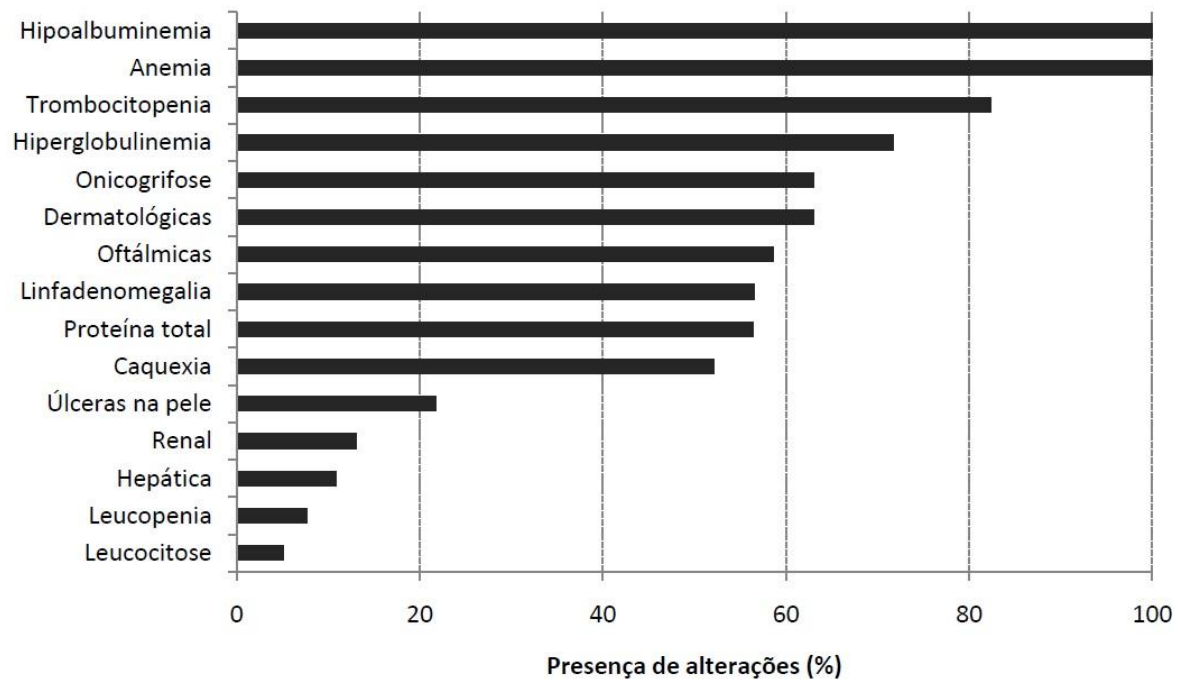


Figura 1- Frequência de alterações clínicas e laboratoriais de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp.

Em relação às alterações bioquímicas, todos os animais (n=39) apresentaram hipoalbuminemia, 71,74% hiperglobulinemia e 56,41% hiperproteinemia. Somente 12,82% dos animais apresentaram aumento de ALT e 17,94% aumento de AST. Apenas 7,69% dos animais apresentaram aumento de creatinina e 23,07% aumento de ureia.

Tabela 1- Resumo da estatística descritiva dos valores hematológicos e perfil bioquímico de cães naturalmente parasitados por *Leishmania* spp.

