

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO E DA
IMUNOMARCAÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTAS DE
Leishmania infantum NA SUPERFÍCIE DO OLHO DE
CÃES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELA VIA
OCULAR TÓPICA**

Andréa Gomes Ribeiro Melo

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO E DA
IMUNOMARCAÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTAS DE
Leishmania infantum NA SUPERFÍCIE DO OLHO DE
CÃES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELA VIA
OCULAR TÓPICA**

Andréa Gomes Ribeiro Melo

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária (Oftalmologia).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2011

Melo, Andréa Gomes Ribeiro

M528a Avaliação do processo inflamatório e da imunomarcção de formas amastigotas de *Leishmania infantum* na superfície do olho de cães infectados experimentalmente pela via ocular tópica/ Andréa Gomes Ribeiro Melo – – Jaboticabal, 2011

iv, 52 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Márcia Rita Fernandes Machado

Banca examinadora: Leucio Câmara Alves, Maria Cecília Rui Luvizzoto, Áureo Evangelista Santana

Bibliografia

1. Leishmaniose. 2. Cão. 3. Imuno-histoquímica.4. Olho. 5. Patologia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619.616:993.161:636.7

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉA GOMES RIBEIRO MELO – nascida em 27 de setembro de 1970, em Fortaleza, Ceará. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Ceará – UECE, em agosto de 1996, e em Direito pela Universidade de Fortaleza – UNIFOR, em dezembro de 1999. Especializou-se em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais pela Escola Superior de Agricultura de Mossoró – ESAM, em agosto de 2004. Em março de 2006, ingressou como professora substituta da Universidade Estadual do Ceará – UECE, sendo responsável pelas disciplinas de Clínica Médica de Pequenos Animais e de Cinotecnia. Em junho de 2007 obteve o grau de Mestre em Cirurgia Veterinária – Área de Oftalmologia, pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus. Em agosto de 2007 ingressou no programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, em nível de doutorado, sob a orientação da Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado.

Dedico

À minha família, pela compreensão e ajuda nesses " tempos de ausência ".

Ao meu marido Afrânio Melo Júnior, pelo amor incondicional.

Agradecimentos

À Deus, por se mostrar sempre tão presente.

Aos animais que participaram desse experimento.

À Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado, pela sua acolhida e amizade despretenciosas. Obrigada por estar ao meu lado nessa conquista.

Ao Prof. Dr. Leucio Câmara Alves, sem o qual essa conquista não teria igual valor. Por sua insuperável dedicação. Por sua imensa solidariedade. Por seu inesgotável conhecimento. Obrigada, "para sempre"!

À Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto e sua equipe da UNESP – Unidade de Araçatuba, por sua gentileza e presteza na realização da parte experimental.

Aos professores e colegas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela dedicação e ajuda em tantos dias de trabalho.

Aos professores e colegas da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Jaboticabal, pelos conhecimentos adquiridos e apoio durante esses anos "longe da família".

A todos os veterinários e funcionários que me auxiliaram na realização dessa pesquisa, especialmente à Dra-Érika Kelly Santiago, pelo apoio no cuidado aos animais do experimento.

Especialmente, à minha mãe, por seu amor e zelo. Ao meu marido, Afrânio Melo, pelo incentivo e amor infinito. Aos meus , agora, "dois" filhos. Prometo-lhes que todo o meu tempo será de vocês!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Leishmaniose Visceral.....	3
2.2 Ciclo Evolutivo.....	4
2.3 Leishmaniose Visceral Canina.....	5
2.4 Sinais oculares associados à LVC.....	7
2.5 Imunopatologia da Doença Ocular na LVC.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Aspectos Éticos.....	15
3.2 Seleção dos Animais.....	15
3.2.1 Avaliação Clínica e Exames Laboratoriais.....	15
3.3 Manejo Sanitário e Constituição dos Grupos experimentais.....	18
3.4 Infecção Experimental	19
3.4.1 Inoculação da cepa (MHOM/BR/00/MER02) de <i>Leishmania infantum</i>	19
3.4.2. Monitoramento dos Grupos Inoculado (GI) e Controle (GC).....	19
3.5 Avaliação Histopatológica.....	20
3.6 Imunomarcção das formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	20

3.7 Análise dos Resultados.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 Avaliação do processo inflamatório da superfície ocular.....	22
4.2. Imunomarcção das formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	25
5.DISSUSSÃO.....	28
6.CONCLUSÕES.....	36
7.REFERÊNCIAS.....	37

**AValiação DO PROCESSO INFLAMATÓRIO E DA IMUNOMARCAÇÃO
DE FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum* NA SUPERFÍCIE DO
OLHO DE CÃES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELA VIA OCULAR
TÓPICA**

RESUMO - A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose causada pelo agente *Leishmania infantum*. O cão se destaca por seu importante papel na cadeia epidemiológica da doença, porquanto é o principal reservatório urbano da infecção, cuja transmissão é dependente de populações de *Lutzomyia longipalpis*. A enfermidade é multissistêmica e de patogenia complexa, envolvendo diferentes mecanismos imunológicos. Apesar do grande número de estudos sobre a patogenia e lesões que ocorrem na leishmaniose visceral canina, a fisiopatologia da lesão ocular ainda permanece obscura. O objetivo deste estudo foi detectar a presença de células inflamatórias e de formas amastigotas de *L. infantum* pela imuno-histoquímica em olhos de cães experimentalmente infectados via ocular tópica. Constituiu-se um grupo inoculado (GI) composto por sete cães, que receberam a instilação de cultura de *Leishmania infantum* por via conjuntival, e um grupo controle (GC) composto por três cães, nos quais a instilação tópica foi realizada com solução salina. Após 60 dias, os tecidos oculares foram analisados utilizando-se as técnicas de coloração em Hematoxilina e Eosina (HE) e a reação de imuno-histoquímica pela streptoavidina-peroxidase. A análise histopatológica revelou uma resposta inflamatória com predomínio de plasmócitos e linfócitos, perivasculite, congestão vascular e hiperplasia das células caliciformes em conjuntiva. As glândulas lacrimais da terceira pálpebra apresentaram infiltrado inflamatório com atrofia focal e desorganização do estroma. Formas amastigotas de *L. infantum* foram observadas através da detecção imuno-histoquímica em 100% das amostras do grupo infectado.

Palavras-Chave: leishmaniose, cão, imuno-histoquímica, olho, patologia

**AVALIATION OF THE INFLAMMATORY PROCESS AND
IMMUNOISTOCHEMICAL DETECTION OF *Leishmania infantum* AMASTIGOTE
FORMS IN OCULAR SURFACE OF DOGS EXPERIMENTALLY INFECTED
WITH BY TOPICAL OCULAR ROUTE**

SUMMARY – Canine visceral leishmaniasis (CVL) is an infection caused by *Leishmania infantum* agent. The dog stands out for its important role in the epidemiology of the disease, since it is the main urban reservoir of infection, whose transmission is dependent on populations of *Lutzomyia longipalpis*. The disease is multisystemic and complex pathogenesis, involving different immunological mechanisms. Despite the large number of studies regarding the pathogenesis and lesions that occur in canine leishmaniasis, the pathophysiology of a ocular lesion still remains obscure. The goal of this study was to evaluate the inflammatory cells and immunohistochemical detection of *L. infantum* in eyes from dogs experimentally infected by topical ocular infection. Constituted an inoculated group (IG), composed of seven dogs that received instillation of culture of *Leishmania infantum* by conjunctival route, and a control group (CG) composed of three dogs, in which the topical instillation was performed with saline. After 60 days, the ocular tissues were analyzed using the techniques of staining in hematoxylin and eosin (HE) and immunohistochemical reaction for streptavidin-peroxidase. Histopathological analysis revealed an inflammatory response characterized by the presence of plasma cells, lymphocytes, congestion, perivasculitis and hyperplasia of the goblet cells in conjunctiva. In the lachrymal gland of the third eyelid were observed inflammatory response with focal atrophy and stromal disorganization. Amastigotes forms of *L. infantum* were observed by immunohistochemical detection in 100% of samples from infected group.

Keywords: leishmaniasis, dog, immunohistochemical, eye, pathology

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença parasitária causada pelo agente *Leishmania infantum* (MAURICIO et al., 2000) e a sua transmissão ocorre através da picada de insetos hematófagos do gênero *Lutzomyia* (TAFURI et al., 2004).

A doença canina é clinicamente semelhante à humana, contudo no cão, a infecção não se restringe apenas às vísceras, e, frequentemente, dermatopatias são visibilizadas em animais com LVC (KRAUSPENHAR et al., 2007).

A patogenia da LVC, portanto, se caracteriza pela ampla distribuição do parasita em diferentes tecidos do hospedeiro, resultando em uma considerável diversidade de sinais clínicos (NARANJO et al., 2010). A enfermidade usualmente se apresenta como um quadro clínico sistêmico de evolução crônica, podendo se manifestar de três meses a alguns anos após a infecção, cuja gravidade depende da imunocompetência do hospedeiro vertebrado (FEITOSA et al., 2000).

A despeito dos diversos estudos sobre as lesões e a patogenia da LVC, as oftalmopatias, particularmente a blefarite, a conjuntivite, a ceratoconjuntivite e a uveíte têm sido descritas como os sinais oculares mais frequentes nos casos de infecção natural por *Leishmania infantum* nos cães (McCONNELL et al., 1970; GARCIA-ALONSO et al., 1996a; BRITO, 2004).

Na tentativa de identificar precocemente a LVC, diferentes métodos têm sido utilizados no diagnóstico da infecção, no entanto, o diagnóstico definitivo baseia-se na detecção de formas amastigotas de *Leishmania infantum* (TAFURI et al., 2004).

A apresentação histopatológica clássica consiste na presença de uma reação inflamatória crônica associada a uma hiperplasia e a uma hipertrofia de macrófagos, que podem conter um grande número de formas amastigotas de *Leishmania* sp em seu interior, notadamente em órgãos como o fígado, o baço, os linfonodos e a medula óssea (TAFURI et al., 2004). Achados semelhantes foram documentados em olhos de cães infectados naturalmente por BRITO (2006), no entanto, a técnica histopatológica apresenta pouca eficácia para a detecção de formas amastigotas de *L. infantum* em tecidos oculares (TAFURI et al., 2004).

Em um estudo realizado preliminarmente por RIBEIRO (2007), após a infecção experimental por via ocular, visibilizou-se características histopatológicas semelhantes às da infecção natural, no entanto, não houve a detecção de formas amastigotas de *L. infantum* nos tecidos oculares.

Uma vez que a reação da imuno-histoquímica tem demonstrado ser uma alternativa eficiente e pouco dispendiosa, implicando em um método potencial para estudos epidemiológicos e clínicos, especialmente em órgãos que não demonstram uma alta carga parasitária (BOURDOISEAU et al., 1997; HOFMAN et al., 2003; TAFURI et al., 2004), utilizou-se esta reação para a continuidade do estudo anterior, objetivando demonstrar a infecção por *L. infantum* em tecidos oculares inoculados experimentalmente.

Considerando a importância das repercussões oftálmicas causadas pela LVC na clínica de pequenos animais, e à escassez de relatos em relação à patogenia que envolve as manifestações oculares da doença, objetivou-se descrever a participação das células inflamatórias e a detecção de formas amastigotas de *Leishmania infantum* em tecidos oculares de cães submetidos à infecção experimental por via tópica ocular.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença parasitária causada por protozoários digenéticos pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, que acomete o homem e diferentes espécies de mamíferos silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais dos chamados Velho e Novo Mundo (CARVALHO, 2005). Suas formas clínicas estão relacionadas à espécie do parasita, e diferem em distribuição geográfica, hospedeiros e vetores envolvidos, taxas de incidência e de mortalidade (CABRERA, 1999). Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (BRASIL, 2006).

