



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA PARASITÁRIA DE
CÃES COM DIFERENTES APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DA
LEISHMANIOSE VISCERAL E A TRANSMISSÃO AO VETOR DA
*Leishmania infantum***

LAIRTON SOUZA BORJA

Salvador – Bahia – Brasil

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA



Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA PARASITÁRIA DE
CÃES COM DIFERENTES APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DA
LEISHMANIOSE VISCERAL E A TRANSMISSÃO AO VETOR DA
*Leishmania infantum***

Lairton Souza Borja

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Co-orientador: Profa. Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de
Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito
obrigatório para obtenção do grau de
Mestre

Salvador – Bahia – Brasil

2013

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para que essa conquista fosse realizada. Não existem palavras suficientes que possam expressar a minha humilde gratidão perante vós.

Agradeço a minha orientadora Dra. Patrícia por toda paciência, pelo exemplo de ética, paixão pelo trabalho, por todo o tempo dedicado e pelo valoroso conhecimento ensinado.

Agradeço a minha co-orientadora Dra. Deborah pela paciência, pelos conhecimentos passados, pelo exemplo de dedicação em todos os momentos possíveis e pelas palavras de incentivo que me ajudaram muito nos momentos finais.

Aos meus pais e meus irmãos que sempre me apoiaram de todas as formas possíveis, pelo carinho, amor, sem eles a conquista desse sonho não seria possível.

A Beatriz Dias, pelo companheirismo, carinho, por ter tornado meu Mundo mais feliz e por me mostrar o que o significa amor.

Aos meus colegas Isaac, Marcos, José Geraldo, Carlos Eduardo, Niara, Luana, Manuela, Samira, Marcelo, Vic, Antonio, Rodrigo, Estefane, Ana Caroline, Vitória, Bruna, Junior Guedes, Luciano, Liliane e Leila pelos momentos vividos, pelas alegrias que até o momento não foram poucas e pelas que ainda virão.

Aos outros colegas do LPBI, pesquisadores e colegas da Fiocruz pelos momentos e ensinamentos compartilhados.

À administração do LPBI, em especial à Flavia pela ajuda e dedicação;

Aos amigos do curso PGPAT, pelos momentos de estudo e diversão passados juntos;

À Coordenação do curso PGPAT Fiocruz / UFBA;

A Capes pela bolsa de mestrado que ajudou na realização deste projeto;

À Fiocruz e ao CPqGM, pela infraestrutura física e pessoal que possibilitaram a execução dos experimentos desta dissertação.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELA	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Epidemiologia	14
1.2 Agente Etiológico	15
1.3 Vetor	17
1.4 Reservatório Hospedeiro	17
1.5 Leishmaniose Visceral Canina.....	18
1.5.1 Prevalência da infecção canina	20
1.5.2 Patogênese da LVC	21
1.5.3 Manifestações clínicas	23
1.5.4 Carga parasitária nos tecidos de cães infectados	24
1.6 Transmissão.....	25
1.7 Medidas de controle da transmissão da <i>L. infantum</i>.....	26
1.8 Infectividade dos cães em relação vetor <i>Lutzomyia longipalpis</i>.....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVO GERAL	31
3.1 ESPECÍFICOS	31
4 MÉTODOS	32
4.1 Considerações éticas.....	32
4.2 População do estudo	32
4.3 Coleta de amostras.....	33
4.4 Análises laboratoriais	34
4.4.1 ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> sp.....	34
4.4.2 Cultivo do parasita	35
4.4.3 Extração de DNA dos Tecidos	35
4.4.4 Extração de DNA dos flebotomíneos.....	35

4.5	PCR quantitativa (qPCR)	36
4.5.1	Quantificação de <i>Leishmania</i> kDNA	36
4.5.2	Quantificação do gene canino rRNA 18S	38
4.6	Xenodiagnóstico	39
4.7	Análise de resultados	40
5	RESULTADOS	41
5.1	População do estudo	41
5.2	Carga parasitária nas amostras de tecidos dos cães infectados apresentando diferentes apresentações clínicas de LVC	42
5.3	Avaliação da capacidade de transmissão de cães naturalmente infectados ao vetor flebotomíneo.....	46
5.4	Correlação entre a carga parasitária em cães naturalmente infectados e sua capacidade de transmissão ao vetor flebotomíneo	49
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9	ANEXOS	72

LISTA DE ABREVIATURAS

LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LPG	Lipofosfoglicano
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon γ
Th1	Célula T <i>helper</i> 1
Th2	Célula T <i>helper</i> 2
TNF- α	<i>Tumour necrosis factor</i> - α - (Fator de necrose tumoral)
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex II</i> – (Complexo principal de histocompatibilidade II)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – (Reação em cadeia da polimerase)
qPCR	<i>Real time PCR</i> – (PCR quantitativo)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> – (Ensaio Imunoenzimático)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
DNA	Ácido desoxirribonucléico
SLA	Antígeno Solúvel Bruto
PBS	Tampão Fosfato-Salina
PBST	Tampão Fosfato-Salina Tween
BSA	Albumina Bovina Sérica
TMB	Tetrametil benzidina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
D.O.	Densidade óptica
DP	Desvio Padrão
NNN	Meio <i>Novy-MacNeal-Nicolle</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
HCl	Ácido clorídrico
TE	Tampão de Eluição
kDNA	DNA Cinetoplasto
RNA	Ácido ribonucléico

rRNA	Ácido ribonucléico Ribossômico
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
MS	Ministério da Saúde
IgG	Imunoglobulina G
CT	<i>Threshold Cycle</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - História natural da leishmaniose canina	19
Figura 2 - Realização da técnica de xenodiagnóstico em um dos cães selecionados para o estudo	40
Figura 3 - Quantificação da carga parasitária por qPCR nas amostras de tecidos de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	43
Figura 4 - Percentual de cães infectados estratificados de acordo com a carga parasitária.....	45
Figura 5 - Infectividade ao flebótomo de cães com as diferentes formas clínicas.....	46
Figura 6 - Percentual de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> distribuídos de acordo com número de flebótomos infectados no xenodiagnóstico.....	47
Figura 7 - Quantificação da carga parasitária nos flebótomos utilizados no xenodiagnóstico de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	48
Figura 8- Distribuição da média da carga parasitária nos flebótomos infectados no xenodiagnóstico realizados em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	49
Figura 9 - Distribuição da carga parasitária nas amostras de sangue de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> quanto à infectividade ao flebótomo	50
Figura 10 - Correlação da taxa de infecção de flebótomos avaliados no xenodiagnóstico e a carga parasitária nas amostras de sangue de cães infectados com <i>L. infantum</i>	51
Figura 11 - Correlação entre a carga parasitária nos flebótomos infectados e a carga parasitária em amostras de tecidos dos cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	52
Figura 12 Anexa - Correlação da taxa de infecção de flebótomos avaliados no xenodiagnóstico e a carga parasitária nas amostras de pele e aspirado esplênico de cães infectados com <i>L. infantum</i>	74

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Positividade dos testes diagnósticos de acordo com as diferentes formas clínicas em cães naturalmente infectados	42
Tabela 2-Anexo. Resultados dos testes diagnósticos para LVC em 35 incluídos no estudo para avaliação de transmissibilidade de <i>Leishmania</i> por xenodiagnóstico....	72
Tabela 3 Anexos. Percentual de distribuição de cães de acordo com a quantidade de <i>L. infantum</i> determinada por qPCR em três amostras de tecidos avaliadas de cada animal	73