Exame Laboratorial	Parâmetro	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio padrão
Hemograma	Volume globular (L/L)	17	0,17	0,44	0,25	0,26	0,06
	Hemácias ($10^{12}/L$)	17	1,86	6,22	3,78	3,70	1,13
	Hemoglobina (g/L)	17	36,00	122,00	75,00	73,80	21,80
	VCM (fL)	17	61,00	78,90	68,30	68,32	4,59
	CHCM (%)	17	26,90	31,80	29,00	29,19	1,16
	Leucócitos totais ($10^9/L$)	17	3,40	18,90	11,10	10,63	4,69
	Plaquetas ($10^3/uL$)	17	17	247	52,00	87,65	72,98
Perfil Bioquímico	Albumina (g/L)	39	8,83	22,31	13,08	14,11	3,56
	ALT (UI/L)	39	9,26	266,00	32,40	51,87	59,73
	AST (UI/L)	39	12,22	200,00	38,57	51,02	36,25
	Colesterol (mmol/L)	39	0,97	8,35	4,35	4,52	1,60
	Creatinina (mmol/L)	39	43,31	362,44	79,56	97,24	62,76
	Proteína total (g/L)	39	19,99	98,92	73,49	71,55	19,19
	Ureia (mmol/L)	39	2,51	46,14	5,49	10,25	10,98
	Globulinas (g/L)	39	12,79	85,95	60,67	58,92	17,04
	Bilirrubina Total (mmol/L)	23	0,034	4,78	1,53	2,05	1,53
	Triglicerídeos (mmol/L)	39	0,33	1,56	0,73	0,75	0,27
Urinalíse	Densidade	17	1,013	1,049	1,025	1,030	12,08

N- Número de observações; VCM – Volume corpuscular médio; CHCM – Concentração hemoglobínica corpuscular média; AST-Aspartato Aminotransferase; ALT-Alanino Aminotransferase.

3.2 Análise de componentes principais

A decomposição em valores singulares da matriz de CP log-transformadas e padronizadas deu origem a cinco variáveis sintéticas ortogonais (i.e., não correlacionadas). Cada variável nova (componente

principal - PC) capturou diferentes porcentagens da variância original: PC1 = 53,72%, PC2 = 19,27%, PC3 = 18,85%, PC4 = 6,43%, e PC5 = 1,73%. Além de capturar a maior parte da variância inicial, a variável PC1 apresentou contribuição mais equilibrada de cada uma das variáveis originais: pele = 25,34%, sangue = 8,81%, papa de leucócitos = 11,36%, conjuntiva direita = 26,60% e conjuntiva esquerda = 27,89%. Logo, PC1 foi escolhida como variável composta para representar a carga parasitária total.

3.3 Associação entre alterações clínicas e parasitismo

O teste U de associação entre carga parasitária e cada uma das alterações clínicas foi realizado condicional ao tamanho amostral mínimo de 5 animais em cada grupo (alteração presente ou ausente). Desta forma, as variáveis anemia, trombocitopenia, leucocitose e leucopenia não foram avaliadas estatisticamente.

O sangue foi o único tecido onde o parasitismo não apresentou associações com alterações clínicas (**Figura 2**). Em contraste, a pele e as conjuntivas apresentaram o maior número de associações. O sinal clínico que apresentou o maior número de associações foi a linfadenomegalia do linfonodo poplíteo, seguido das alterações dermatológicas. As alterações renais e hepáticas não apresentaram associações com a carga parasitária.

De maneira geral, as associações apontadas condizem com o consenso dos resultados das cargas nos diferentes tecidos, e sugerem a presença de caquexia, onicogrifose, linfadenomegalia poplíteia e alterações dermatológicas como preditoras do alto parasitismo sistêmico (**Figura 3**). A variável mais significativa foi a linfadenomegalia do poplíteo ($p=2,99 \times 10^{-3}$), seguida das alterações dermatológicas ($p=5,45 \times 10^{-3}$).