Nas Américas, a doença é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, cuja caracterização molecular atual demonstrou ser indistinguível de *L. chagasi*, e a sua transmissão ocorre pela picada de um inseto flebotomíneo, sendo a *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie encontrada (MAURICIO et al., 2000).

Inicialmente a enfermidade apresentava um perfil rural com transmissão peridomiciliar, adquirindo gradualmente características periurbanas (SILVA et al., 2008). O êxodo rural e a conseqüente formação e extensão da pobreza na área urbana, associados à degradação ambiental, tem promovido uma maior proximidade entre os seres humanos, o vetor e os reservatórios, resultando na criação de novos ciclos de transmissão (CARVALHO, 2005).

No Brasil, a LV apresenta uma ampla distribuição geográfica, demonstrando um caráter endêmico – epidêmico, mantendo uma média anual entre 3 a 4 mil casos novos (CABRERA, 1999). Ocorre em várias áreas urbanizadas, tendo sido notificada em 19

estados, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone, atingindo quatro das cinco regiões (CARVALHO, 2005; BRASIL, 2006; TORRES & FILHO, 2006; SILVA et al., 2008).

2.2 CICLO EVOLUTIVO

O ciclo de transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo de insetos hematófagos do gênero *Lutzomyia* (TAFURI et al., 2004) sobre o hospedeiro infectado, através da ingestão das formas amastigotas, que nas primeiras vinte e quatro horas se transformam em promastigotas, reproduzindo-se rapidamente através de divisão binária, permanecendo protegidas pela matriz peritrófica durante três dias no intestino médio do inseto (BOURDOISEAU et al., 1997). Com a degeneração da matriz peritrófica, migram para o segmento anterior do tubo digestivo, sofrem mais divisões e diferenciação, tornando-se infectantes, e, em seguida, seguem para a região do esôfago, faringe e válvula estomodeal, onde a intensa multiplicação provoca uma obstrução mecânica, dificultando a ingestão de sangue pelo inseto, que por ocasião de um novo repasto sanguíneo, infecta o novo hospedeiro, através do relaxamento dos músculos responsáveis pela sucção, o que provoca o refluxo dos parasitas (MARZOCHI et al., 1981). Ao serem inoculadas, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, onde assumem a forma amastigota, multiplicam-se por divisão binária até provocarem a ruptura da célula infectada, caindo no espaço intercelular, sendo endocitadas por novos macrófagos e células do Sistema Fagocítico Mononuclear (S.F.M.), perpetuando a infecção (CABRERA, 1999; MISSAWA & LIMA, 2006).

2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença multissistêmica, exibindo um amplo espectro de sinais clínicos que, na dependência da resposta imune apresentada pelo hospedeiro (SANTOS-GOMES et al., 2002), pode se manifestar sob a forma aguda ou crônica, evoluindo, na maioria dos casos, para o óbito (ALMEIDA et al., 2005; RIBEIRO, 2007). Não há predisposição racial, sexual ou etária relacionada com a infecção (BRASIL, 2006).

A prevalência da infecção canina tem sido registrada em diversas regiões do mundo, sendo que na Espanha, na França, na Itália e em Portugal estima-se que 2,5 milhões de cães estão infectados (CAMARGO et al., 2007). O número de cães infectados na América do Sul é também estimado em milhões, com altas taxas de infecção relatadas em algumas áreas do território brasileiro (CAMARGO et al., 2007).

No Brasil, o percentual de cães infectados que vivem em uma área endêmica é de 20 a 40% (FEITOSA et al., 2000), e a emigração dos reservatórios caninos infectados para áreas não endêmicas pode estar relacionada à expansão da doença (PARANHOS-SILVA et al., 1998). A forma assintomática da doença é encontrada com índices variados, geralmente representando 40 a 60% de uma população soropositiva (BRASIL, 2006).

Até recentemente, a transmissão da *L. infantum* entre cães, apenas ocorria através da picada de insetos flebotomíneos, contudo, a transmissão por outros artrópodes (LINARDI & NAGEM, 1973; COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2006) e por via venérea (SILVA et al, 2008), têm sido postuladas. Adjunto, a infecção por transfusão sanguínea (OWENS et al., 2001) e por via transplacentária (ROSYPAL et al 2005) já foram demonstradas.

Cães infectados com *L. infantum* podem permanecer assintomáticos, resistir à doença clínica por longos períodos, desenvolver alguns sinais clínicos que podem

resolver-se espontaneamente ou apresentar os sinais clássicos da doença (ALMEIDA et al., 2005; MISSAWA & LIMA, 2006; GOMES et al., 2008). De acordo com a sua condição clínica, os animais podem ser divididos em assintomáticos e sintomáticos (PIMENTEL, 2009).

Há uma forma de evolução latente, que dura cerca de dois anos, acompanhada ou não de sinais clínicos, que pode evoluir para a cura espontânea, e outra forma aguda e grave, que pode levar o animal a óbito em poucas semanas (FEITOSA et al., 2000).

Enquanto a LVC é bem caracterizada por significativa diminuição de células T e produção excessiva de anticorpos, uma forte resposta imune celular é observada em cães assintomáticos (PINELLI et al., 1994; BOURDOISEAU et al., 1997; MORENO et al., 1999), indicando que a resposta de células T representa um mecanismo importante de defesa imunológica contra o parasita (ALMEIDA et al., 2005). As células do sistema mononuclear fagocitário infectadas atuam como células apresentadoras de antígenos, estimulando as células T CD4 auxiliares do tipo 1 ou T auxiliares do tipo 2 (BARBIÉRI, 2006).

A susceptibilidade à doença, portanto, está diretamente relacionada à resposta imunológica envolvendo a atividade dos linfócitos T e macrófagos, e ao perfil de produção de quimiocinas por linfócitos T *herper* (Th) CD4+. Tal perfil caracteriza a resposta do tipo Th1 ou Th2 (BARBIÉRI, 2006).

Se a via Th1 for estimulada, há produção de citocinas, como a interleucina-2, interferon e fator de necrose tumoral, que ativam os macrófagos, induzindo à imunidade celular e conferindo resistência à infecção (BARBIÉRI, 2006). Em contraste, uma vez estimulada a via Th2, ocorre a produção de interleucinas 4, 5 e 10, a proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos, com a inibição da resposta celular protetora, tornando o hospedeiro susceptível à progressão da doença (BARBIÉRI, 2006).

Em cães infectados, a enfermidade apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final (BRASIL, 2006).

As manifestações clínicas gerais incluem apatia, febre irregular (FEITOSA et al., 2000), anorexia, emaciação, decréscimo da atividade física (SILVA et al., 2001), intolerância ao exercício, depressão (KOUTINAS et al., 1999), perda de peso progressiva, caquexia, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia localizada (KOUTINAS et al., 1999) ou generalizada (SLAPPENDEL & GREENE, 1990; STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001), anemia, trombose (FEITOSA et al., 2000; TAFURI et al., 2004), coagulopatias (TRAVI et al., 2001), alterações renais e articulares (ALBUQUERQUE, 2006), rinite, secreção nasal, tosse e claudicação (DE COPEGUI, 2000; STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001).

As lesões cutâneas caracterizam-se por alopecia simétrica bilateral (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999), hiperqueratose nasal, digital e nos coxins plantares (KOUTINAS et al., 1999), seborréia seca difusa não pruriginosa, erosão nasal, facial e em extremidades (DE COPEGUI, 2000), onicogribose (STRAUSS-AYALI & BANETH, 2001), descamação furfurácea da pele, e presença de nódulos que, eventualmente, podem ulcerar-se, particularmente no focinho, orelhas e extremidades (MOLLEDA et al., 1993).

2.4 SINAIS OCULARES ASSOCIADOS À LVC

As manifestações oculares e perioculares têm sido descritas em mais de 50% de cães naturalmente infectados (BRITO et al., 2007) e, embora possam ocorrer concomitantemente com outros sinais sistêmicos, podem constituir a primeira ou única alteração aparente da LVC (ROZE, 1986; PEÑA et al., 2000; FULGÊNCIO et al., 2004; FULGÊNCIO, 2006; FULGÊNCIO et al., 2006).

O mecanismo que explica a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos tecidos oculares é desconhecido (GARCIA-ALONSO et al., 1996a), embora alguns autores acreditem que os parasitas são carregados por células apresentadoras de

antígenos, como as células de Langerhans, especialmente no tecido conjuntival, onde têm um papel importante na imunidade da superfície ocular (BRITO et al., 2007).

KOUTINAS et al. (1999) referem que o parasitismo direto pode ser determinante na etiopatogenia das lesões oculares, no entanto, mecanismos imunomediados estão, habitualmente, associados.

Lesões oculares foram descritas acometendo principalmente o segmento anterior e podem aparecer antes, durante ou após a terapia anti-*Leishmania* sp (MOLLEDA et al., 1993; PEÑA et al., 2000; BRITO et al., 2004; BRITO, 2006).

As blefarites podem se apresentar na forma erosiva, nodular ou granulomatosa (FERRER et al., 1988) e, ordinariamente, estão associadas a dermatites faciais (MOLLEDA et al., 1993; KOUTINAS et al., 1999) ou à celulite orbital (PEÑA et al., 2000). Em casos raros, múltiplos granulomas contendo uma grande densidade de parasitas podem ser observados nas margens palpebrais (ROZE, 2002).

A conjuntivite geralmente decorre da extensão direta das lesões cutâneas, podendo, no entanto, advir da via hematogena e preceder à uveíte, sendo clinicamente representada por hiperemia, quemose e exsudato purulento (SLAPPENDEL, 1988; EL HASAN et al., 1998; ROZE, 2002; BRITO, 2004).

Envolvimento da córnea raramente é visto de forma independente, sendo frequente a inflamação simultânea da conjuntiva (ceratoconjuntivite) ou da úvea anterior (ceratouveíte). A ceratite pode ser superficial, com erosões epiteliais, úlceras, neovascularização e pigmentação, intersticial, que é caracterizada por opacidades focais com edema ou infiltrado de células inflamatórias, ou profunda, demonstrando o crescimento dos vasos (LEIVA et al., 2002; ROZE, 2002; TAFURI et al., 2004).

GARCIA-ALONSO et al. (1996a) consideram factível a diminuição da produção lacrimal decorrente da inflamação crônica da membrana nictitante e da glândula lacrimal pela ação do parasito sobre o aparelho lacrimal, ou por adenite imunomediada (KOUTINAS et al., 1999).

As alterações endoteliais são secundárias à uveíte, comum em segmento anterior, associadas a títulos muito baixos de anticorpos ou à resposta muito pobre à terapia anti- *Leishmania* sp (ROZE, 2002). Pode haver hipópio, hifema (MOLLEDA et al., 1993) e nódulos na íris, com ou sem sinéquias (EL HASSAN et al., 1998).

Hialites, coriorretinites, papilites, hemorragias e descolamentos de retina são observados em segmento posterior, frequentemente secundárias ao envolvimento de outros órgãos (FERRER et al., 1988; SLAPPENDEL, 1988; FERRER, 1999; DE COPEGUI, 2000; FEITOSA et al., 2000; LEIVA et al., 2002; ROZE, 2002). Mais raramente, foram descritas distrofias corneais, exoftalmia e estrabismo (ROZE, 2002).