RESUMO

No Novo Mundo, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela *Leishmania infantum*, que tem como vetor o inseto flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Os cães são considerados o principal reservatório urbano da infecção. Devido ao fato do controle da LV se basear, principalmente, no controle da leishmaniose visceral canina (LVC), é importante estudar o papel dos cães na transmissão da infecção. Foi demonstrado que cães apresentando diferentes apresentações clínicas da LV, inclusive os assintomáticos transmitem a infecção ao vetor flebotomíneo. Nenhum estudo sistemático avaliou a associação direta entre a carga parasitária em diferentes tecidos e a transmissão do parasito. A hipótese desse estudo é que cães com baixa carga parasitária na pele e no sangue não transmitem a infecção ao vetor flebotomíneo. O objetivo deste estudo foi analisar se há correlação entre a carga parasitária de cães com diferentes apresentações clínicas da LV e a transmissão ao vetor *Lutzomyia longipalpis*. Foram selecionados 35 cães de dois canis, localizados em área endêmica (n=23) e não endêmica (n=12) para LV. Os animais foram classificados de acordo com o número de sinais clínicos em: assintomáticos (sem sinais; n=12), oligossintomáticos (1-3 sinais; n=15) e polissintomático (<3 sinais; n=8). Todos os 35 cães foram positivos em pelo menos um dos testes diagnósticos: ELISA (n=8), cultura de aspirado esplênico (n=9) e qPCR (n=35) dos tecidos avaliados. Diferentes tecidos (sangue periférico, aspirado esplênico e biópsia de pele) foram coletados para quantificação do DNA do parasito pela qPCR. Para avaliar a capacidade de transmissão dos cães, foi realizado xenodiagnóstico, seguido de determinação da carga parasitária em cada flebótomo utilizando qPCR. Finalmente, a capacidade de transmissão de *Leishmania* foi estimada pela determinação, após o xenodiagnóstico, da infectividade de cães ao flebótomo, da taxa de infecção de flebótomos, e da carga parasitária transmitida aos flebótomos. Baixa carga parasitária na pele e no sangue foi detectada em aproximadamente 85% dos cães assintomáticos. A infectividade de cães ao flebótomo variou de 60 a 90%, e foi similar entre animais apresentando diferentes números de sinais clínicos. Foi identificado que o maior percentual (51%) de cães transmite parasitos a um pequeno número de flebótomos (de 1 a 5 em 30 flebótomos utilizados no xenodiagnóstico). Entre os tecidos analisados, correlação positiva foi detectada

entre a infectividade de cães ao vetor e a carga parasitária nas amostras de sangue ($r = 0.50$, $p < 0.01$). Adicionalmente, foi observada, correlação positiva entre menor taxa de infecção dos flebótomos e baixa carga parasitária no sangue ($r = 0.53$, $p < 0.01$). Em conjunto, estes dados mostram que cães com baixa carga parasitária são capazes de transmitir o parasito, porém a um pequeno número de flebótomos e com uma baixa carga parasitária.

ABSTRACT

In the New World, visceral leishmaniasis (VL) is caused by *Leishmania infantum* and is usually transmitted by *Lutzomyia longipalpis*. Dogs are considered the main urban reservoir of the parasite. Evaluation of the importance of dogs in *Leishmania* transmission in VL is well established. Dogs with different clinical forms of VL have shown to transmit the infection to the sandfly vector, even those with no clinical signs of the disease. Comprehensive studies that correlate transmission and parasite load in different tissues are scarce. Our hypothesis is that dogs with low parasite load in the skin and blood do not transmit the infection to the sandfly vector. We aimed to analyze the correlation between parasite load of dogs with different clinical forms of CVL and transmission to the vector *Lutzomyia longipalpis*. Thirty five dogs were selected from two canine kennels, located in an endemic (n=23) and non-endemic area (n=12) for VL. These animals were classified according to the clinical signs into asymptomatic (no signs; n=12), oligosymptomatic (1-3 signs; n=15) and polysymptomatic (>3 signs; n=8). All the 35 dogs tested positive for at least one of the diagnostic tests: ELISA (n=8), culture in splenic aspirates (n=9) and qPCR for *Leishmania* DNA detection (n=35). Different tissues (blood, splenic aspirate and skin biopsy) were collected for quantification of parasite load using qPCR. To evaluate the infectivity of the dogs to vector, first we performed the xenodiagnosis, then we quantified parasite load in each sandfly using qPCR. Finally, transmission of *Leishmania* was estimated by determining infectivity to sandflies, and the infection rate, and the parasite load transmitted to sandflies. Low parasite load in the skin and blood was detected in approximately 85% of asymptomatic dogs. Infectivity to sandflies varied from 60 to 90%, and shown to be similar among animals presenting different number of clinical signs. It was noted that the highest percentage (51%) of dogs transmitted infection to a small number of sandflies (from 1 to 5 in 30 sandflies used in xenodiagnosis). Positive correlation between infectivity to sandflies and parasite load was only detected in blood among the tissues analyzed ($r = 0.50$, $p < 0.01$). Additionally, a lower parasite load in blood ($r = 0.53$, $p < 0.01$) were correlated to the presence of lower number of positive sandflies in xenodiagnosis. These findings indicate that animals with low parasite load are capable to transmit

Leishmania to sandflies, although to a lower number of sandflies and with a low parasite load.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica grave que acomete cães e outros mamíferos vertebrados, incluindo o homem (Lainson e Shaw, 1979). A LV pode causar surtos epidêmicos de difícil controle, além de apresentar altas taxas de mortalidade. É uma doença que afeta principalmente regiões pobres de países em desenvolvimento. Sabe-se que ela está associada a fatores como a desnutrição, movimentos populacionais em massa, condições precárias de habitação, analfabetismo e baixa imunidade do hospedeiro (Who, 2010). A leishmaniose também está relacionada com as mudanças ambientais, tais como o desmatamento, além de urbanização de novas áreas e migração de pessoas para áreas endêmicas (Who, 2010).

Existem duas principais formas classificadas quanto a características clínicas e epidemiológicas de LV: i) forma zoonótica, que ocorre em nosso país e em alguns países da Europa, afeta principalmente crianças jovens e tem como principal reservatório o cão doméstico; ii) forma antroponótica, que ocorre na Índia, afeta pessoas de todas as idades e é normalmente transmitida de humano para humano via picada do inseto vetor (Who, 1990).

A LV é endêmica em 62 países de quatro continentes, em sua maioria países em desenvolvimento, sendo que 200 milhões de pessoas encontram-se expostas ao risco. A incidência anual está estimada em 500.000 novos casos, concentrados principalmente na Índia, Nepal, Bangladesh, Sudão e Brasil. Além disso, a LV é a causa estimada de 50.000 mortes anualmente (Desjeux, 2004).

Aproximadamente 90% dos casos de LV registrados na América ocorrem no Brasil (Albuquerque *et al.*, 2009). Inicialmente, a LV no Brasil era predominante em áreas rurais e pequenas áreas urbanas. No entanto, há mais de 50 anos ela está se expandindo (Sherlock, 1996) e alcançando áreas urbanas de médio e grande porte (Jeronimo *et al.*, 1994; Bevilacqua *et al.*, 2001). Na década de 90, a maior incidência da doença ocorria na região nordeste com mais de 90% dos casos relatados,

distribuídos principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Entretanto, esse percentual vem diminuindo para 66% dos casos de LV notificados no Brasil, pois vem ocorrendo expansão da doença, surgindo novos casos em outras regiões, como as regiões sudeste e sul (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008). Na última década, a média da incidência anual no País foi de 3.156. Outro fator importante que foi revelado nessa década é a urbanização da doença, ocorrendo surtos nas grandes cidades do Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, mais recentemente, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (Ministério da Saúde, 2006).

1.2 Agente Etiológico

A LV é causada por protozoários tripanosomatídeos que pertencem à classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, podendo ser dividido nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* de acordo com seu desenvolvimento no intestino do vetor (Lainson e Shaw, 1979). O parasito causador da LV pertence ao complexo Donovanii, com duas espécies principais: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum*. De acordo com a taxonomia proposta por Lainson e Shaw (1979), no Novo Mundo, o principal agente causal da LV é a *L. infantum* e, menos frequente, a *Leishmania amazonensis* (Barral *et al.*, 1991). Inicialmente, *L. infantum* era chamada de *L. chagasi*, entretanto estudos mostraram que essas espécies são geneticamente similares (Mauricio *et al.*, 2000).

Leishmania spp. é um protozoário bifásico, que se apresenta em formas distintas e caracterizadas no hospedeiro mamífero e no inseto vetor. No mamífero o parasita encontra-se na forma intracelular obrigatória, aflagelada, denominada amastigota, que se multiplica por divisão binária no interior dos fagolisossomos das células do sistema fagocítico mononuclear (Antoine *et al.*, 1990; Alexander *et al.*, 1999; Kaye e Scott, 2011). Enquanto que a forma denominada de promastigota é a predominante no interior do trato digestório do hospedeiro invertebrado, o inseto

vetor. Esta forma é caracterizada por ser extracelular e apresentar flagelo, estrutura que propicia mobilidade ao parasita (Killick-Kendrick e Killick-Kendrick, 1991). A promastigota de *Leishmania* apresenta dois principais estágios de desenvolvimento, procíclica e metacíclica. A forma promastigota procíclica é caracterizada por apresentar pouca motilidade, flagelo curto e por não ser infectante, enquanto que a promastigota metacíclica é a forma infectante com flagelo alongado e alta motilidade.