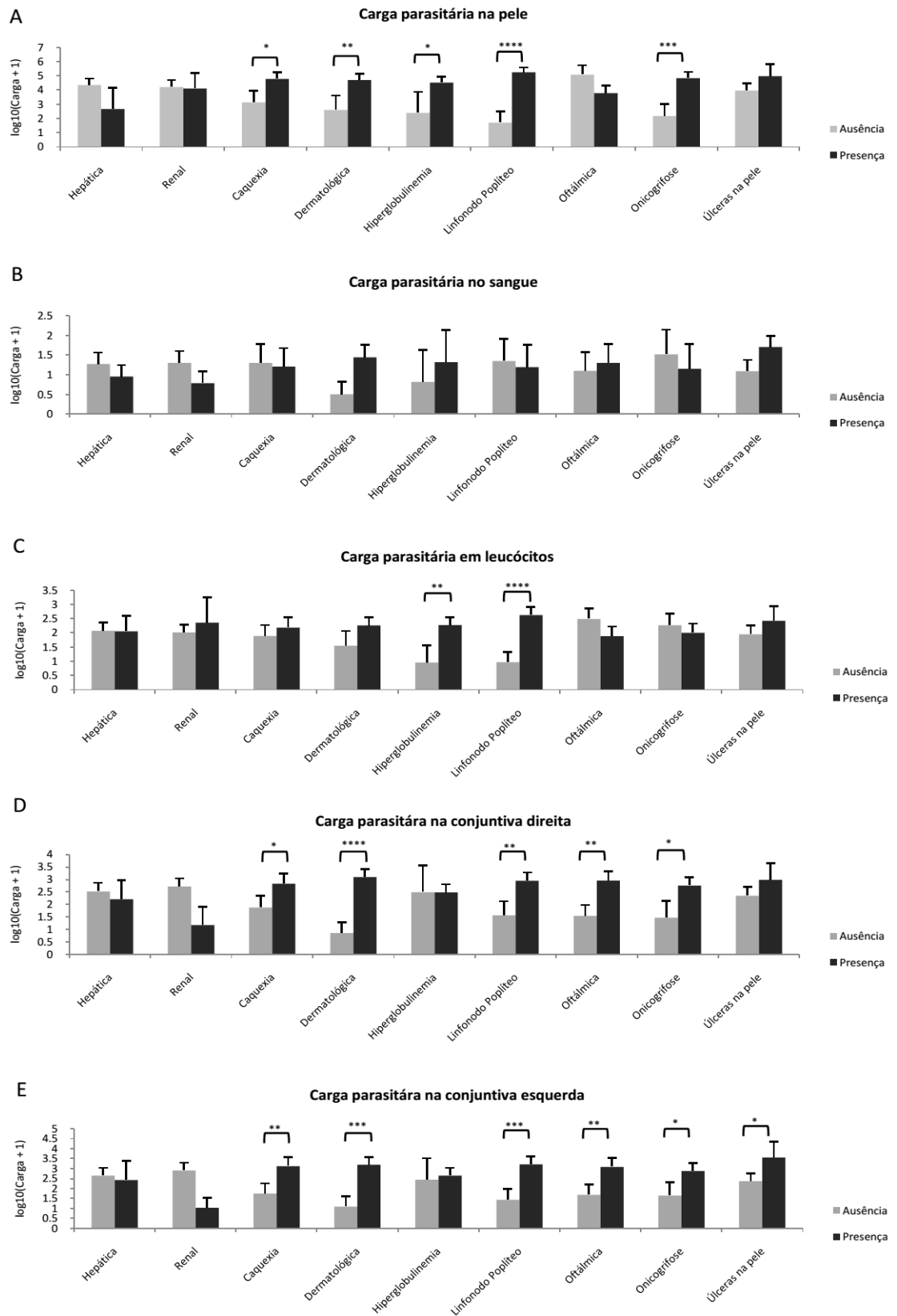


Figura 2- Média da carga parasitária log-transformada na pele (A), sangue (B),

leucócitos (C), conjuntiva direita (D) e conjuntiva esquerda (E) de acordo com a presença ou ausência de caquexia, hiperglobulinemia, linfadenomegalia do linfonodo poplíteo, onicogrifose, úlceras na pele, e alterações hepática, renal, dermatológica e oftálmica. Barras de erro representam o erro padrão da média. Os níveis de significância considerados foram: sugestiva * ($0,05 < p \leq 0,10$), moderada ** ($0,01 < p \leq 0,05$), alta *** ($0,01 < p \leq 0,001$), e muito alta **** ($p < 0,001$).