O glaucoma representa uma complicação ocular grave na LVC (FERRER, 1999), cujo tratamento atualmente é ineficaz, conduzindo a cerca de 10% dos casos de cegueira (ROZE, 2002). As demais complicações observadas são ceratoconjuntivite seca, pigmentação corneal, atrofia da íris, catarata, panoftalmia e *phtisis bulbi* (ROZE, 2002).

As características clínicas da LVC experimental dependem da via de inoculação, do tamanho do inóculo, e do estágio do parasita utilizado na infecção (MORENO & ALVAR, 2002; ALMEIDA et al., 2005).

RIBEIRO (2007) demonstrou a presença de secreção ocular, hiperemia conjuntival e opacidades corneais após a infecção experimental por via conjuntival.

2.5 IMUNOPATOLOGIA DA DOENÇA OCULAR NA LVC

As defesas imunes do olho possuem características próprias, contudo, acham-se intimamente ligadas ao restante do sistema imune, agindo em conjunto (EICHENBAUM

et al., 1987). Compõe-se, essencialmente, por quatro sítios importantes: o fluido lacrimal e a conjuntiva, a esclera, a úvea e a retina (BIELORY, 1991; RIBEIRO, 2007).

A barreira hemato-ocular torna o interior do bulbo do olho praticamente isolado (PEIFFER JUNIOR, 1980). Análises à imunologia, relativamente a essa barreira, suportam a idéia da participação conjunta das respostas imunes sistêmica e local, na patogenia das lesões oculares que cursam com a LVC (GARCIA-ALONSO et al., 1998; RIBEIRO, 2007).

Outrossim, a resposta imunológica desencadeada por um agente infeccioso é dependente de vários fatores, como a sua antigenicidade, a carga parasitária e a capacidade de defesa imunológica do hospedeiro, sendo, portanto, a apresentação clínica da doença uma consequência destas interações (SANTOS-GOMES et al., 2002; FULGÊNCIO, 2006).

Nas doenças parasitárias, fatores específicos relacionados com o hospedeiro vertebrado e o parasita determinam o desenvolvimento dos mecanismos patogênicos, das lesões e, conseqüentemente, dos sinais clínicos encontrados no animal doente (EZQUERRA, 2001; FULGÊNCIO, 2006).

Diferentes estudos envolvendo as alterações oculares ensejadas pela LVC têm demonstrado que a característica primordial das lesões consiste em uma reação inflamatória composta por infiltrados celulares de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, sem que o parasita esteja necessariamente presente (McCONNELL et al., 1970; LAUGIER & VERRO-BOULANGER, 1992; MOLLEDA et al., 1993; GARCIA-ALONSO et al., 1996a).

PEÑA et al. (2000) observaram que a blefarite granulomatosa resulta da presença de um grande número de macrófagos infectados com *Leishmania* sp, enquanto a blefarite alopecica é decorrente de um pequeno número de formas amastigotas. Adjunto, que a forma ulcerativa mostra uma representação histológica intermediária entre as anteriores.

Neoformação vascular, exsudação focal com pequenas quantidades de plasmócitos no estroma, separação das fibras estromais, edema, hiperplasia do epitélio anterior com espessamento do estroma subjacente e da membrana de Descemet, foram descritas como as principais alterações corneais (McCONNEL et al., 1970; DIAS, 1998; BRITO, 2004). O achado citológico do parasita em úlcera corneal em cão (BRITO et al, 2007), e o achado histológico em gato (LEIVA et al., 2002) sugerem que a lesão pode ocorrer pela ação direta do parasito ou por resposta imune local (BRITO, 2004).

BRITO (2006) demonstrou zonas de infiltrado mononuclear plasmocitário na esclera, associado à perivasculite.

A conjuntiva é a estrutura ocular mais acometida em animais com LVC, de acordo com vários estudos realizados na Europa e no Brasil (ROZE, 1986; SLAPPENDEL, 1988; MOLLEDA et al, 1993; KOUTINAS et al, 1999; BRITO, 2004; FULGÊNCIO et al., 2004; FULGÊNCIO, 2006). O espessamento conjuntival pode preceder à uveíte anterior, e discretos nódulos brancos multifocais podem ser observados, ocasionalmente, na conjuntiva, na margem da membrana nictitante ou no limbo (BRITO, 2004).

A despeito da importância da conjuntiva nas reações imunológicas, a conjuntivite pode estar diretamente relacionada à presença do parasita, porquanto este é ocasionalmente encontrado em estudos histopatológicos e, eventualmente, em raspados conjuntivais. Fazem-se necessários novos estudos com o objetivo de determinar qual a importância da presença do parasita e também dos mecanismos imunomediados na etiopatogenia da conjuntivite, bem como nas formações nodulares na conjuntiva e no limbo de cães com leishmaniose visceral (FULGÊNCIO, 2006).

O estudo da conjuntiva da terceira pálpebra na LVC revelou a presença de infiltrado mononuclear plasmocitário associado à metaplasia epitelial e hiperplasia das células caliciformes com infiltrado mononuclear plasmocitário subepitelial (MOLLEDA et al., 1993; BRITO, 2006).

Em glândula lacrimal da terceira pálpebra descreveu-se intenso processo inflamatório, apresentando áreas de infiltrados celulares focais ou difusos, com a presença de linfócitos, plasmócitos e macrófagos contendo formas amastigotas de *Leishmania* sp. (GARCIA-ALONSO et al., 1998).

A ceratoconjuntivite seca tem sido descrita como a segunda lesão mais comum em animais naturalmente infectados com *Leishmania* sp. (DAVIDSON, 2000) e NIETO et al (1999) demonstraram o desenvolvimento da enfermidade em cães, seis meses após infecção experimental. MOLLEDA et al. (1993) referem que a ceratoconjuntivite seca caracterizada pelo déficit lacrimal, neovascularização e pigmentação corneal, secreção mucóide e hiperemia conjuntival, pode decorrer de intenso processo inflamatório das glândulas lacrimais ou por obstrução dos ductos secretores em face da inflamação conjuntival.

Na túnica nervosa, foram observadas as formas amastigotas de *Leishmania* sp. na retina e congestão vascular, coriorretinite e exsudato inflamatório no nervo óptico (DIAS, 1998; BRITO; 2006).

Anticorpos podem ser encontrados em todas as estruturas oculares, por sua produção local, e, na conjuntiva, posteriormente ao reconhecimento do antígeno pelo sistema linfóide, podem ser encontrados linfócitos B e, por conseguinte, imunoglobulinas das classes IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (EICHENBAUM et al., 1987).

BRITO (2006) informou não se saber a origem dos anticorpos oculares, admitindo a possibilidade de haver produção local ou sistêmica, e que a sua presença poderia motivar a ocorrência de lesões oculares.

O processo inflamatório intra-ocular em cães com LV, portanto, pode ter duas origens possíveis: a uveíte anterior pode estar relacionada com a intensa migração leucocitária provocada pela presença de formas amastigotas, como acontece na pele, ou a inflamação pode ser consequência de hipersensibilidade imunomediada do tipo III, suscitada por antígenos do parasita e com deposição de imunoglobulinas não

específicas, como ocorre na barreira de filtração glomerular (SARTORI et al., 1987 e NIETO et al., 1992).

BRITO (2004) encontrou altos títulos de IgG anti *Leishmania* sp. no humor aquoso de animais naturalmente infectados, independentemente da sua presença no plasma, sugerindo a existência de fatores intra-oculares associados à síntese local de IgG.

Alterações vasculares com dilatação de vasos linfáticos e trombose, intensos focos de inflamação caracterizados por células redondas e por linfócitos, e exsudato acidófilo com presença de amastigotas de *Leishmania* sp, caracterizam os achados na túnica vascular de cães naturalmente infectados (GARCIA-ALONSO et al. 1998; BARBALHO-LIMA et al. 2005; BRITO, 2006).

Na leishmaniose visceral, depósitos de imunocomplexos nas paredes dos vasos, podem suscitar uveítes (PUMAROLA et al., 1991; GARCIA-ALONSO, et al., 1996a), caracterizadas por manifestação aguda, formação de fibrina ou nódulos multifocais no estroma da íris, com excessiva exsudação em câmara anterior (PEÑA et al., 2000).

Animais com uveíte associada à LVC, apresentaram nível de proteína total significativamente aumentada no humor aquoso em relação à cães normais (NOVALIS et al., 1994). O hifema pode estar presente (ROZE, 2002) e decorre de lesão vascular pelo depósito de imunocomplexos no estroma da íris, que é rico em células apresentadoras de antígenos (BIELORY, 2000). O depósito de imunocomplexos em corpo ciliar também foi reportado (FEITOSA et al., 2000). Ademais, a uveíte pode ocorrer após a terapia antiprotozoária, semelhante ao que ocorre em humanos (PEÑA et al., 2000).

Análises dos tecidos uveais têm demonstrado a ocorrência de dois tipos de inflamação no segmento anterior, sejam eles uma iridociclite granulomatosa com numerosas amastigotas ou uma outra forma com a presença de infiltrado

linfoplasmocitário, com esparsa presença do parasito (PEÑA et al., 2000). A patogenia das duas formas ainda requer elucidação (PEÑA et al., 2000).

Segundo GARCIA-ALONSO et al. (1998), desencadeia-se uma enfermidade oftálmica própria, específica da LVC, denominada Leishmaniose Ocular Canina (LOC), com características peculiares e próprias à resposta imune a antígenos do parasita (RIBEIRO, 2007). Condições patológicas suscitadas pela *Leishmania* sp derivam de eventos inflamatórios e degenerativos que o parasita induz no hospedeiro, bem como pela gênese e deposição de imunocomplexos (NIETO et al., 1999). A presença de imunocomplexos em diferentes componentes do olho, notadamente no limbo esclerocorneal, no corpo ciliar e na íris, induz a efeitos lesivos decorrentes da ação de mediadores inflamatórios que, juntamente com o sistema complemento, promovem a liberação de proteínas e de enzimas lisossomais, induzindo à lise celular e conseqüente lesão ocular (GARCIA-ALONSO, et al. 1996a; RIBEIRO, 2007).

Os achados histopatológicos são, por vezes, inespecíficos, e a reação inflamatória granulomatosa com presença de células mononucleares, é comum a várias outras enfermidades. Portanto, quando há poucas formas amastigotas de *Leishmania* spp. nos tecidos, pode ser difícil estabelecer-se o diagnóstico somente pela histopatologia (MOREIRA et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2009).

A técnica histopatológica tem baixa sensibilidade em tecidos oculares e a imuno-histoquímica tem sido reportada como muito eficiente na detecção de amastigotas do parasita em tecidos caninos (TAFURI, et al., 2004). Detecções de *Leishmania* sp. através da imuno-histoquímica em tecidos caninos (BOURDOISEAU et al., 1997; FERRER et al., 1988) e humanos (LIVNI et al., 1983) tem sido descritas e utilizadas rotineiramente em alguns laboratórios, representando uma importante ferramenta para estudos clínicos, epidemiológicos e histopatológicos (TAFURI, et al., 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os itens 3.1 a 3.5 foram realizados preliminarmente, por ocasião do estudo das manifestações clínicas e histológicas (RIBEIRO, 2007).

Para a continuidade do estudo, realizou-se reação de imuno-histoquímica em parte do material colhido e emblocado por ocasião da pesquisa de RIBEIRO (2007).

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal, sob o Protocolo nº 007104-06.

3.2 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Para este estudo foram selecionados 10 animais.