O ciclo biológico da *Leishmania* começa quando o inseto vetor inocula na derme do hospedeiro, parasitos na forma de promastigotas metacíclicas (Killick-Kendrick, 1999). O protozoário inoculado na derme do hospedeiro mamífero é, em seguida, fagocitado por macrófagos, onde se transformam em amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos e se reproduzem intracelularmente por divisão binária. Com multiplicação intracelular, a célula infectada pode sofrer ruptura ou realizar exocitose dos protozoários (Rittig e Bogdan, 2000). A partir dessa fase, macrófagos e células dendríticas podem fagocitar as formas amastigotas liberadas no meio extracelular e migrar para os linfonodos de drenagem (Moll, 1993; Muraille *et al.*, 2003). Posteriormente, a disseminação do protozoário poderá ocorrer para diversos órgãos do sistema fagocítico mononuclear (como fígado, baço, medula óssea e linfonodos). Os parasitas presentes na pele e no sangue do hospedeiro infectado poderão ser ingeridos pelos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo, no qual as amastigotas são liberadas das células do hospedeiro mamífero e rapidamente se transformam em promastigotas prociclícas, multiplicando-se ainda no sangue ingerido, envolto por uma matriz peritrófica secretada pelas células do estômago do inseto. Após a digestão do sangue, a matriz peritrófica se rompe e a promastigota coloniza o segmento anterior do intestino do inseto (Lainson *et al.*, 1987; Bates, 2007). Nessa região os parasitos sofrem o processo de metaciclogênese, em que reações bioquímicas ocorrem nas porções glicídicas da molécula do lipofosfoglicano (LPG) que estão ancoradas na membrana da promastigota. Por fim, as promastigotas metacíclicas migram para o esôfago e faringe e são transmitidas ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo do inseto.

1.3 Vetor

As fêmeas de flebotomíneos pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, gênero Phlebotomus (Rondani & Berté, 1840) e Lutzomyia (França, 1924) são os principais responsáveis pela transmissão das leishmanioses no Velho Mundo e no Novo Mundo, respectivamente.

O *Lutzomyia longipalpis* é considerado o principal vetor da LV no Brasil e foi descrito inicialmente por Lutz & Neiva (1912). Essa espécie predomina na fauna flebotomínica das áreas endêmicas para LV nas Américas. A espécie *Lutzomyia cruzi* também foi incriminada como vetor da LV (Galati *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1998) em locais em que não havia a presença de *Lutzomyia longipalpis* e casos de da doença eram notificados. Em alguns focos na Colômbia e Venezuela o *Lutzomyia evansi* é suspeito de ser um importante vetor (Travi *et al.*, 1990; Montoya-Lerma *et al.*, 2003). Outras espécies de flebotomíneos também têm sido sugeridas como vetores potenciais da leishmaniose visceral no continente americano, sendo encontradas infectadas naturalmente, como a *Lutzomyia migonei* (De Carvalho *et al.*, 2010); *Lutzomyia forattinii* (De Pita-Pereira *et al.*, 2008); *Lutzomyia sallesi* e *Lutzomyia neivai* (Saraiva *et al.*, 2009).

1.4 Reservatório Hospedeiro

Existem fortes evidências que mamíferos da família Canidae, principalmente cães (*Canis familiaris*), são os principais reservatórios da forma da leishmaniose visceral zoonótica em regiões urbanas, essas consistem em: i) os cães que são altamente susceptíveis à infecção, apresentam intenso parasitismo cutâneo, e vivem em proximidade ao habitat do homem (Dantas-Torres, 2006); ii) a epidemia canina precede a epidemia humana em centros urbanos, endêmicos para a doença (Bevilacqua *et al.*, 2001; Alvar *et al.*, 2004); iii) a transmissão de *L. infantum* é mantida através de um ciclo entre o cão e o inseto em comunidades urbanas e peri-urbanas (Lanotte *et al.*, 1979; Berrahal *et al.*, 1996); iv) a prevalência canina se mantém alta mesmo em períodos em que a prevalência de casos humanos é baixa (Fraga *et al.*, 2012); v) a leishmaniose visceral canina (LVC) está presente em cerca

de 50 dos 88 países afetados pela LV, sendo os três maiores focos: a bacia do Mediterrâneo, a China e a América do Sul (Alvar *et al.*, 2004).

Além do cão, tem-se estudado a participação de outros animais silvestres e domésticos como reservatórios da LV. Existem estudos que mostraram alta soroprevalência em gatos domésticos (*Felis catus*) naturalmente infectados (Martin-Sanchez *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2008), enquanto que em outros estudos houve baixa detecção de gatos infectados (Sherlock, 1996). Essa discrepância entre os resultados indica que o papel epidemiológico desses animais ainda não está definido e deve ser mais estudado. A infecção em cavalos também já foi notificada (Fernandez-Bellon *et al.*, 2006). No ambiente silvestre, as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) são considerados os principais reservatórios.

1.5 Leishmaniose Visceral Canina

A história natural da doença mostra que cães infectados com *L. infantum* podem progredir para diferentes formas clínicas da infecção, sendo estas as formas sintomáticas ou assintomáticas (Fig. 1). Após a infecção, um grupo de cães pode controlar a proliferação do parasita e curar a infecção, eliminando o parasita. Em uma parcela de cães, a infecção permanece em estado subclínico, sem a presença de sintomas, podendo permanecer nesse estágio durante anos ou até pela vida inteira (Fisa *et al.*, 1999; Quinnell *et al.*, 2001). Alguns cães desse grupo podem apresentar alguma alteração no seu estado de saúde, devido a diversos fatores, como por exemplo, a administração de um fármaco imunossupressor ou uma doença imunossupressora, o que acarretaria na ativação da infecção latente e o desenvolvimento de sinais clínicos. Por fim, existe uma parcela de cães que não possui a capacidade de controlar a progressão da doença e depois de um período de infecção curto, de dois a quatro meses, os sintomas aparecem. Os animais pertencentes ao terceiro grupo são considerados susceptíveis, e os cães dos dois primeiros grupos são denominados resistentes à infecção por *L. infantum* (Cabral *et al.*, 1998).

A progressão da doença está relacionada com o tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro. Existem dois principais padrões de resposta imunológica adquirida estudados na LVC, o do tipo T *helper* 1, induzido por IL-12, citocina que ativa a resposta celular mediada por células T CD4+, com produção aumentada de IFN- γ e IL-2, enquanto que o padrão de resposta T *helper* 2 estimula a resposta imune humoral, com produção de imunoglobulinas, por meio da produção

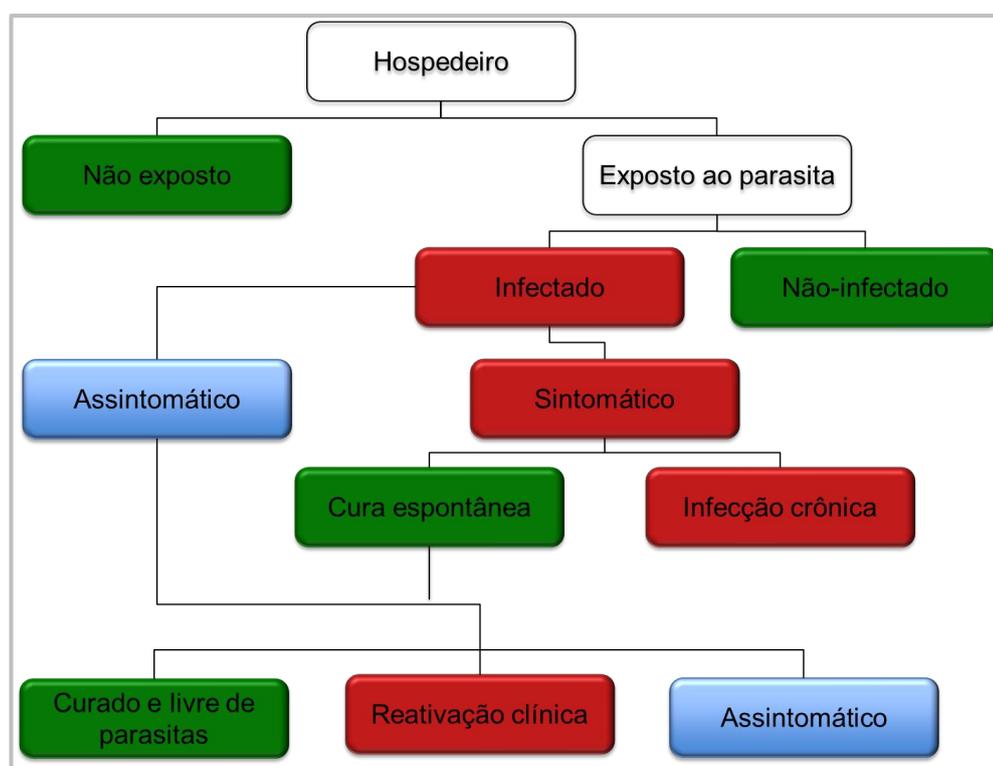


Figura 1 - História natural da leishmaniose canina. Os diferentes tipos de resposta após a picada de flebotomíneos infectados por *Leishmania* são indicados: cães saudáveis e não infectados (verde), sintomáticos (vermelho) e assintomáticos (azul). Os fatores responsáveis pela manutenção dos cães na forma assintomática ou a evolução da doença não são claros. Modificado de Solano Galego, 2009.