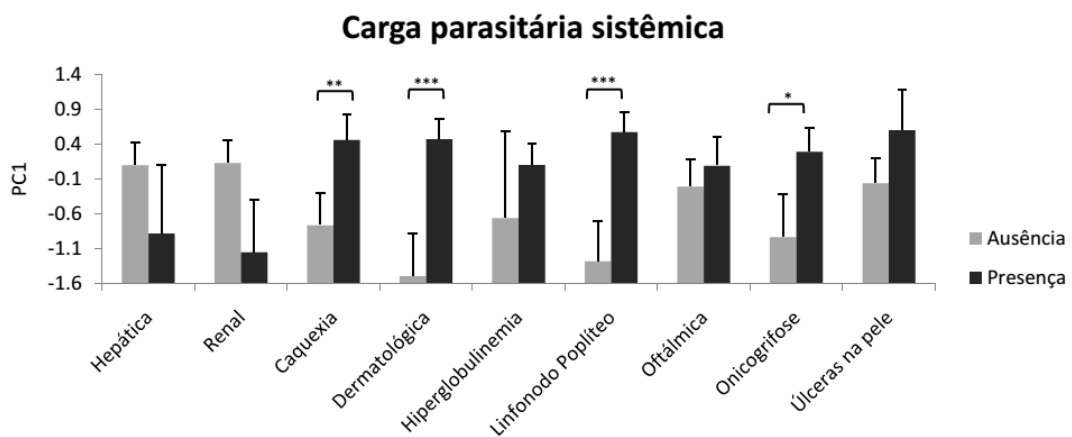


Figura 3- Gráfico de barras da média do primeiro componente principal (PC1) de acordo com a presença ou ausência de caquexia, hiperglobulinemia, linfadenomegalia do linfonodo poplíteo, onicogrifose, úlceras na pele, e alterações hepática, renal, dermatológica e oftálmica. O PC1 deriva da decomposição em valores singulares da matriz de cargas parasitárias log-transformadas e padronizadas, capturando 53,72% da variância total. Portanto, PC1 é uma variável sintética que representa a variação na carga parasitária sistêmica. As contribuições relativas de cada tecido para o PC1 são: pele = 25,34%, sangue = 8,81%, papa de leucócitos = 11,36%, conjuntiva direita = 26,60% e conjuntiva esquerda = 27,89%. Barras de erro representam o erro padrão da média. Os níveis de significância considerados foram: sugestiva * ($0,05 < p \leq 0,10$), moderada ** ($0,01 < p \leq 0,05$), alta *** ($0,01 < p \leq 0,001$), e muito alta **** ($p < 0,001$).

4 Discussão

Por não apresentarem suficiente variabilidade no presente estudo, as variáveis anemia, leucopenia, leucocitose e trombocitopenia não foram avaliadas estatisticamente. No entanto, o grande número de animais

apresentando anemia e trombocitopenia sugerem que estas alterações hematológicas são comuns na doença e independem da CP. Há de se considerar que estas alterações podem também serem devidas a doenças concomitantes. Por outro lado, o pequeno número de animais apresentando alterações leucocitárias sugere que estas possuem baixa incidência ou estão associadas a diferentes fases da infecção. Estudos mais amplos são necessários para melhor avaliar sua associação com a CP.

Os resultados obtidos no presente estudo colaboram com o conceito de que o sangue e a papa de leucócitos são de menor valor diagnóstico (REALE et al., 1999), mas possui a vantagem de ser menos invasivo que a medula óssea e biópsias. Ceccarelli et al. (2014) observaram que os valores de globulina e hemoglobina estão fortemente associadas a conjuntiva, enquanto que neste trabalho a hiperglobulinemia somente foi associada com CP de papa de leucócito.

A maioria dos estudos encontrados demonstram a positiva relação entre os sinais clínicos e a CP em diversos tecidos, sendo que Solcá et al. (2014) demonstraram correlação positiva entre a CP no baço e sinais clínicos em cães. Além do baço, essa associação já foi descrita em pele e linfonodo (MANNA et al., 2009; REIS et al., 2006; SANCHEZ et al., 2004), corroborando com este estudo. Reis et al. (2006) observaram que cães sintomáticos apresentam maior CP em relação aos oligossintomáticos e assintomáticos. Barrouin-Melo (2006) associou a presença de parasita no baço com os achados clínicos de cães, onde obteve positividade de 77% em lesão de pele, 72% na linfadenopatia, 19% nas alterações oculares e 4% na caquexia, sendo que estes sinais clínicos também foram os que mais se associaram com as cargas parasitárias deste estudo.