3.2.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA E EXAMES LABORATORIAIS

Foram avaliados clinicamente 60 cães provenientes do Centro de Zoonoses da cidade de Fortaleza, Ceará, que se submeteram ao diagnóstico sorológico e parasitológico para Leishmaniose Visceral.

A avaliação clínica incluiu o exame físico geral, a inspeção da pele e dos fâneros e a palpação abdominal e dos linfonodos, para a identificação de sinais sugestivos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC), de acordo com FERRER (1999) e FERRER (2002).

A avaliação oftálmica consistiu na inspeção bilateral dos anexos oculares e da câmara anterior, com o auxílio de iluminação¹ e magnificação², seguido do teste para a avaliação da produção lacrimal³. Após a indução da midríase com tropicamida⁴ para a oftalmoscopia⁵, realizou-se o teste de fluoresceína⁶.

Coletaram-se 10 mililitros (mL) de sangue por venopunção jugular, com seringa⁷ e agulha⁸, que foram imediatamente transferidos a tubos de ensaio estéreis, sem anticoagulante, para a obtenção do soro. Após a retração do coágulo, as amostras sanguíneas foram centrifugadas a 1000 g, durante 10 minutos. O soro resultante foi acondicionado em frascos de polipropileno⁹ e mantido à temperatura de -20 °C, até a realização dos testes. Empregou-se o teste de ELISA, realizado junto ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Ageu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz –Recife - Pe (CPqAm/FIOCRUZ), utilizando o Kit para o diagnóstico da EIE-Leishmaniose Canina Bio-Manguinhos®¹⁰. Os protocolos foram executados de consoante com as instruções do fabricante e a leitura foi feita em espectrofotômetro¹¹ a 490 nanômetros.

Procedeu-se à sedação dos animais utilizando-se a acepromazina¹², na dose de 0,1mg/kg, por via intramuscular, e, em seguida, realizou-se a biópsia de medula óssea, por punção no manúbrio do osso esterno, empregando-se seringa¹³ e agulha¹⁴. Do

¹ Transiluminador Welch Allen

² Lupa para microcirurgia, Heine

³ Teste de Shirmér, Ophthalmos, São Paulo, Brasil

⁴ Midriacyl®, Alcon

⁵ Oftalmoscópio binocular Indireto, Opto

⁶ Fluoresceína, Ophthalmos, São Paulo, Brasil

⁷ Seringas descartáveis 10 ml, Becton Dickson

⁸ Agulhas descartáveis 25x7mm, Becton Dickson

⁹ Eppendorf Reaktiosgerafaße, Marca Geratebau

¹⁰ Bio-Manguinhos®/FIOCRUZ

¹¹ BIO-RAD Model 3550 Microplate reader

¹² Acepran 0,2%®, Laboratório Univet

¹³ Seringas descartáveis - 20 (ml), Becton Dickson

material aspirado, foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro¹⁵, que após secagem, foram submetidos ao método de coloração rápida Panótico¹⁶, e examinados em microscópio de luz¹⁷, com objetiva de imersão, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp..

Raspados de pele íntegra foram realizados na face interna do pavilhão auricular esquerdo, com o auxílio de lâminas de bisturi¹⁸. O produto do raspado foi distendido sobre lâminas de vidro, que após secagem, foram submetidas ao método de coloração rápida Panótico e examinadas em microscopia de luz com objetiva de imersão, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp..

As análises dos exames acima referidos foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estadual do Ceará – UECE.

Selecionaram-se apenas cães com sorologia negativa ao teste de ELISA, exame parasitológico negativo para *Leishmania* sp. e sem sinais clínicos sugestivos da doença. Dos pré-selecionados, os 10 animais escolhidos eram de raças e idades variadas, machos ou fêmeas. Para cada um, anotaram-se todas as informações quanto às variáveis clínicas e laboratoriais, no decurso de toda a pesquisa.

O cálculo da amostra foi realizado por conveniência não probabilística, de acordo com COSTA NETO (1977).

¹⁴ Agulhas descartáveis- 40 x 12 mm, Becton Dickson

¹⁵ Lâminas de vidro para microscopia, Invicta

¹⁶ Solução Corante para Hematologia Panótico Rápido - LB Laborclin

¹⁷ Microscópio Olympus BX 41

¹⁸ Lâmina de bisturi nº 24

3.3 MANEJO SANITÁRIO E CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Realizou-se anti-sepsia local com álcool iodado a 2% e a coleta de três mililitros (mL) de sangue por venopunção jugular, com agulha¹⁹ e seringa²⁰. As amostras obtidas foram transferidas para tubos de ensaio esterilizados, contendo, como anticoagulante, o Na₂-EDTA²¹ e utilizadas para a realização de hemograma. Foram confeccionados esfregaços em lâmina de vidro, corados pelo método de coloração rápida Panótico, nos quais realizou-se a pesquisa de hematozoários.

Após a seleção e a consecução dos testes hematológicos, os animais foram submetidos à quarentena. Como parte do manejo sanitário, eles receberam medicação anti-helmíntica²² e terapêutica preventiva para *Babesia* spp.²³, na dose de 4 mg/kg, pela via intramuscular, repetida decorridos 15 dias da primeira dose. Simultaneamente, empregou-se fármaco para o controle profilático de *Ehrlichia* sp²⁴, na dose de 5mg/kg, em intervalos regulares de 12 horas, por 21 dias consecutivos, pela via oral. Aplicou-se, por via tópica, ectoparasiticida²⁵. Posteriormente, os animais foram vacinados²⁶.

Constituíram-se dois grupos experimentais: Grupo Inoculado (GI) e Grupo Controle (GC), formados por sete e três animais, respectivamente. Os animais foram mantidos em canis individuais, em área telada, e receberam, diariamente, ração comercial seca para cães e água potável à vontade.

Em todos os animais, de ambos os grupos, utilizaram-se colares impregnados com deltametrina²⁷ durante o período experimental, no intuito de prevenir a ação hematófaga de artrópodes vetores de *Leishmania* sp. Adjunto, os animais foram mantidos em local protegido com tela fina, com o mesmo objetivo.

¹⁹ Agulha descartável 25x8, marca BD.

²⁰ Seringa descartável, 5 ml, marca BD.

²¹ Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico, Reagen

²² Drontal Plus®, Bayer

²³ Ganaseg®, Novartis

²⁴ Doxitrat®, Agener União

²⁵ Max 3®, Bayer

²⁶ Duramune Max®, Fort Dodge

²⁷ Coleira Scalibor®, Intervet

3.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

3.4.1 INOCULAÇÃO DA CEPA (MHOM/BR/00/MER02) DE *Leishmania infantum*

Formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/00/MER02) foram expandidas *in vitro* em meio Schneider's até a fase de crescimento exponencial, sendo diluídos em uma concentração de 10^7 microorganismos/ml. A cepa foi proveniente da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - Bahia.

Procedeu-se à infecção experimental em sete cães pertencentes ao Grupo Inoculado (GI), com o uso de 150 µL da solução de cultura de *Leishmania* sp., por via tópica ocular bilateral. No grupo Controle (GC), instilou-se solução fisiológica isotônica em mesmo volume.

Para a inoculação, os animais foram sedados com acepromazina, na dose de 0,1mg/kg, por via intramuscular, e seguiu-se um protocolo de instilação de uma gota a cada 5 minutos, objetivando-se uma completa absorção conjuntival.

3.4.2. MONITORAMENTO DOS GRUPOS INOCULADO (GI) E CONTROLE (GC)

Procedeu-se à realização de exame clínico e oftalmológico nos animais às 2, 4, 6, 12 e 24h após a instilação. Em seguida, eles foram examinados diariamente por uma semana e, a partir daí, uma vez por semana, até que se completassem 60 dias de pós-infecção (PI). A semiotécnica foi realizada conforme descrito nos itens 3.2.1 e consistiu na observação da presença de sinais oculares ou sistêmicos de LVC.

3.5 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Aos 60 dias PI, segundo recomendação do Ministério da Saúde e normas do Conselho Federal de Medicina Veterinária, realizou-se a eutanásia dos animais de ambos os grupos, no Centro de Especialidades Veterinárias – CEV, em Fortaleza, Ceará, empregando-se a acepromazina e o tiopental sódico²⁸.

Injetou-se 1 mL de solução de formalina²⁹ tamponada a 10% no interior dos globos oculares, que, posteriormente, foram enucleados de sua órbita e mantidos na mesma solução fixadora até a realização dos exames.

Foram coletados fragmentos da terceira pálpebra, da glândula da terceira pálpebra e da conjuntiva. Estes foram processados para a inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo a 3-4 micrômetros (μm) e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE), segundo o descrito por BEHMER, TOLOSA e FREITAS NETO (1976).

A microscopia de luz foi realizada no Setor de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, em Recife, Pernambuco.

3.6 IMUNOMARCAÇÃO DAS FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum*

A imunomarcação das formas amastigotas de *L. infantum* foi realizada mediante a técnica de imuno-histoquímica pela estreptoavidina-peroxidase em material biológico embebido em parafina, no laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal

²⁸ Pentobarbital® – Cristália –Produtos químicos farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil

²⁹ Formaldeído, Reagen

Rural de Pernambuco e na Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araçatuba, através de metodologia padronizada por TAFURI et al. (2004).

Para cada bateria de 20 lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo. Como controle negativo, utilizou-se Solução Salina Tamponada (SST), em substituição aos anticorpos primários. Como controle positivo foi utilizado uma lâmina com corte histológico de pele de orelha de um cão naturalmente infectado com *L. infantum* com parasitismo cutâneo intenso.

3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Realizou-se a análise qualitativa das amostras para a descrição dos resultados.

4. RESULTADOS

No estudo preliminar (RIBEIRO, 2007), todos os animais do grupo inoculado (GI) apresentaram alterações clínicas oculares após a infecção experimental.

Observou-se a presença de discreta secreção ocular seromucóide em 71,42% (5/7) dos cães do GI, de forma uni ou bilateral e 100% dos cães apresentaram alterações em relação à transparência em diferentes regiões da córnea, caracterizadas por opacidades puntiformes que se apresentaram de forma uni ou bilateral.

A hiperemia conjuntival foi observada em 85,71% (6/7) dos animais do GI.

Não foi vista secreção ocular, alteração da transparência corneal ou hiperemia conjuntival nos animais do grupo controle (GC).

4.1 AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO DA SUPERFÍCIE OCULAR

Ao exame histopatológico o Grupo Inoculado (GI) revelou a presença de exsudato inflamatório com predomínio de plasmócitos e de linfócitos.

Na conjuntiva dos animais do GI foi observado infiltrado linfoplasmocitário subepitelial, de forma unilateral em 28,57% (2/7) e de forma bilateral em 71,43% (5/7).

Perivasculite com presença de plasmócitos e macrófagos ao redor dos vasos conjuntivais e congestão vascular, foram observadas. Hemorragia em estroma conjuntival foi verificada em 28,57% (2/7) dos cães.

Infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, com o predomínio de plasmócitos, foi visto na terceira pálpebra, ocorrendo em graus variados,

em todas as amostras avaliadas. Em 5 dos 7 animais, evidenciou-se adelgaçamento dos epitélios de revestimento da terceira pálpebra.(Figura 1).

A exsudação inflamatória preponderou nas áreas adjacentes ao epitélio estratificado plano e plasmócitos e macrófagos foram mais evidenciados nas áreas subepiteliais. No epitélio colunar prismático e nas áreas mais próximas à cartilagem da terceira pálpebra, uma menor quantidade de exsudato inflamatório foi identificada. Por outro lado, nas regiões onde o exsudato inflamatório foi mais evidente, o epitélio encontrava-se adelgado em grande parte de sua extensão. Tanto o epitélio estratificado plano, quanto o colunar prismático achavam-se hiperplásicos e, na maioria das vezes, havia acentuada hiperplasia das células caliciformes, não raro, afetando toda a sua extensão (Figuras 2 e 3). Em algumas áreas, todavia, não se encontraram células caliciformes.