das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Estudos mostraram que a resposta imunológica na LVC é caracterizada por uma resposta mista entre o perfil de resposta Th1 e Th2, e que o controle da replicação do parasito, a progressão da doença ou a cura é determinado pelo balanço entre essas duas respostas. É descrito que a imunidade específica mediada por células T CD4+ parece ser capaz de promover o controle da infecção e manter o animal assintomático. Pinelli e colaboradores (1994) demonstraram que linfócitos de cães resistentes são capazes de proliferar, produzir IL-2, IFN- γ e TNF- α , citocinas da resposta Th1, induzindo a ativação da resposta

anti-*Leishmania* em macrófagos. Esses cães apresentam hipersensibilidade cutânea tardia, após estimulação por extrato de antígenos de *Leishmania*. Por outro lado, a susceptibilidade à doença está relacionada com um aumento da resposta humoral e diminuição da resposta celular (Alvar *et al.*, 2004; Baneth *et al.*, 2008). Na transição do estado assintomático para o sintomático, ocorre supressão da resposta proliferativa de linfócitos (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1999; Rhalem *et al.*, 1999). Assim, cães sintomáticos apresentam uma significativa redução no nível de células T CD4+ com baixa resposta linfoproliferativa à fração solúvel do extrato de antígeno de *Leishmania in vitro* (Moreno *et al.*, 1999), ativação policlonal de linfócitos B pelos antígenos parasitários e altos títulos de anticorpos específicos (Gradoni, 2001). Existem diversas evidências de correlação positiva entre a sintomatologia manifestada por cães naturalmente infectados, níveis de citocinas produzidas e carga parasitária (Manna *et al.*, 2006).

1.5.1 Prevalência da infecção canina

A prevalência da infecção canina varia conforme a presença de diversos fatores, tais como a ecologia e as condições climáticas que determinam a abundância do vetor. Quando estão presentes condições favoráveis para a transmissão da doença, tais como grande quantidade de inseto vetor e alta densidade do hospedeiro canino, a infecção espalha-se rapidamente e extensivamente entre indivíduos da população canina (Quinnell *et al.*, 1997; Oliva *et al.*, 2006). Um estudo de coorte avaliou a exposição de um grupo de cães não infectados durante três temporadas de transmissão em Nápoles, Itália, demonstrando que no final do estudo, a maior parte dos cães se tornaram positivos na PCR de medula óssea e na sorologia. Essa alta prevalência da infecção foi atribuída à alta densidade do vetor *Phlebotomus perniciosus* e à ausência de medidas de controle da população flebotomínea e dos casos caninos (Oliva *et al.*, 2006). Estudos recentes reforçam o dado de que a infecção nos cães em regiões endêmicas é generalizada, afetando uma grande parte da população. No entanto, nem todos os cães infectados desenvolvem a doença (Fisa *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2001). Dessa forma, estudos epidemiológicos utilizando técnicas de

biologia molecular nas áreas onde a LVC é endêmica demonstraram que a prevalência da infecção canina por *Leishmania* é consideravelmente maior, podendo alcançar taxas entre 60 a 80% conforme o tipo e a quantidade de tecidos avaliados, em relação à avaliação feita por testes sorológicos da doença, e que a maior parte dos cães infectados não apresentavam sinais clínicos (Berrahal *et al.*, 1996; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Alvar *et al.*, 2004). Por sua vez, a soroprevalência da infecção está estimada entre 5 a 37% (Fisa *et al.*, 1999; Sideris *et al.*, 1999). É provável que a menor prevalência nos testes sorológicos ocorra devido à baixa positividade nos cães clinicamente saudáveis. Um estudo realizado na Grécia mostrou que um grupo de 73 cães clinicamente saudáveis, 12,3% testaram positivos na sorologia, enquanto que 63% eram positivos na PCR de medula óssea (Leontides *et al.*, 2002). Como revisado por Baneth e colaboradores (2008), esses dados evidenciam que na Europa cães apresentando doença clínica em áreas endêmicas são apenas a ponta de um iceberg, e que a maioria dos cães expostos tornam-se infectados sem mostrar evidência clínica da doença e produção de anticorpos detectáveis. Entretanto, no Brasil a distribuição da doença nos cães errantes e semi-domiciliados difere do padrão europeu, pois devido às piores condições nutricionais e a co-infecção com outros agentes patogênicos há um maior percentual de cães com evidência clínica da infecção (Coura-Vital *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2012).

1.5.2 Patogênese da LVC

A infecção por *L. infantum* em cães apresenta semelhanças à infecção no homem. No entanto, os cães apresentam alta frequência de lesões de pele é alta e a distribuição do parasita é extensa, enquanto que no homem o parasito se encontra principalmente na medula óssea, fígado e baço (Longstaffe e Guy, 1986; Swenson *et al.*, 1988).

Após a picada do inseto vetor no cão, os parasitas são inoculados e rapidamente distribuídos por via hematogênica ou linfática para o baço e linfonodo, respectivamente, podendo alcançar, posteriormente, o rim e o fígado. Em seguida, o parasita pode se disseminar para os órgãos reprodutivos, pele, bexiga, trato digestório e respiratório (Molyneux e Ashford, 1983; Benderitter *et al.*, 1988).

A presença de parasitos em diversos tecidos e órgãos do hospedeiro geram reações inflamatórias que produzem lesões, responsáveis por sinais característicos da LVC. Estas reações resultam em infiltração celular nos tecidos, que se distribuem para áreas cada vez mais extensas, causando alteração progressiva e desequilíbrio funcional dos órgãos afetados, tais como pele, fígado e baço (Bourdeau e Groulade, 1988). Também ocorre produção da resposta humoral, que se inicia com a estimulação policlonal de linfócitos B (Galvao-Castro *et al.*, 1984; Bunn-Moreno *et al.*, 1985), produzindo uma alta concentração de γ -globulinas, incluindo imunoglobulinas específicas e não específicas (Persechino e Oliva, 1986). Por fim, há a formação e deposição de imunocomplexos, compostos principalmente por IgG e as frações C₁, C₂ e C₄ do complemento, em diferentes regiões do organismo, ocorrendo principalmente nos rins (Benderitter *et al.*, 1988; Costa *et al.*, 2003).

As alterações encontradas em pele de cães como, dermatite esfoliativa, ulcerativa, nodular e pustular são associadas a diferentes respostas imunológicas. Fondevila e colaboradores (1997) correlacionaram à presença de células de Langerhans e queratinócitos expressando a molécula de MHC classe II, além de macrófagos, linfócitos T e fibroblastos com os aspectos dermatológicos encontrados. Em cães susceptíveis a resposta na lesão nodular ocorre sem a presença de células apresentadoras de antígenos e com grande quantidade de macrófagos infectados (Fondevila *et al.*, 1997). No entanto, essas lesões encontradas na pele de cães infectados não necessariamente seriam provocadas por uma resposta inflamatória à presença de parasitos, pois na pele de cães assintomáticos também são encontrados um grande número de parasitos (Solano-Gallego *et al.*, 2004).

Nos órgãos linfoides ocorre a proliferação de linfóhistioplasmocitário, resultando em linfadenomegalia. No baço, a LVC causa desorganização da polpa branca, com poucos linfócitos em torno da veia central. Adicionalmente, ocorre aumento da celularidade de monócitos e macrófagos na polpa vermelha, mudanças na estrutura microvascular com aumento das vênulas, veias e fibras reticulares (Santana *et al.*, 2008). No fígado de animais infectados, o aspecto morfológico evidencia presença do infiltrado inflamatório e formação de granulomas, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupfer (Tafari *et al.*, 1996).

A patogenia da leishmaniose é influenciada por diversos fatores inerentes ao hospedeiro, tais como sua predisposição genética e resposta imunológica. Também tem papel importante, fatores relacionados ao parasito, havendo diferenças entre as espécies e sua fase de desenvolvimento, o que pode influenciar na capacidade da *Leishmania* de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Sacks *et al.*, 1990). Adicionalmente, fatores inerentes ao vetor, como sua capacidade vetorial e exposição contínua do hospedeiro mamífero à saliva devido a repetidas picadas do inseto vetor (Courtenay *et al.*, 2002; Moreno e Alvar, 2002; Vinhas *et al.*, 2007) também são importantes no desfecho da infecção.