Cardoso e Cabral (1998) relatam que alterações dermatológicas são frequentes em animais com LVC e podem ocorrer na ausência de outros sinais clínicos. Solano-Gallego et al. (2001) observaram um grande número de animais assintomáticos, e afirma que a pele é um tecido com altas taxas de parasitas. Controversamente, animais assintomáticos em áreas endêmicas

podem ser identificados a partir da presença de parasitas na pele (MARZOCHI et al., 1985), sendo que no presente estudo a pele não foi o tecido mais sensível para a presença de parasita, mas foi um sinal clínico com forte associação com a CP.

Manna et al. (2009) observaram que 90% dos cães apresentaram linfadenomegalia, seguido de alterações dermatológicas, lesões oculares e perda de peso, corroborando com os achados do presente estudo. Mary et al., (2004) também relata correlação entre carga parasitária e ocorrência de sinais clínicos, mesmo em tecidos distintos a presença de sinais clínicos e de parasitas estão altamente relacionadas. Ainda que há discordância sobre a amostra a ser analisada, a maioria dos trabalhos utilizam tecidos linfóides, não obstante algumas vezes o fígado apresenta maior CP que o baço em cães assintomáticos e sintomáticos (SANCHEZ et al., 2004). Estes achados sugerem que a presença de sinais clínicos podem estar associadas a diversos tecidos e devem ser melhores estudadas.

No presente estudo, nem todas alterações clínicas apresentaram associação positiva com as CP, porém algumas alterações clínicas comuns e de fácil observação como a linfadenomegalia do poplíteo, as alterações dermatológicas e a ocorrência de onicogribose mostraram-se uma maior associação com a alta CP. Estes achados sugerem que a manifestação de sinais clínicos da doença representa a extensão da infecção.

O aspirado de baço e medula óssea, apesar de invasivos, são constantemente utilizados e possuem alta sensibilidade (SOLCA et al., 2014; MAIA, 2008). A difusão da *Leishmania* spp no organismo é ampla e já foi observada em diferentes tecidos oculares de cães infectados (PENA et al., 2008). A utilização de *swab* na conjuntiva para diagnóstico molecular em LVC foi introduzida e reduz a necessidade de procedimentos invasivos (STRAUSS-AYALI et al., 2004), no presente estudo as conjuntivas apresentam sensibilidade semelhante a nódulos linfáticos (LOMBARDO et al., 2012) e medula óssea (De ALMEIDA et al., 2012). Mais recentemente, Ceccarelli et al.

(2014) também observaram que a conjuntiva ocular é útil para o primeiro diagnóstico da doença.

5 Conclusão

O aumento da carga parasitária estabelece forte associação com alguns sinais clínicos em cães com leishmaniose visceral, sendo que a linfadenomegalia do poplíteo e as alterações dermatológicas são fortes indicadores de alto parasitismo. A presença de uma ou mais manifestações clínicas da doença potencialmente podem ser utilizados como preditoras da extensão da infecção sistêmica na LVC.

6 Agradecimentos

CAPES pela bolsa auxílio de mestrado, a Laine Margareth Gabas pelo auxílio, aos integrantes do laboratório clínico, ao Centro de Controle de Zoonose (CCZ), aos veterinários participantes e aos membros da Universidade de Warwick.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. M.; QUEIROZ, L. H.; NUNES, G. R.; PERRI, S. H. V.; NUNES, C. M. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 5, p. 594–595, 2007.

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

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

CARDOSO, L.; CABRAL, M. Leishmania e Leishmaniose canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.93, n.527, p.119-170, 1998.

CECCARELLI, M.; GALLUZI, L.; SISTI, D.; BIANCHI, B.; MAGNANI, M. Application of qPCR in conjunctival swab samples for the evaluation of canine leishmaniasis in borderline cases or disease relapse and correlation with clinical parameters. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 460, 2014.