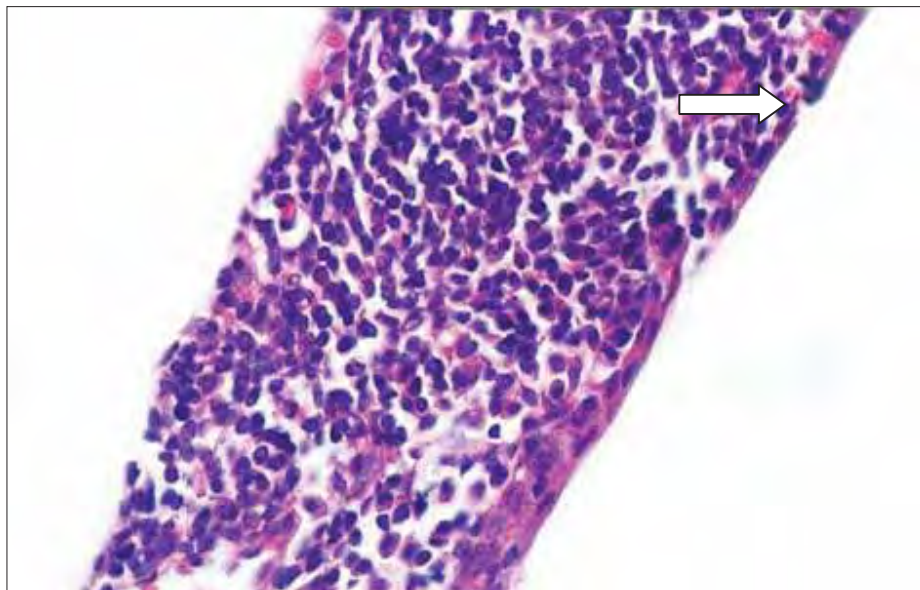


Figura 1 – Fotomicrografia da conjuntiva da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival com cultura de *Leishmania infantum*. Notar intenso infiltrado constituído por linfócitos e plasmócitos adjacente ao epitélio, com adelgaçamento do mesmo (seta). HE. Obi. 10x.

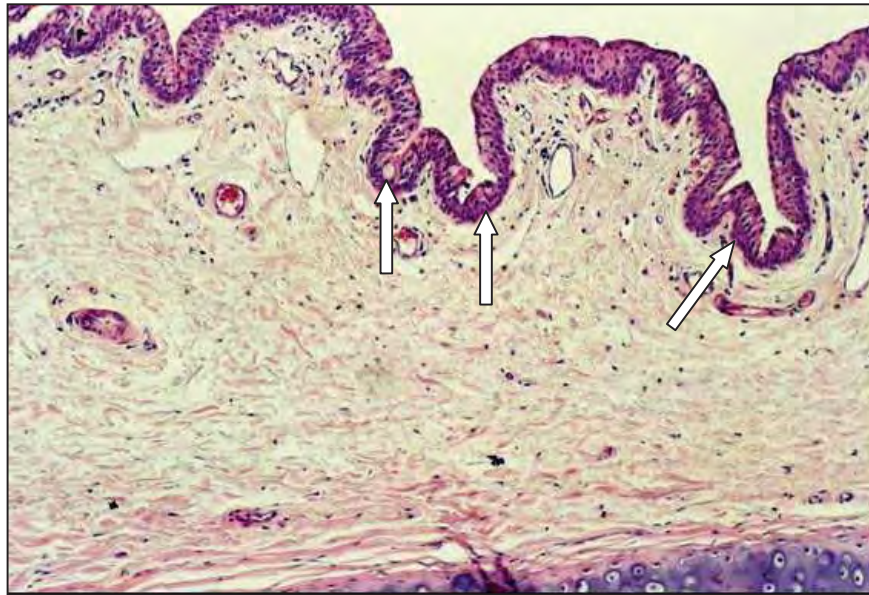


Figura 2 - Fotomicrografia da conjuntiva da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival, com cultura de *Leishmania infantum*. Notar áreas do epitélio, ora com metaplasia, ora com hiperplasia das células caliciformes. HE. Obj. 4x.

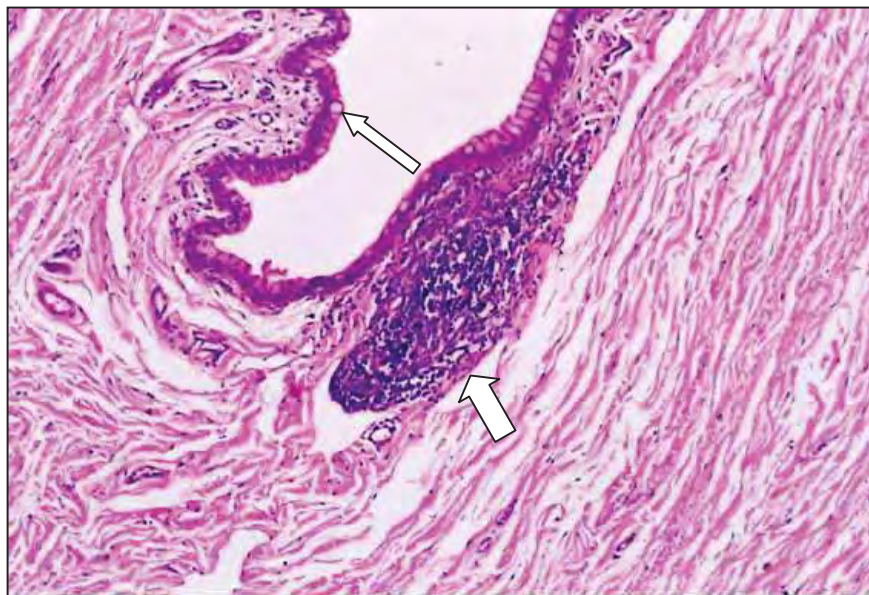


Figura 3 –Fotomicrografia da conjuntiva da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival com cultura de *Leishmania infantum*. Notar intenso infiltrado focal (seta larga) e hiperplasia de células caliciformes (seta estreita). HE. Obj. 4x.

Nas glândulas da terceira pálpebra, as alterações foram representadas, principalmente, por infiltrado inflamatório composto por linfócitos e plasmócitos em 42,85% (3/7) dos animais. Verificou-se atrofia focal em grande parte dos ácinos serosos e mucosos, notadamente junto à presença de exsudato inflamatório. A desorganização do estroma da glândula foi encontrada em alguns dos fragmentos avaliados, e células inflamatórias foram visibilizadas entre os ácinos, no lúmen e nos ductos (Figura 4).

No Grupo Controle, um animal apresentou células inflamatórias mononucleares (linfócitos e plasmócitos) no tecido conjuntival, de forma discreta. Nenhuma outra alteração foi observada.

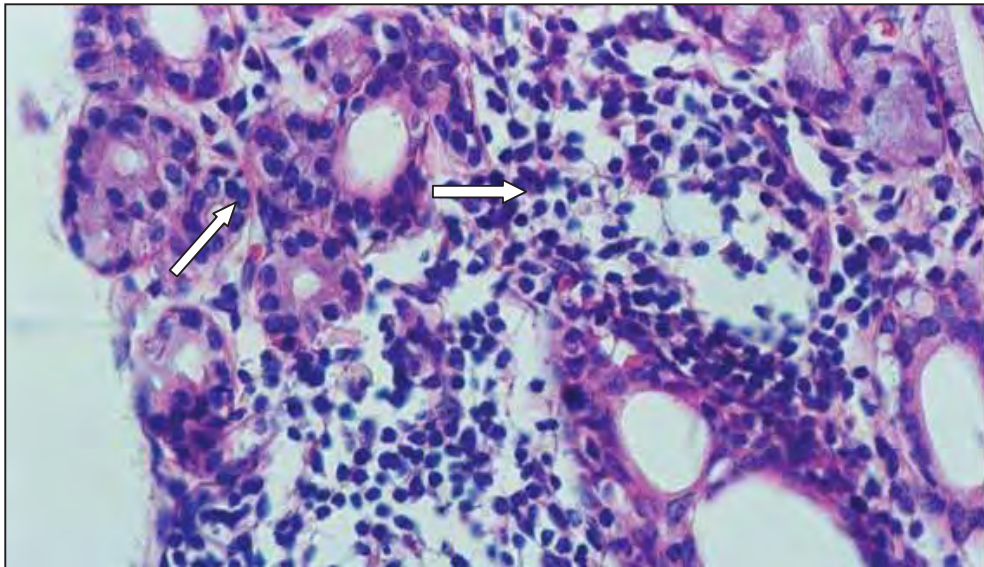


Figura 4 – Fotomicrografia do tecido glandular da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival, com cultura de *Leishmania infantum*. Notar infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (setas) distribuído difusamente entre os ácinos e ductos. HE. Obj. 40x.

4.2. IMUNOMARCAÇÃO DAS FORMAS AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA INFANTUM*

A presença de formas amastigotas de *L. infantum* em olhos de cães foi confirmada através da técnica de imuno-histoquímica pela estreptoavidina-peroxidase em 100% das amostras analisadas do grupo infectado (GI) (Figuras 5 a 8).

Nos animais do GC, não foi observada imunomarcagem de formas amastigotas de *Leishmania infantum* pela estreptoavidina-peroxidase.

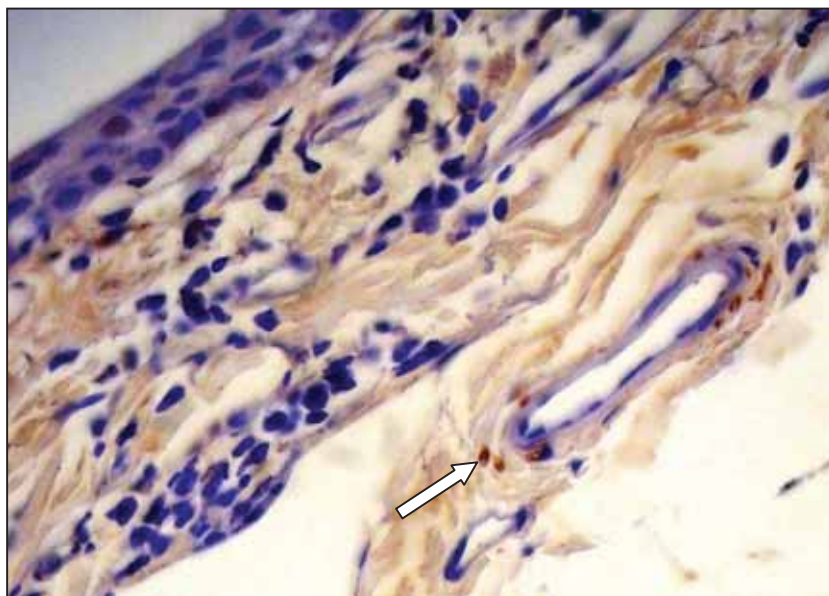


Figura 5- Fotomicrografia da conjuntiva da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival com cultura de *Leishmania infantum*. Observar imunomarcagem pela imuno-histoquímica através da estreptovidina-peroxidase das formas amastigotas ao redor de um vaso sanguíneo. Seta. IHQ Obj. 10x.