1.5.3 Manifestações clínicas

LVC é uma doença sistêmica com manifestações clínicas variáveis devido às diferentes respostas individuais dos cães, resultando em várias formas clínicas (Ciaramella *et al.*, 1997; Rallis *et al.*, 2005). Em uma parcela dos cães, os sinais clínicos não aparecem até um ou dois anos após a infecção, denominado período pré-patente da infecção (Oliva *et al.*, 2006). Mais de 50% dos animais soropositivos e 80% dos animais infectados permanecem assintomáticos durante o período pré-patente da infecção, e podem nunca virem a apresentar sinais clínicos ou até mesmo a eliminar o parasito (Abranches *et al.*, 1991; Cabral *et al.*, 1992; Solano-Gallego *et al.*, 2001).

Alguns dos sinais clínicos de cães com LVC não são específicos da doença, tais como a hipertermia, apatia, astenia, alteração do apetite, polidipsia e perda de peso. Enquanto que outros sinais são característicos da doença, tais como lesões cutâneas, principalmente, descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações (Ciaramella *et al.*, 1997). Outros sinais clínicos das fases mais adiantadas da doença são: hipertrofia dos linfonodos, com um aumento no tamanho e consistência, o que facilita a palpação dos mais superficiais, como o poplíteo e os submandibulares (Abranches *et al.*, 1991); onicogribose; edema dos coxins plantares; alopecia localizada; e dermatite periocular e nasal que podem rapidamente disseminar-se para outras regiões do corpo do animal; hepatomegalia;

intensa esplenomegalia (Slappendel, 1988). Hiperceratoose, ulcerações cutâneas, ceratoconjuntivite também são achados nos animais acometidos (Ciaramella *et al.*, 1997).

Nas fases avançadas da doença, os cães podem adicionalmente apresentar paresia das patas posteriores, caquexia e inanição. A lesão renal devido ao acúmulo de imunocomplexos é associada à lesão glomerular e morte (Benderitter *et al.*, 1988; Solano-Gallego *et al.*, 2001).

As manifestações clínicas da LVC são acompanhadas por alterações laboratoriais, tais como as alterações hematológicas, caracterizadas por anemia normocítica e normocrômica, trombocitopenia e leucopenia (Abranches *et al.*, 1991). As alterações bioquímicas mais comumente associadas à doença são o aumento das proteínas totais do soro, com inversão da taxa albumina/globulina e aumento da fração gama. Efetivamente, na eletroforese de proteínas observa-se um decréscimo significativo na concentração de albumina e um aumento combinado de β e γ globulinas (Burillo *et al.*, 1994).

1.5.4 Carga parasitária nos tecidos de cães infectados

Outro parâmetro avaliado que pode ajudar na melhor compreensão de aspectos relacionados à progressão da infecção por *L. infantum* em cães é a determinação da carga parasitária em diferentes tecidos do hospedeiro. Estudos evidenciaram que existe associação positiva entre a intensidade da infecção no baço, fígado, medula óssea e esfregaço de pele e o estado clínico do animal (Sanchez *et al.*, 2004; Reis, Martins-Filho, *et al.*, 2006). A carga parasitária tem sido associada ao padrão de resposta inflamatória granulomatosa em cães com LV (Dos-Santos *et al.*, 2004).

Recentemente, Reis e colaboradores (2006) demonstraram que os tecidos com a maior quantidade de parasitas são a pele e o baço. A pele é o local em que ocorre o primeiro contato entre o parasito e o hospedeiro (Giunchetti *et al.*, 2006). A pele foi considerada por Abranches e colaboradores (1991) um importante reservatório para parasitos em cães infectados, saudáveis e doentes, além de ter um importante papel na transmissão da LV, pois a alta carga do parasito é acessível ao

vetor flebotomíneo (Deane e Deane, 1962). O baço é o principal local de células linfoides interpostos na corrente sanguínea e representa um importante órgão no combate à infecção (Reis, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2006). O sangue é um importante tecido na LVC, pois está envolvido diretamente na transmissão do parasito, processo que ocorre durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, além de ser uma das vias de disseminação do parasito para outros órgãos. Entretanto estudos demonstraram que a carga parasitária neste tecido é baixa quando comparado a tecidos como baço, linfonodo e pele (Manna *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2008).

Uma abordagem para quantificação da carga parasitária nos tecidos foi introduzida em um modelo de rato infectado por *L. infantum* (Bretagne *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 2002), e foi baseada no uso da PCR quantitativa *em tempo real* (qPCR), visando amplificação de sequências específicas de DNA do parasito.

1.6 Transmissão

A LV é considerada uma doença dinâmica e as circunstâncias de transmissão estão mudando continuamente devido aos impactos ambientais e demográficos provocados pelo homem (Gramiccia, 2011).

A transmissão do parasito causador da LV entre animais silvestres ou domésticos e o homem, em países do Velho Mundo, ocorre através da picada do flebótomo das espécies *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi* e *P. neglectus*, enquanto que no Novo Mundo, ocorre principalmente através da picada do flebótomo das espécies *L. longipalpis* ou *L. cruzi* (Grimaldi *et al.*, 1989; Dos Santos *et al.*, 1998) (WHO, 1990).

A transmissão via flebotomíneos tem um papel central na manutenção da infecção por *L. infantum*. Entretanto, casos autóctones de transmissão têm sido relatados em localidades em que os flebotomíneos não são encontrados (Harris, 1994). Carrapatos e pulgas foram avaliados como potenciais vetores de *Leishmania*, porém não foram encontradas evidências de transmissão entre cães através do carrapato, nem da ocorrência da metaciclogênese nos carrapatos (Coutinho *et al.*, 2005; Coutinho e Linardi, 2007). A transmissão vertical (transplacetária) tem sido

apontada como responsável pela transmissão da infecção entre os cães de caça nos EUA, que ocorreu na ausência de vetores flebotômicos (Duprey *et al.*, 2006; Boggiatto *et al.*, 2011). Recentemente, a transmissão venérea tem sido relatada em cães (Da Silva *et al.*, 2009). Entretanto, a transmissão através de vias sem a presença do vetor flebotômico provavelmente apresenta pouca importância na manutenção da doença em regiões endêmicas (Quinnell e Courtenay, 2009).

1.7 Medidas de controle da transmissão da *L. infantum*

No Brasil, o controle da transmissão da *L. infantum* é centrado na redução da população flebotômica e nas medidas de combate ao reservatório (diagnóstico e eutanásia de cães soropositivos). O controle vetorial é realizado por meio de duas medidas, atividades de saneamento ambiental e a aplicação residual de inseticida. As atividades de saneamento ambiental visam reduzir os locais prováveis de criação do vetor, ou do seu repouso. Estas ações estão embasadas no manejo do ambiente por meio da retirada de matéria orgânica em decomposição no peridomicílio, poda de galhos e arbustos (Manual de Leishmaniose Visceral, 2006). Outras medidas existentes são o diagnóstico e tratamento de casos humanos, além de atividades de educação em saúde, entretanto o impacto dessas medidas na transmissão é baixo quando utilizadas na ausência das medidas de controle do vetor e reservatório (MANUAL DE LEISHMANIOSE VISCERAL, 2006; WHO, 2010).

O aumento da incidência da leishmaniose visceral no Brasil e em outros países sugere que as medidas de controle existentes não têm sido eficazes (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008; Antoniou *et al.*, 2009). Uma série de razões têm sido sugeridas para explicar a ineficácia das medidas de controle, dentre elas, as dificuldades operacionais e logísticas, o papel potencial das vias de transmissão que não envolva os flebótomos e sim algum hospedeiro reservatório adicional (Dantas-Torres, 2006; Coutinho e Linardi, 2007). Modelos matemáticos sugerem que o controle do vetor e a vacinação de cães seriam mais eficazes no controle da transmissão do que a eliminação de cães (Dye, 1996). Atualmente no Brasil existem duas vacinas disponíveis para comercialização, Leish-Tec® e Leishmune®, no entanto para que sejam implementadas como uma medida de saúde pública são necessários estudos que demonstrem a capacidade da vacina bloquear a transmissão do parasito em

cães vacinados e que estes possam ser distinguidos dos cães naturalmente infectados pelos métodos diagnósticos oficiais recomendados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2007). O tratamento de cães infectados geralmente não é curativo (Baneth e Shaw, 2002) e, após um rápido período, o cão volta a transmitir o parasito (Alvar *et al.*, 2004), não sendo permitido no Brasil.

A prática da eutanásia canina é recomendada pelo MS do Brasil a todos os animais soropositivos. As técnicas sorológicas podem apresentar falhas no diagnóstico da infecção no cão, pois a amostra sérica pode ter sido obtida no período que antecede a soroconversão e alguns animais podem não produzir ou produzir anticorpos específicos apenas transitoriamente (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; Oliva *et al.*, 2006). Assim, muitos animais naturalmente infectados podem deixar de ser identificados. Recentemente, a PCR convencional para detecção de DNA do parasito vem sendo substituída pela qPCR no diagnóstico e acompanhamento de doenças causadas por parasitos como *Leishmania* spp. (Bretagne *et al.*, 2001). Essa técnica é mais sensível e reprodutível, além de permitir a determinação da carga parasitária em amostras clínicas (Bretagne *et al.*, 2001; Bossolasco *et al.*, 2003). O uso desta técnica pode ajudar na identificação de cães naturalmente infectados que não são diagnosticados pelo uso das técnicas sorológicas, para que assim possa ser avaliada a importância desses cães na epidemiologia da doença.