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

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D.; REIS, L.E.; BRAGA, S.L; MORAIS, M.H.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p.e 1291, 2011.

DE ALMEIDA FERREIRA, S.F.; LEITE, R.S.; ITAUSSU, L.T.; ALMEIDA, G.G.; SOUZA, D.M.; FUJIWARA, R.T.; DE ANDRADE, A.S.; 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 Diseases**, v. 6, n. 4, p.e 1596, 2012.

FERREIRA, EDE, C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; DA SILVA, E.S.; SCHALLING, H.; CONTIJO, C.M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 3-4, p. 235-241. 2007.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-times PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p.214-221, 2006.

GOMES, Y. M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, p. 45-52. 2006.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1169–1680, 2005.

JAIN, N.C. Hematologic techniques. In: JAIN, N. C (Ed). **Schalm's veterinary hematology**, 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, cap.2, 1986.

KANECO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. California: Academic Press. 1997.

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

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

LOMBARDO, G.; PENNISI, M.G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRI, 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. 10–7, 2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274–87, 2008.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A.E. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 76–78, 2009.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA, M.S.; RAMOS Jr, A.N.; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACH, J. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e93770, 2014.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5249-5255, 2004.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; TOLEDO, L. M.; GRIMALD JÚNIOR.; MOMEN, H.; PACHECO, R. S.; SABROZA, P. C.; DE SOUZA, M. A.; RANGEL JÚNIOR, F. B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de

Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutically and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n.3, p. 349-357. 1985.

MIRO, 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.

MOLINA, R. Dogs infectivity and control. IZSS/MZCC/WHO. Workshop on New Trends in **Leishmaniasis Epidemiology and Control in the Mediterranean area**, Palermo- Italy. Set, 1997.

OSBORNE, C. A.; STEVENS, J. B.; LULICH, J. P.; ULRICH, J. P.; BIRD, K. A.; KOEHLER, L. A.; SWANSON, L. L. A Clinic's analysis of urinalysis. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Williams & Wilkins. 1995, Cap. 7, p. 136-210.

PEÑA, M. T.; KLAUSS, N.G; FONDEVILA,D.; LEIVA,M.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.; DUBIELZIG, R.R.. Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. **Journal of Comparative Pathology**, v. 138, n. 1, p. 32–39, 2008.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO,A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA,R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine

visceral leishmaniasis. **Research in veterinary science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006.

SANCHEZ, M. A.; DIAZ, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F.J. Organ-Specific immunity In canine visceral leishmaniasis: Analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania Chagasi*. **The American Journal of tropical medicine and hygiene**. v. 70, n. 6, p. 618–624, 2004.

SÃO PAULO. Secretaria De Estado Da Saúde Do Estado De São Paulo. Centro De Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Leishmaniose visceral americana humana: Distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e GVE de infecção. Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_lpi.htm> Acesso em: 02 jan 2015.

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

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

SOLCÀ, M. D. S.; GUEDES, C.E.; NASCIMENTO, E.G.; OLIVEIRA, G.G.; DOS SANTOS, W.L.; FRAGA, D.B.; VERAS, P.S. 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. 133–40, 2012.

SOLCÀ, M. D. S.; BASTOS, L.A.; GUEDES, C.E.S.; BORDONI, M.; BORJA, L.S.; LARANGEIRA, D.F.; DA SILVA ESTRELA TUY, P.G.; AMORIM, L.D.; NASCIMENTO, E.G.; DE SÁ OLIVEIRA, G.G.; DOS SANTOS, W.L.; FRAGA, D.B.; VERAS, P.S. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e103635, 2014.

STRAUSS-AYALI, D.; JEFFE, C.L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples , for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 189, p. 1729–1733, 2004.

TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J.B.; MACHADO, J.G.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 118–123, 2009.

VERMA, S.; KUMAR, R.; KATARA, G. K.; SINGH, L. C.; NEGI, N. S.; et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p.e 10107, 2010.