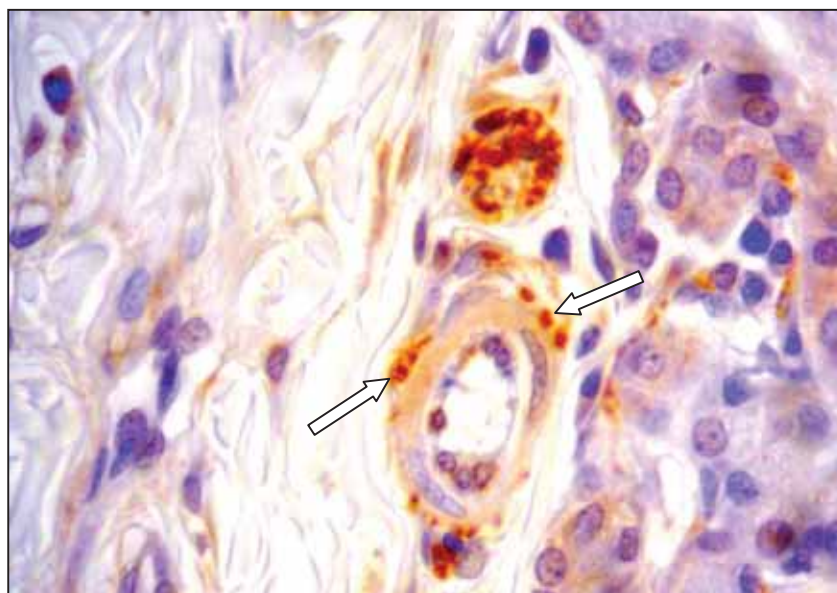


Figura 6 Fotomicrografia da glândula lacrimal da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival, com cultura de *Leishmania infantum*. Observar imunomarcagem das formas amastigotas pela imuno-histoquímica através da estreptovidina-peroxidase. Setas. IHQ Obj. 40x.

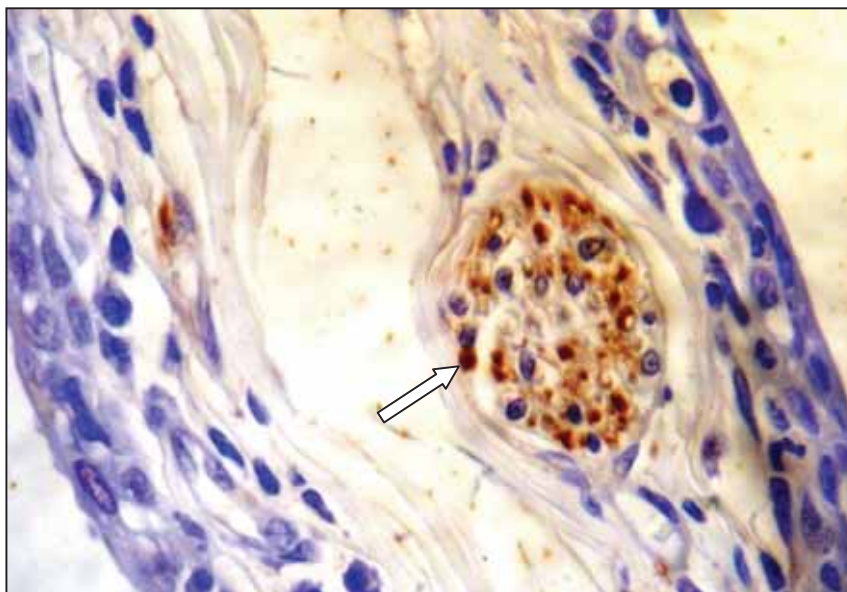


Figura 7 - Fotomicrografia da conjuntiva da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival com cultura de *Leishmania infantum*. Observar imunomarcacão das formas amastigotas pela imuno-histoquímica através da estreptovidina-peroxidase. Seta. IHQ Obj. 40x.

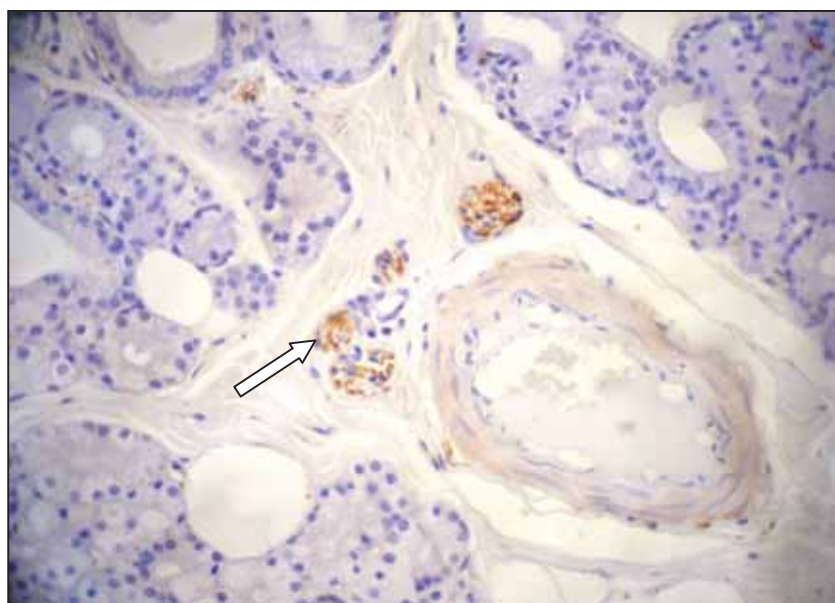


Figura 8 - Fotomicrografia do tecido glandular da terceira pálpebra de cão infectado por via tópica conjuntival, com cultura de *Leishmania infantum*. Observar imunomarcacão pela imuno-histoquímica através da estreptovidina-peroxidase das formas amastigotas distribuídas difusamente entre os ácinos. Seta. IHQ Obj. 10x.

5. DISCUSSÃO

Poucas informações sobre a imunologia da LVC experimental estão acessíveis na literatura, em contraste à abundância de dados referentes à LV e à infecção experimental murina (FIGUEIREDO et al., 2009). Um dos principais problemas na imprevisível natureza da resposta, onde um mesmo processo de inoculação induz a diferentes padrões clínicos da doença, é que somos desprovidos de modelos de homogeneidade e reprodutibilidade necessários para obter conclusões definitivas (SOLBACH e LASKAY, 2000). No entanto, sabe-se que os fatores que interferem no sucesso, na progressão da infecção e nas características da LVC experimental, parecem estar relacionados ao tamanho do inóculo, à via de inoculação do parasito e à fase dos parasitos utilizados na infecção (MORENO E ALVAR, 2002).

Um flebotomíneo infectado é capaz de inocular de uma a 1000 formas promastigotas em cada repasto sanguíneo (ALMEIDA et al., 2003; FIGUEIREDO, 2009). No sítio de inoculação no hospedeiro vertebrado, a defesa natural é ativada devido à presença de sistema complemento, trombinas, cininas, plaquetas, anticorpos naturais, fagócitos, dentre outros. Por outro lado, na saliva do vetor encontram-se elementos farmacologicamente ativos, como inibidores do complemento, adenosina, IL-2, prostaglandinas e maxadilán, que tem efeito inibidor da atividade do macrófago em apresentar o parasito às células T (CABRERA, 1999). Essa associação de efeitos, aliados a mecanismos de escape do parasito, são determinantes no desenvolvimento da infecção. Nesse estudo foi factível a infecção, a despeito da ausência das condições naturais facilitadoras inerentes ao vetor, no sítio de inoculação conjuntival utilizado.

ALMEIDA et al. (2003), referiram que a alta infectividade do inóculo está diretamente ligada ao sucesso do parasito em estabelecer a infecção. O inóculo utilizado nesse estudo consistiu de uma cultura de promastigotas na concentração de 10^7 microorganismos/mL, representando uma concentração maior que a do inóculo natural, o que pode tê-lo tornado eficiente em desenvolver a infecção.

Há indícios de que a inoculação de formas promastigotas cultivadas de *L. infantum* apresenta, no curso da infecção, algum grau de resistência na mudança para a forma amastigota, como observado em modelo canino e em hamster por REQUENA et al. (2000). SOLANO-GALLEGO et al. (2000) sugerem que diferenças genéticas individuais dos cães e a ativação de diferentes vias da resposta imune, podem ser responsáveis por essa variação.

SANTOS-GOMES et al. (2000) observaram que a utilização de formas promastigotas por via intra-dérmica em cães, mostrou-se efetiva no desenvolvimento de anticorpos, que foram detectados todos os animais infectados. Neste estudo, o inóculo composto de formas promastigotas foi eficiente em promover a infecção dos tecidos oculares, contrariando REQUENA et al. (2000) que observaram que a inoculação de promastigotas por via intracardiaca, em hamsters, não induziu ao desenvolvimento de sinais da doença, o que poderia estar relacionado com a ausência de elementos farmacologicamente ativos presentes na saliva do vetor.

TRAVI et al (2001) demonstraram que a inoculação experimental com formas promastigotas pela via intradérmica em cães jovens, não permitiu o desenvolvimento de sinais clínicos, no entanto, ao utilizarem a via intravenosa, eles desenvolveram a enfermidade em três meses após a inoculação. Portanto, a inoculação intravenosa de formas promastigotas induz a uma rápida disseminação do parasito para o baço e o fígado, onde eles se multiplicam. Nessa via, o processo natural está acelerado de forma suficiente a induzir a doença sintomática (MORENO e ALVAR, 2002).

GENARO (1993) tomando por base diferentes estudos experimentais, verificou que a infecção experimental pela *Leishmania* sp., em cães, exibe diferentes formas de evolução: uma forma frustra, uma regressiva espontânea, ou o desenvolvimento da doença, através de uma evolução aguda ou crônica. Portanto, a patogenia que decorre da infecção experimental, parece ser imprevisível, podendo ser acompanhada de uma

diversidade de respostas, similarmente às observadas na infecção natural (FIGUEIREDO, 2009).

Os mecanismos patogênicos envolvidos na infecção pela via tópica conjuntival utilizada nesse estudo, são, ainda, desconhecidos, porquanto não haviam anteriormente sido documentados.

É evidente que as regiões expostas do olho possuem uma defesa notável contra microorganismos, e para romper essa defesa, o trauma de alguma forma é normalmente exigido (KLOTZ et al., 2000). O epitélio escamoso não queratinizado da conjuntiva, a córnea e a microbiota ocular funcionam como uma barreira protetora contra a invasão de patógenos. Apesar dos diversos mecanismos de defesa ocular, o suprimento vascular para a superfície do olho é uma grande canalização das defesas imunológicas (RIBEIRO, 2007), portanto, a resposta ocular inflamatória normalmente envolve a dilatação vascular e a exsudação de substâncias imunologicamente ativas e células, incluindo macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e linfócitos (KLOTZ et al., 2000). Algumas dessas reconhecidas alterações inerentes à resposta inflamatória ocular, foram identificadas no presente estudo.

As lesões histológicas são principalmente associadas à hipertrofia e à hiperplasia do infiltrado linfoplasmocitário (FIGUEIREDO, 2009), que se constitui predominantemente de células mononucleares, notadamente macrófagos, plasmócitos e linfócitos, associado a um variado grau de parasitismo, porquanto FIGUEIREDO (2009) documentou uma correlação positiva fraca entre a densidade parasitária e a reação inflamatória crônica em pele de cães experimentalmente infectados, quando verificou a existência de parasitismo tecidual intenso sem reação inflamatória ou vice-versa. As características histopatológicas descritas anteriormente foram, também, visibilizadas em nosso estudo, enfatizando a idéia anteriormente suposta de participação conjunta das respostas imune sistêmica e local na patogenia das lesões oculares (GARCIA-ALONSO et al., 1998).