1.8 Infectividade dos cães em relação vetor *Lutzomyia longipalpis*

Xenodiagnóstico é um método para diagnóstico da LVC e pode ser usado para avaliar as taxas de transmissão em cães com as diferentes formas clínicas da doença (Molina *et al.*, 1994). Embora não seja uma técnica rotineira, devido a dificuldades na obtenção de flebótomos, o xenodiagnóstico pode ser uma ferramenta útil em estudos epidemiológicos, fornecendo informações sobre a infectividade dos cães, que é a capacidade destes em transmitir o parasito ao vetor, sendo importante no acompanhamento de cães após o tratamento (Ribeiro *et al.*, 2008; Miro *et al.*, 2011). Para melhorar a eficiência da técnica, ferramentas moleculares como a PCR e a qPCR vêm sendo utilizadas para detecção e quantificação do parasito no inseto vetor (Ranasinghe *et al.*, 2008).

A literatura se mostra controversa em relação à infectividade nos grupos de cães assintomáticos e sintomáticos. Estudos realizados em cães apresentando as diferentes apresentações clínicas da infecção (assintomático, oligossintomático e polissintomático), na Europa e América do Sul, mostraram que existe uma alta proporção de cães que são infectivos, e estes são capazes de infectar um grande número de flebótomos (Molina *et al.*, 1994; Guarga *et al.*, 2000; Courtenay *et al.*, 2002). Estudos de Verçosa e colaboradores (2008) e Travi e colaboradores (2009) mostraram que apenas os cães sintomáticos transmitem a infecção, enquanto que outros trabalhos como o de Michalsky e colaboradores (2007), Molina e colaboradores (1994) e Courtenay e colaboradores (2002) encontraram resultados diferentes, mostrando que existe um número maior de cães sintomáticos transmitindo o parasito em relação aos cães assintomáticos, indicando que as duas formas clínicas da infecção apresentam papel na transmissão do parasito em regiões endêmicas para doença.

Existem fortes evidências no Brasil que a maioria dos cães assintomáticos e infectivos estão em um estágio pré-patente da infecção, portanto provavelmente desenvolveram a doença (Courtenay *et al.*, 2002). Courtenay e colaboradores (2002) demonstraram que cães assintomáticos que não progrediram para doença clínica contribuem muito pouco para a transmissão em comparação aos cães sintomáticos e os cães assintomáticos no estágio pré-patente. Também foi demonstrado que a transmissão estaria positivamente associada com a gravidade clínica, alta resposta de anticorpos anti-parasita e baixa contagem de células T CD4⁺ (Guarga *et al.*, 2000; Courtenay *et al.*, 2002; Da Costa-Val *et al.*, 2007). No entanto, essas correlações clínicas e imunológicas não fornecem um teste sensível para avaliação da transmissão (Courtenay *et al.*, 2002). Um marcador mais específico pode ser fornecido pela carga parasitária na pele e no sangue. Entretanto, existem poucos estudos comparando a infectividade de cães e a detecção do parasita em biópsias de pele, e até agora estes estudos não conseguiram correlacionar a presença de *Leishmania* na pele de cães e a transmissão ao vetor (Travi *et al.*, 2009). A avaliação mais precisa da carga parasitária da pele e outros tecidos usando qPCR pode ser mais informativa para compreensão da transmissão do parasito.

2 JUSTIFICATIVA

O estudo da epidemiologia da infecção causada por *L. infantum* no cão doméstico é essencial para o plano de controle da LV. No Brasil a soroprevalência da doença pode alcançar 23% em determinadas regiões (Paranhos-Silva *et al.*, 1996). Entretanto, existe uma parcela de cães naturalmente infectados que não são diagnosticados pelos testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde em inquéritos epidemiológicos, pois tais métodos não permitem a detecção de cães infectados que não soroconverteram, ou aqueles cães soropositivos que converteram para soronegativos, mesmo ainda estando infectados (Pinelli *et al.*, 1994; Quinnell *et al.*, 1997). Estudos mostraram que a prevalência da infecção na população canina avaliada por testes moleculares em áreas endêmicas para a doença é alta, podendo chegar a aproximadamente 80% em regiões na Europa (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Leontides *et al.*, 2002) e 59% em regiões do Brasil (Bigeli *et al.*, 2012). A diferença entre as prevalências dos testes moleculares e sorológicos ocorre devido a maior sensibilidade dos testes moleculares, e indica a existência de uma população de cães soronegativa, mesmo estando infectada. Sendo assim esta população de cães não é identificada, não ocorrendo à eutanásia de acordo com as medidas de controle da LV preconizadas pelo MS. Solano-Gallego e colaboradores (2001) evidenciaram que grande parte dos cães infectados e soronegativos de área endêmica são assintomáticos. Adicionalmente já foi demonstrado em diversos trabalhos que cães assintomáticos participam na transmissão da infecção ao vetor, apesar desta ocorrer em menor frequência quando comparado aos cães sintomáticos (Molina *et al.*, 1994; Courtenay *et al.*, 2002; Michalsky *et al.*, 2007). Estudos avaliando a importância de cães assintomáticos e soronegativos na transmissão da doença não foram realizados de forma sistemática, e podem ajudar a melhor compreender a epidemiologia da doença, assim como estabelecer medidas de controle da doença mais eficazes.

Estudos avaliando a transmissão do parasito demonstraram que as manifestações clínicas de cães, assim como a grande quantidade de anticorpos anti-parasito apresentam associação positiva com a transmissão pelo vetor flebotomíneo,

Lutzomyia longipalpis (Guarga *et al.*, 2000; Courtenay *et al.*, 2002; Da Costa-Val *et al.*, 2007). No entanto, tais parâmetros não conseguem diferenciar cães infectivos de não infectivos. Um marcador mais preciso para avaliação da infectividade de cães pode ser fornecido pela carga parasitária na pele e no sangue, tecidos presentes no contato entre o vetor flebotomíneo e o hospedeiro vertebrado no momento da transmissão do parasito. Estudos comparando a infectividade de cães e a detecção do parasita em biópsias de pele são poucos e até agora não mostraram correlação da transmissibilidade ao vetor e a quantidade de parasitos na pele de cães (Travi *et al.*, 2009). Para avaliação mais precisa da carga parasitária nestes tecidos a utilização da qPCR pode ser mais informativa.

Foi demonstrado que flebotomíneos são capazes de apresentar alta carga parasitária quando infectados com *Leishmania* em condições experimentais (Ranasinghe *et al.*, 2008; Bezerra-Vasconcelos *et al.*, 2011), e que estes podem transmitir um número elevado de parasito em modelo experimental (Kimblin *et al.*, 2008). Em condições naturais a quantidade de parasitos transmitidos ao vetor flebotomíneo, a partir de cães naturalmente infectados não é conhecida. Esse conhecimento vai permitir avaliar a capacidade de cães em transmitir a infecção.

A hipótese desse estudo é que cães com baixa carga parasitária na pele e no sangue não transmitem a infecção ao vetor flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*.

Desta forma, este trabalho visa correlacionar quantidade de DNA de *Leishmania* em tecidos envolvidos na transmissão, de cães naturalmente infectados, com distintas formas clínicas da infecção e a carga parasitária transmitida a flebótomos utilizando como ferramenta o xenodiagnóstico.

3 OBJETIVO GERAL

Correlacionar a infectividade ao vetor *Lutzomyia longipalpis* e a carga parasitária em tecidos envolvidos na transmissão de cães naturalmente infectados

3.1 ESPECÍFICOS

- ✓ Classificar cães com resultados positivos para leishmaniose visceral canina em pelo menos um dos testes diagnósticos conforme o número de sinais clínicos
- ✓ Determinar a carga parasitária nos tecidos de pele, sangue periférico e aspirado esplênico coletados de cães naturalmente infectados
- ✓ Determinar a carga parasitária em flebótomos utilizados no xenodiagnóstico de cães naturalmente infectados
- ✓ Avaliar a capacidade de transmissão da infecção determinando a infectividade de cães ao vetor flebotomíneo e a taxa de infecção dos flebótomos utilizados no xenodiagnóstico
- ✓ Correlacionar à carga parasitária determinada nos tecidos de cães naturalmente infectados e a capacidade de transmissão ao vetor
- ✓ Correlacionar a carga parasitária nos tecidos de cães naturalmente infectados com a carga parasitária dos flebótomos infectados no xenodiagnóstico

4 MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

No presente estudo, todos os experimentos envolvendo cães foram realizados conforme a lei federal brasileira de experimentação animal (lei 11794), com o guia de experimentação animal da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Fiocruz, 2008) e seguindo as instruções do manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral do MS. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, protocolo 015/2009) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) – FIOCRUZ/BA. Os proprietários de todos os animais foram informados a respeito da LV, seus riscos para a saúde e descrevendo a sintomatologia mais comum produzida por esta enfermidade.