EICHENBAUM et al. (1987) destacaram o Conjuntival Associated Lymphoid Tissue (CALT), como áreas especializadas, aptas a receber e a apresentar antígenos, cuja principal população de células mononucleares é representada pelas células de Langerhans (BIELORY, 2000), conhecidas por sua facilidade de reação imune na pele e por atuarem como apresentadoras de antígenos (APCs). Estas células parecem ter função similar no olho (GILLETTE et al., 1982).

A conjuntiva é o tecido ocular externo imunogenicamente mais ativo (BRITO, 2004), portanto considera-se factível o envolvimento de mecanismos imunológicos nos eventos conjuntivais presentes na LVC, porquanto linfócitos B conjuntivais, após a exposição a um antígeno local, se dirigem aos linfonodos regionais, onde se transformam em células plasmáticas, que retornam através da circulação sanguínea à conjuntiva, onde produzem imunoglobulina A (IgA). Da mesma forma, os precursores de células T são localmente sensibilizados, se dirigem aos linfonodos regionais e, em seguida, via hematógena, retornam à conjuntiva para fornecer defesa celular (KLOTZ et al., 2000). O predomínio de células inflamatórias nessas regiões poderia, então, estar relacionado à resposta específica na superfície conjuntival (BRITO, 2006; RIBEIRO, 2007).

A conjuntiva, de forma isolada ou não, normalmente está envolvida nas desordens oculares que se manifestam na LVC (MOLLEDA et al., 1993; SLAPPENDEL, 1988). Neste estudo, as alterações histológicas ocorreram em conjuntiva bulbar, em membrana nictitante e em glândulas lacrimais, similar ao descrito por MOLLEDA et al. (1993), GARCIA-ALONSO et al. (1998), NARANJO et al. (2005) e BRITO (2006), que demonstraram infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em diferentes segmentos do olho, e TAFURI et al. (2001) e XAVIER (2002) que o relataram em outros órgãos, como pele, baço, fígado, intestinos, pulmões e rins.

Exsudato inflamatório, predominantemente celular, caracterizado por mononucleares foi observado na conjuntiva e nas glândulas lacrimais dos animais do (GI) nesse estudo, o que corrobora com os achados de LAUGIER & VERRO-

BOULANGER (1992) e BRITO (2006), que identificaram forte exsudação inflamatória na conjuntiva, em cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp..

MOLLEDA et al (1993) referem que, na infecção natural, devido ao caráter sistêmico da doença, inicialmente o parasito pode afetar apenas um dos olhos, porém, o envolvimento bilateral pode ocorrer nos estados mais avançados.

Nesse estudo, infiltrado inflamatório subepitelial foi encontrado de forma unilateral em (28.57%) e de forma bilateral em (71.43%) na conjuntiva dos animais do Grupo Inoculado, e apresentou-se em diferentes graus, que variaram de discreto a intenso. BRITO (2006) sugere que essa distribuição desigual do infiltrado, pode ser devida à resposta independente de cada olho em relação à agressão pelo patógeno.

A ausência de infiltrado bilateral em alguns animais pode ter ocorrido pela ação dos mecanismos de defesa inerentes ao sistema ocular, uma vez que a via de infecção utilizada foi tópica conjuntival. Adjunto, acredita-se que, na infecção natural, as alterações bilaterais decorrem principalmente da infecção por via hematogena.

As diferenças quanto à intensidade da inflamação nas estruturas oculares aqui encontradas, foram também descritas por BRITO (2006), que admitiu decorrer do tipo de resposta imune do hospedeiro, predominantemente celular ou humoral.

MOLLEDA et al. (1993) e GARCIA-ALONSO et al. (1998) descreveram perivasculite acometendo a túnica fibrosa e FIGUEIREDO (2009) caracterizou um infiltrado inflamatório em focos ao redor de vasos, glândulas e folículos pilosos na derme de cães infectados naturalmente por *L. infantum*. Nesse estudo, a perivasculite foi visibilizada nos vasos conjuntivais superficiais, o que sugere a possibilidade da deposição de imunocomplexos suscitando uma resposta inflamatória, à semelhança das observações de PUMAROLA et al. (1991) e CIARAMELLA et al. (1997).

Relativamente à membrana nictitante, erosão focal do epitélio, variando de discreta a extensa, associada com infiltrado inflamatório moderado a acentuado com predomínio de macrófagos, plasmócitos e neutrófilos, acompanhando graus diversos de

hemorragia foram descritos por FULGÊNCIO (2006). Neste estudo, observamos que os epitélios de revestimento apresentaram-se adelgaçados e, por vezes, ulcerados, com infiltrado inflamatório na região subepitelial. Algumas áreas de hiperplasia de células caliciformes e outras com metaplasia epitelial e ausência de células caliciformes, foram identificadas, similarmente à descrição de BRITO (2006) ao estudar cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, quando referiu que as alterações relacionadas às células caliciformes são secundárias à reação inflamatória.

Na LVC, FULGÊNCIO (2006) documentou o infiltrado inflamatório entre as glândulas lacrimais, de forma difusa e moderada a acentuada, e, também, a sua disposição periglandular, promovendo a dilatação dos ductos das glândulas, e MOLLEDA et al. (1993) e ROZE (1986) relataram que o processo inflamatório intenso das glândulas lacrimais ou a obstrução dos ductos secretores em face da inflamação conjuntival, podem acarretar a ceratoconjuntivite seca em cães. Adjunto, a ação direta do parasito induzindo a fenômenos imunológicos deve ser considerada na patogenia dessa enfermidade.

Na glândula da terceira pálpebra, observou-se um infiltrado inflamatório caracterizado por linfócitos e plasmócitos entre os ácinos, no lúmen e nos ductos, semelhante ao reportado por GARCIA-ALONSO et al. (1996b), GARCIA-ALONSO et al. (1998) e BRITO (2006). Associada à presença de exsudato, identificou-se atrofia focal em ácinos serosos e mucosos e desorganização do estroma glandular em alguns fragmentos avaliados, à similitude do que fora descrito por BRITO (2006).

NARANJO et al. (2005) descreveram achados semelhantes, sugerindo que a deficiência na produção lacrimal em casos de Leishmaniose Ocular, decorrem da inflamação, da atrofia acinar, ou de ambas, porquanto relataram infiltrado inflamatório ao redor dos ductos, promovendo acúmulo retrógrado e retenção do produto de secreção glandular.

A inflamação demonstrada à histologia das glândulas lacrimais do GI aqui observada, sugere o rápido desenvolvimento das lesões em glândulas, o que corrobora

com NIETO et al. (1999), que relataram a presença de ceratoconjuntivite seca após seis meses da infecção experimental.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp. têm sido documentadas em tecidos oculares corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), no entanto, a baixa sensibilidade da técnica tem sido reportada (TAFURI et al., 2004). KLOTZ et al. (2000) referiram que formas amastigotas não são habitualmente identificadas na doença ocular decorrente da infecção por *Leishmania* sp., no entanto, DIAS (1998) evidenciou a presença destas formas nas três túnicas oculares, e BRITO (2004) as descreveu em cães naturalmente infectados, nos diversos componentes do olho, à exceção da retina. No presente estudo, formas amastigotas de *Leishmania* sp. não foram encontradas à histologia através da coloração por HE.

Em pele de cães experimentalmente infectados, FIGUEIREDO (2009) encontrou um carga parasitária inferior àquela encontrada nos naturalmente infectados, o que havia sido documentado anteriormente por TAFURI et al. (1996) e SAMPAIO et al. (2007) não só em pele, como também no fígado e no baço de cães experimentalmente infectados. Nesse estudo a carga parasitária presente nos tecidos oculares infectados, pode ter dificultado a identificação das formas amastigotas pelo método de coloração por HE.

A despeito da ausência de formas amastigotas ao exame histopatológico, os tecidos oculares estudados apresentaram diferentes alterações morfológicas, ratificando o que fora reportado por DIAS (1998), que informou sobre a indução de alterações estruturais pela presença de *Leishmania* sp. em tecidos oculares de cães infectados. Os dados obtidos neste estudo corroboram com BRITO (2006), que descreveu a ocorrência de exsudato inflamatório abundante na retina, mesmo na ausência do parasito, admitindo como factível que as lesões teriam sido induzidas pela deposição de imunocomplexos.

Cães experimentalmente infectados com cultura de formas promastigotas parecem desenvolver uma infecção assintomática (CAMPINO et al., 2000), portanto o

diagnóstico histopatológico só deve ser considerado positivo quando do encontro do parasito no tecido pesquisado (KEENAN et al., 1984; MARTINEZ-MORENO et al., 1995). Por sua vez, o encontro do parasito no tecido, é suficiente para confirmar a infecção (CAMPINO et al., 2000).

As reações de imuno-histoquímica são procedimentos que utilizam anticorpos específicos marcados para detecção de um maior número de estruturas parasitárias (TAFURI et al., 2004).

Uma eficiente detecção de formas amastigotas a partir do emprego da técnica da estreptoavidina peroxidase foram referidas por FERRER et al. (1991) e TAFURI et al. (2004), relatando que os procedimentos imuno-histoquímicos são de considerável valor para o diagnóstico definitivo da infecção. Outrossim, representam uma ferramenta eficiente e barata, utilizando em seu protocolo soro de cães naturalmente infectados com *Leishmania*, de fácil obtenção, como anticorpo primário.

BOURDOISEU et al. (1997) relataram também, que a sensibilidade do método foi maior que a do método padrão HE, porquanto o elevado grau de contraste obtido entre o parasito e o tecido do hospedeiro permitiu o diagnóstico inequívoco da LVC, mesmo na presença de um pequeno número de parasitos. Outrossim, a simplicidade do método e a facilidade na distinção entre os organismos marcados e os restos necróticos intracelulares, além da persistência e da intensidade da coloração, que tornam esta técnica adequada a estudos retrospectivos, quando comparada a imunofluorescência, cuja coloração desaparece rapidamente.

Essas informações condizem com os resultados aqui obtidos, uma vez que a presença de formas amastigotas de *L. infantum* em olhos de cães foi confirmada através da reação de imuno-histoquímica pela estreptoavidina-peroxidase em 100% das amostras analisadas do grupo infectado (GI), a despeito da ausência relatada através do estudo pela coloração de HE. Desta forma, a imuno-histoquímica demonstrou ser uma ferramenta valiosa para a identificação dos parasitos nos tecidos oculares.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, conclui-se que:

- A resposta à infecção experimental por *Leishmania infantum* por via tópica ocular em cães caracteriza-se por resposta inflamatória, composta por linfócitos, plasmócitos e macrófagos;
- A infecção por *Leishmania infantum* a partir da via tópica conjuntival foi comprovada através da marcação das formas amastigotas nos tecidos oculares;
- A imunomarcação é uma ferramenta valiosa para a identificação dos parasitos nos tecidos oculares;
- A via conjuntival é um modelo para o estudo da patogenia da Leishmaniose Ocular Canina.

7. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. R. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico em cães (*Canis familiares*) (LINNAEUS, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)**. 2006. 83f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

ALMEIDA, M.C. et al. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, p. 861-870, outubro, 2003.

ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.127, p. 227–232, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação – referências e elaboração**: NBR 6023. 24p. Rio de Janeiro, 2002.

BARBALHO-LIMA, T. et al. Lesões oculares em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, supl. 1, p. 43, 2005.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329-337, 2006.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo, EDART-EDUSP, 1976.

BIELORY, L. Immuno-ophthalmology. **Allergy Proceedings**, v. 12, n. 6, p. 365-369, 1991.

BIELORY, L. Allergic and immunologic disorders of the eye. Part I: immunology of the eye. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 5, p. 805-16, 2000.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 439-440, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde. Brasília, 2006.

BRITO, F. L. C. **Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (*Canis familiaris* LINNAEUS, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)**. 2004. 42f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.

BRITO, F.L.C. **Patologia, resposta imune humoral e diagnóstico em cães com oftalmopatias decorrente da infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2006. 52f. Dissertação de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; MAIA, F. C. L.; ALBUQUERQUE, A. R.; ORTIZ, J. P. D.; LAUS, J. L. Amastigota forms resembling *Leishmania* sp. on corneal ulceration in a dog: case report. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 81-84, 2007.

CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro - RJ : estudo de possíveis variáveis preditoras**. 1999. 90f. Tese de Mestrado - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, Ano XII, n. 71, p. 86-92, 2007.

CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.; CAPELA, M.J.R.; CORTES, S.; ABRANCHES, P. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 269-275, 2000.

CARVALHO, M. R. **Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na zona da mata norte de Pernambuco**. 2005. 98f. Dissertação de Mestrado – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2005.

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*. **Veterinary Record**, n. 141, p. 539-543, 1997.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264p.

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

DANTAS-TORRES, F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (*Diptera: Psychodidae*) transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog? **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 379-380, 2006.

DAVIDSON, R. N.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; KONECNY, P.; BENJAMIN, N. A topical nitric oxide-generating therapy for cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 319-22, 2000.

DE COPEGUI, R. R. Congenital and Acquired Vascular Wall Diseases. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Veterinary Hematology**, Lippincott, 5 ed., Baltimore, Maryland, USA, 2000. cap. 75, p. 528-531.

DIAS, D. V. **Leishmaniose visceral canina: estudo parasitológico, imunológico e histopatológico em olhos de cães**. 1998. 117p. Tese de doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

EICHENBAUM, J. D.; LAVACH, J. D.; SEVERIN, G. A.; PAULSEN, M. E. Immunology of the ocular surface. **Immunology**, v. 9, n.11, p. 99-106, 1987.

EL HASSAN, A. M.; KHALIL, E. A.; EL SHEIKH, E.A.; ZIJLSTRA, E. E.; OSMAN, A.; IBRAHIM, M. E. Post kala-azar ocular leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n.92, Suppl 2, p. 177-179, 1998.

EZQUERRA, J. P. A. *Lãs leishmaniasis: de la biologia al control*. Philadelphia: W.B. Saunders. (2a ed) 2001. Cap. 6, p. 157-159.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; VENTUROLI, S. H. P. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 28, p. 36-42, 2000.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: International Canine Leishmaniasis Forum, 1.,1999, Barcelona, Spain, **Proceedings...** p.6-10,1999.

FERRER, L. Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27 2002, Granada. **Anais eletrônicos...** Granada, 2002. Disponível em: <<http://www.avepa.org/granada2002>>. Acesso em: 07 jan. 2004.

FERRER, L.; MOLLEDA, C. P.; WALDER, E. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.49, p. 381-388, 1988.

FERRER, L.; JUANOLA, B.; RAMOS, J.A. et al. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. **Veterinary Pathology**, v.28, p.342-343, 1991.

FIGUEIREDO, M. M. **Análise histológica, parasitológica e morfométrica da pele de orelha de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2009. 100f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FULGÊNCIO, G. O. **Prevalência de oftalmopatias em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* no município de Belo Horizonte – estudo clínico e histopatológico**. 2006. 48f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

FULGÊNCIO, G. O.; VIANA, F. A. B.; MICHALICK, M. S. M. Alopecia periocular, blefarite, ceratoconjuntivite e uveíte: Manifestações oftálmicas da leishmaniose visceral canina? **Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida**, v. 24, Suplemento, p. 31-32, 2004.

FULGÊNCIO, G. O.; RIBEIRO, R. R.; BORGES, K. D. A.; MICHALICK, M. S. M.; VIANA, F. A. B. Manifestações oculares e perioculares da leishmaniose visceral canina: 65 casos (2003-2005). In: Congresso de Pequenos Animais da Anclivepa, 2006, Vitória, Anais..., p.87, 2006.

GARCIA-ALONSO M.; BLANCO, A.; RINA, D.; SERRANO, F. J.; ALONSO, C.; NIETO, C. G. Immunopathology of the uveítes in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.18, p. 617-623, 1996a.

GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, C. G. ; BLANCO, A.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid

during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunology**, v. 18, p. 539-546, 1996b.

GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, C. G.; VERDUGO, S. G. et al. Diagnostico y tratamiento de la uveitis anterior inmunomediada en leishmaniosis canina. In: Congresso Ibérico de Parasitologia, 4, 1995, Santiago de Compostela, **Anais...** Santiago de Compostela, 1995, p. 1998.

GARCIA-ALONSO, M.; MIRÓN, C.; MOLANO, I. Patología ocular asociada a leishmaniosis canina. **Consulta de Difusión Veterinária**, v. 6, n. 54, p. 49-53, 1998.

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

GOMES, Y. M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 45–52, 2008.

GILLETTE, T. E.; CHANDLER, J. W.; GEINER, J. V. Langerhans cell of the ocular surface. **Ophthalmology**, v.89, p.700-711, 1982.

HOFMAN, V.; BROUSSET, P.; MOUGNEAU, E.; MARTY, P.; LAMANT, L.; ANTOINE, J. C.; GLAICHENHAUS, N.; HOFMAN, P. Immunostaining of visceral leishmaniasis

caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (19-11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-Kinase. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 120, n. 4, p. 567-574, 2003.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L. et al. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. I. Infection, clinical disease and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 80-86, 1984.

KLOTZ, A. S.; PENN, C. C.; NEGVESKYET, G. J.; BUTRUS, S. I. Fungal and Parasitic Infections of the Eye. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p. 662-685, outubro, 2000.

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, p. 376-383, 1999.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; DA SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose Visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007.

LAUGIER, C.; VERRO-BOULANGER, C. Ocular leishmaniasis. **Pratique medicale e chirurgicale del animal de campagne**, v. 27, n.6, 1992.

LEIVA, M.; LLORET, A.; PEÑA, T. ROURA, X. Ocular and visceral leishmaniosis in a domestic cat. **Veterinary Ophthalmology**, v. 5, p. 285, 2002.

LINARD, P. M.; NAGEM, R. L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 33, n. 4, p. 529-538, 1973.

LIVNI, N.; ABRAMOWITZ, A.; LONDNER, M.; OKON, E; MORAG, A. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. **Virchows Archiv - Journal of the European Society of Pathology**, v. 401, p. 147, 1983.

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

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; AMENDOEIRA, M. M. R. Leishmaniose visceral – Calazar. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p.69, 1981.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

McCONNEL, E. E.; CHAFFEE, E. F.; CASHELL, I. G.; GARNER, F. M. Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 156, p. 197-203, 1970.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição Espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.4, p. 337-340, 2006.

MOLLEDA, J .M.; NOVALES, M.; GINEL, P. J.; LOPEZ, R. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. **Israel Journal Veterinary and Medicine**, v. 48, p.173-178, 1993.

MOREIRA, M. A.; LUVIZOTTO, M. C.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods of the diagnosis of leishmaniosis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n 3-4, p. 245-252. 2007.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZÁLES, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVAR, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunopathology**, v. 71, n.3/4, p.181-195, Nov. 1999.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 399-405, 2002.

NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; PEÑA, T. et al. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 133, p. 37-47, 2005.

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

NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A.; et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 45, p. 33-47, 1992.

NIETO, C.G.; GARCÍA-ALONSO, M.; REQUENA, J. M.; MIRÓN, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, p. 117-130, 1999.

NOGUEIRA, J. L.; SILVA, M. V. M.; PASSOS, C. C.; AMBRÓSIO, C. E. A importância da leishmaniose visceral canina para a saúde pública: uma zoonose reemergente. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VII, n. 13, 2009.

NOVALIS, M.; LOPEZ, R.; GINEL, P.J. et al. Les effets de l'uvéite sur la concentration des protéines totales dans l'humeur aqueuse de chiens atteints de leishmaniose. **Rev. Méd. Vet**, v.145, p.257-259, 1994.

OWENS, S. D.; MARRYOTT, D. A. O. K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T. J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Medical Association**, v. 15, p. 1076-1083, 2001.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G.; MELRO, M. C. B. F.; OLIVEIRA, G. G. S.; DOS SANTOS, W. L. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for american visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. **Acta Tropica**, v. 69, p. 75-83, 1998.

PEIFFER JUNIOR, R. L. Ocular immunology and mechanisms of ocular inflammation. **Symposium on Ophthalmology**, v. 10, n. 2, p. 281-302, 1980.

PEÑA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dog: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, v.3, p.35-41, 2000.

PIMENTEL, D. S. **Alterações estruturais e análise imuno-histoquímica do coração e pulmões de cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA e CHAGAS, 1937)**. 2009. 89p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally

and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PUMAROLA, M. BREVIK, L.; BADIOLA, J.; VARGAS, A.; DOMINGO, M.; FERRER, L. I. Canine Leishmaniasis associated with systemic vasculites in two dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v.105, p. 279-286, 1991.

REQUENA, J. M.; SOTO, M.; DORIA, M. D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 76, n. 3-4, p. 269-281, 2000.

RIBEIRO, A. G. **Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (*Canis familiaris* LINNAEUS, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)**. 2007. 52f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

ROSYPAL, A. C.; ZAJAC, A. M.; TROY, G. C.; LINDSAY, D. S. Infections in immunocompetent and immune-deficient mice with promastigotes of a North American isolate of *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 19-27, 2005.

ROZE, M. Manifestations conjunctivales at cornenes de la leishmaniose. **Pratique Medecine et Chirurgic**, v. 4, p. 245-255, 1986.

ROZE, M. Ocular manifestation of canine leishmaniasis. Diagnosis and treatment. **The Globe Newsletter of the Internacional Society of Veterinary Ophthalmology**, v.13, 2002.

SAMPAIO, W. M.; MOURA, E. P.; ARRUDA, F. C.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; FERNANDES, A. P.; MICHALICK, M. S.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. In vitro binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **BMC Veterinary Research**, v.3, p.11, 2007.

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

SARTORI, A.; VIANA DE OLIVEIRA, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. et al. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. **Parasite Immunology**, v. 9, p. 93-103, 1987.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O.; BRAZIL, R. P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, Rio de Janeiro, 2001.

SILVA, F. L.; RODRIGUES, A. A.; REGO, I. O.; SANTOS, R. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 86-90, 2008.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, The Hague, n. 10, p. 1-16, 1988.

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990. Cap. 79, p. 769-777.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania infection*. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 37-45, 2000.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. **Advances in Immunology**, v. 74, p. 275-317, 2000.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis. In: **Recent Advances in Canine Infectious Diseases**, Carmichael L., Ithaca, NY, 2001. Disponível em: <<http://www.ivis.com.br>>. Acesso em: 07 set. 2005.

TAFURI, W.L.; TAFURI, W. L.; BARBOSA, A.J.A. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, p.81-89, 1996.

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 203-212, 2001.

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

TORRES, F. D.; FILHO, S. P. B. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64 n. 3, p. 119-124, 2001.

XAVIER, S.C. **Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2002. 46f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.