4.2 População do estudo

Foram selecionados 35 cães domiciliados e de canis de regiões do estado da Bahia, sem raça definida, de diferentes idades. Os cães foram selecionados a partir de um estudo de corte transversal. Como critério de inclusão foi considerado o diagnóstico positivo para LVC em algum dos testes diagnósticos, imunológico, ELISA *in house*, parasitológico, cultura ou qPCR das amostras de aspirado esplênico, pele e sangue periférico.

Uma ficha clínica foi preenchida com dados clínicos dos cães sobre a condição geral de saúde, ou seja, o estado geral e nutricional, a presença de ectoparasitas ou sinais clínicos de anormalidades concorrentes, além de presença de sintomatologia para LVC com dados de exame de pele, ouvidos, coxins, anexos cutâneos, boca, olhos, linfonodos poplíteos, axilares e retro-mandibulares, região inguinal e perineal. Os sinais clínicos avaliados no estudo e mais comumente associados à LVC foram: perda de peso, alopecia, lesões cutâneas, conjuntivite, onicogribose e linfadenopatia. De acordo com Mancianti e colaboradores (1988), os

cães selecionados foram classificados quanto à presença ou ausência de sinais clínicos, sendo considerados assintomáticos (sem nenhum sinal clínico da infecção), oligossintomáticos (de um a três sinais clínicos da infecção) e polissintomáticos (com mais de três sinais clínicos da infecção). Como controle negativo foi utilizado um total de 20 cães originários do município de Pelotas, área não endêmica de LVC no Rio Grande do Sul (RS).

4.3 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de sangue em um volume mínimo de 5 ml por punção da veia cefálica, tibial ou jugular. O sangue foi coletado em dois tubos estéreis, sendo um sem EDTA para obtenção de soro e outro com EDTA para sangue total. Estes tubos foram conservados em temperatura de refrigeração até o processamento. Os tubos sem EDTA foram centrifugados a 1.200 x g durante 15 minutos para obtenção de soro. Estes foram aliqüotados e identificados em tubos contendo 1,5 ml das amostras e, em seguida, armazenadas à -80°C, sendo, posteriormente, utilizados na realização dos exames sorológicos. As amostras de sangue total, presentes nos tubos com EDTA, foram aliqüotadas, identificadas e congeladas à -20°C, para posterior extração de DNA e realização de qPCR.

As amostras de tecido esplênico foram obtidas pela técnica de punção descrita por Barrouin-Melo e colaboradores (2006) e modificada para efetuar a coleta guiada por um aparelho portátil de ultrassom. Apenas foram sedados os cães que apresentavam comportamento agressivo. As amostras foram aliqüotadas, identificadas e congeladas em freezer à -80°C no CPqGM/FIOCRUZ, posteriormente, sendo submetidas à extração de DNA e realização de qPCR.

Adicionalmente, os cães foram submetidos à biópsia de pele sadia, na região da pina da orelha, pela técnica de punção, utilizando-se um *punch* de 4 mm de diâmetro. Este procedimento foi realizado com o uso de lidocaína 2% com vasoconstritor no local da biópsia. O fragmento do tecido coletado foi armazenado em tubo de 1,5 mL, identificado e mantido em gelo, e, posteriormente, congelado em freezer a -80°C no CPqGM/FIOCRUZ para extração de DNA e realização de qPCR.

4.4 Análises laboratoriais

As amostras foram processadas no laboratório do CPqGM segundo as especificações de cada técnica. Foram realizados exames de qPCR, ELISA e cultivo parasitológico.

4.4.1 ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

Antígeno de SLA (antígeno solúvel de *Leishmania*) de *L. infantum* foi distribuído na concentração de 3,125 µg/µL diluído em tampão carbonato (0,06 M, pH 9,6) em um volume de 100 µL em poços de placas 96 poços de microtitulação de fundo chato (Cliniplate-Labsystem). Essa concentração de antígeno foi escolhida a partir de ensaios preliminares usando soros de cães naturalmente infectados. Para o bloqueio das reações inespecíficas foi utilizada solução de PBS-0,05% Tween 20 (PBST) e 4mg/mL de albumina bovina sérica (BSA) por 1 h a 37°C. Após três lavagens com PBST, 100 µL das amostras de soros caninos, diluídas de 1:800 em PBST contendo BSA (4mg/mL), foram incubadas por 1 h a 37°C. As placas foram lavadas com PBST três vezes, e, em seguida, incubadas com solução de anticorpo conjugado [Peroxidase AffiniPure Rabbit Anti-Dog IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch] na diluição de 1:10.000 por 1 hora a 37°C. A reação foi revelada no escuro com 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB - Sigma Aldrich) na presença do substrato peróxido de hidrogênio a 30% (H₂O₂) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Por fim, a reação foi parada com a adição de H₂SO₄ na concentração de 4M. A densidade óptica foi lida no comprimento de onda de 450nm no espectrofotômetro (SpectraMax 340PC, Molecular Devices). A reação foi realizada conforme descrito por dos Santos e colaboradores (1996). Todas as amostras foram feitas em duplicata. O ponto de corte foi calculado para cada placa pela média dos valores de absorvância (D.O.) + 2 desvios padrão (DP) do resultado de ELISA utilizando soros de cães de áreas endêmicas e não endêmicas, controles negativos por cultura e qPCR de amostras de aspirado esplênico.

4.4.2 Cultivo do parasita

As amostras de aspirado esplênico coletadas assepticamente no campo foram armazenadas refrigeradas até serem processadas no laboratório. O aspirado esplênico foi cultivado em meio MacNeal–Nicolle (NNN), ágar sangue e meio Schneider suplementado com SBF 20% (Soro Fetal Bovino – Gibco BRL, Nova York, USA) e gentamicina a 100µg/mL para evitar contaminações (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Barrouin-Melo *et al.*, 2006). O material foi incubado na estufa a 24°C. As culturas foram examinadas semanalmente durante um mês para verificação da presença do parasito.

4.4.3 Extração de DNA dos Tecidos

As amostras coletadas, tecido esplênico, biopsia de pele e sangue total, foram submetidas a um processo de extração de DNA para posterior realização de qPCR. A extração foi realizada usando o *kit* DNeasy Blood & Tissue da Qiagen (Hilden, Alemanha). Amostras de aspirado esplênico ou de sangue total em um volume de 200 µL, e um fragmento de pele de 4 mm foram processadas de acordo com os procedimentos estabelecidos no protocolo do *kit*. Uma vez extraído, a concentração e a qualidade das amostras foram determinadas usando o espectrofotômetro digital (Nanodrop® ND-1000 Thermo Scientific, Wilmington, USA). Posteriormente, foram feitas alíquotas das amostras na concentração de 30 ng/µL e estocadas no freezer -20°C até o seu uso.

4.4.4 Extração de DNA dos flebotomíneos

As fêmeas *Lutzomyia longipalpis* utilizados no xenodiagnóstico foram individualmente transferidos para tubos de 1,5 mL de fundo oval. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Michalsky e colaboradores (2007) modificado. Para obtenção de extratos de DNA de flebótomos fêmea foram individualmente macerados com o uso de um pistilo plástico (Sigma Aldrich, St

Louis, Missouri, USA) autoclavado, em tubos de 1,5 mL contendo 50 µL de tampão de lise celular (100mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS, pH 8,0) contendo 10 µL de uma solução de proteinase K a 1 mg/mL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) incubados em banho-maria por um período de 16 a 18 h a 37°C. Ao final do período de incubação, foram adicionados aos extratos de DNA: 70 µL de água miliQ ultrapura e 120 µl de fenol saturado em tampão (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA). Em seguida, esses extratos foram homogeneizados e centrifugados a 18.500 x g durante 5 min à temperatura ambiente. Os sobrenadantes obtidos foram homogeneizados em 120 µl de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), seguido de centrifugação por 5 min a 18.500 x g. As amostras de DNA obtidas foram precipitadas em 200 µl de etanol absoluto gelado e 20 µl de acetato de sódio (3M, pH 5.2) *overnight* a -20°C e, posteriormente, centrifugadas a 18.500 x g por 20 min. Os sobrenadantes foram então descartados e os *pellets* lavados por centrifugação com 100 µl de etanol absoluto e submetidos a uma última centrifugação a 18.500 x g por 20 min. Os sobrenadantes obtidos foram descartados e os tubos mantidos à temperatura ambiente para secagem do restante de álcool presente na parede no tubo. As amostras de DNA foram ressuspensas em 30 µl de tampão Tris-EDTA 1X (TE). Posteriormente, a concentração das amostras foi determinada usando o espectrofotômetro digital (Nanodrop® ND-1000 Thermo Scientific, Wilmington, USA). Por fim, as amostras de DNA foram aliquotadas na concentração de 10 ng/µL e estocadas no freezer -20°C até o seu uso.

4.5 PCR quantitativa (qPCR)

4.5.1 Quantificação de *Leishmania* kDNA

A PCR quantitativa foi utilizada para determinar a quantidade de DNA do parasita nas amostras de tecidos dos cães e dos flebótomos utilizados no xenodiagnóstico. Os ensaios de qPCR realizados foram baseados no protocolo descrito por Francino e colaboradores (2006). O alvo da reação é uma região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum* que

amplifica um fragmento de 120 pares de base (bp). As reações foram realizadas em um volume final de 25 μL , consistindo de 5 μL de DNA em uma concentração de 30 ng/ μL (para os tecidos dos cães) ou 10 ng/ μL (para os flebótomos) e 20 μL de mistura de qPCR, que consiste em: 12,5 μL da Mastermix Universal (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), *primer forward* 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3' (Leish-1) e *primer reverse* 5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3' (Leish-2), ambos em uma concentração final de 900 nM, uma sonda fluorogênica 5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3' que foi sintetizada junto com uma molécula FAM *reporter* ligado à extremidade 5', assim como um MGB-QNQ *quencher* ligado à extremidade 3' (Perkin-Elmer Applied Biosystems), em uma concentração final de 200 nM. A quantificação de DNA de *Leishmania* foi realizada utilizando-se um método absoluto com base na comparação dos valores do *threshold* Cycle (CT) em relação aos valores de Ct da curva padrão construída a partir de diluições seriadas de 10 vezes de DNA de *Leishmania* extraído a partir de culturas axênicas de promastigotas com 10^5 até 10^{-1} parasitas em triplicata. A reação de amplificação foi realizada utilizando o sistema de detecção ABI Prism 5900 (Perkin-Elmer Applied Biosystems) com as amostras em triplicata. As condições estabelecidas para a reação foram de 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, e 40 ciclos a 95°C durante 15 s e 60°C durante 1 min. Com intuito de minimizar as variações entre as placas, os valores obtidos em cada placa foram normalizados a partir de um *threshold* comum. Posteriormente, o valor do Ct de cada amostra foi calculado com base na determinação do ponto em que a fluorescência gerada na reação excedeu o *threshold*. Para determinação do Ct definido como ponto de corte, a reação de amplificação para kDNA de *Leishmania* foi realizada utilizando na mesma placa DNA extraído de 20 cães controle negativos da área não endêmica para LVC, Pelotas (RS), e de 20 cães parasitologicamente positivos da área endêmica de Jéque (BA). Para calcular o valor do Ct da reação para detecção em flebótomos de DNA de *Leishmania*, amostras de DNA de 12 flebótomos machos foram utilizadas como controles negativos e amostras de DNA de flebótomos machos misturadas ao DNA de *Leishmania* foram utilizadas como controle positivo. Uma curva ROC foi construída e o ponto de corte correspondeu aquele que forneceu os maiores valores de sensibilidade e especificidade para o teste. Assim, o Ct de

cada amostra testada foi considerado positivo ou negativo de acordo com o valor do ponto de corte estabelecido.

4.5.2 Quantificação do gene canino rRNA 18S

O valor de amplificação do gene controle (rRNA 18S) de cão foi utilizado para normalizar a concentração da amostra de DNA de *Leishmania* presente no tecido do hospedeiro, bem como garantir que quando ocorresse resultado negativo no teste não seria devido a problemas na amostra, como degradação de DNA ou a presença de inibidores de PCR na amostra. Para amplificar o gene rRNA 18S como uma referência interna do DNA genômico canino, foram usados o *pre-developed* TaqMan assay reagents (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Os *primers* têm como alvos o gene rRNA 18S de mamíferos e não amplificam o DNA genômico da *Leishmania*. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L, contendo: 5 μ L da amostra de DNA canino, diluído com água deionizada na concentração de 30 ng/ μ L, e 20 μ L de mistura de qPCR, que consiste em 12,5 μ L da Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems), 0,40 μ L do 18S GeneEx Assay (Perkin-Elmer Applied Biosystems) na concentração de 60X e água deionizada para completar o volume final da reação de 25 μ L. Para cada reação de amplificação foi realizada uma curva padrão para o gene controle cuja concentração variou entre 450 a 18,75 ng, utilizando DNA extraído do tecido de cães cuja integridade foi previamente avaliada em gel de agarose 1%. A reação de amplificação também foi feita em duplicata para cada amostra usando o ABI Prism 5900 *sequence detection system* (Perkin-Elmer Applied Biosystems). As condições de temperatura da reação foram de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Para cada amostra, a quantidade de DNA amplificado do alvo e do gene controle foi determinado pela comparação entre os valores do Ct das amostras com o Cts da curva padrão. O *slope* da curva padrão do gene rRNA 18S foi calculado e corresponde a -3,406 (DP 0,415), o qual representa a média dos valores de *slope* de 5 experimentos independentes com o coeficiente de correlação correspondente (r^2) de 0,993 (DP 0,002). Somente foram utilizadas amostras de DNA que amplificaram para o gene rRNA 18S. A carga parasitária foi expressa pelo número de parasitas e

normalizada para 100 mg da amplificação do gene controle 18S rRNA nos tecidos do hospedeiro.

4.6 Xenodiagnóstico

Todos os 35 animais selecionados foram submetidos ao xenodiagnóstico, sendo este realizado 7 a 10 dias após a coleta e diagnóstico da infecção desses animais. Um a dois dias antes da realização da técnica, os cães foram lavados com um sabão neutro para eliminação de qualquer resíduo de inseticida ou substância tóxica para os flebótomos. Os flebótomos utilizados no estudo foram obtidos de colônias de laboratório do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz e da Universidade Federal da Bahia. Para realização da técnica os insetos foram deixados em jejum durante 24 h antes da realização do exame. Um cilindro de PVC transparente, acoplado a uma malha fina, contendo de 30 a 40 flebótomos, foi fixado e deixado em contato com a orelha do cão por 30 min, para que os insetos pudessem efetuar o repasto sanguíneo. Subsequentemente, o cilindro foi removido e transportado para o CPqGM. Os insetos foram alimentados com uma solução de saturada de glicose por cinco dias. Após esse período, os flebótomos foram congelados no freezer -80°C até extração de DNA da amostra. A qPCR foi realizada para avaliar presença do DNA do parasito e determinar a carga parasitária. O xenodiagnóstico foi utilizado para avaliar a infectividade do cão em relação ao vetor flebotomíneo. A transmissão de *Leishmania* foi estimada por: i) infectividade de cães ao flebótomo calculada como a porcentagem de cães positivos na avaliação pelo xenodiagnóstico, ii) a taxa de infecção foi calculada como o número de flebótomos positivos por xenodiagnóstico e iii) Carga parasitária transmitida aos flebotomíneos durante o xenodiagnóstico.



Figura 2 - Realização da técnica de xenodiagnóstico em um dos cães selecionados para o estudo

4.7 Análise de resultados

A diferença entre a carga parasitária nos grupos de cães com diferentes manifestações clínicas foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de comparações de Dunn. Para avaliação do percentual de cães infectados, estratificados de acordo com a intensidade da carga parasitária, foi aplicado o teste Exato de Fisher. Como em cada xenodiagnóstico, o número de flebótomos utilizados variou, o número de flebótomos infectados e a carga parasitária nos vetores foram corrigidos para o valor comum de 30 flebótomos e o resultado foi expresso em número de flebótomos infectados e carga parasitária por 30 flebótomos utilizados. O teste de Spearman foi utilizado para seguintes correlações: i) entre a infectividade de cães ao vetor e a carga parasitária nos tecidos de cães naturalmente infectados, ii) entre a carga parasitária nos tecidos de cães naturalmente infectados e a taxa de infecção de flebótomos, iii) entre a carga parasitária nos tecidos de cães naturalmente infectados e a carga parasitária de flebótomos infectados. A diferença entre a carga parasitária nos flebótomos infectados no xenodiagnóstico realizados nos grupos de cães com diferentes manifestações clínicas foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de comparações de Dunn

5 RESULTADOS

5.1 População do estudo

Para inclusão no estudo, 35 cães foram selecionados devido ao resultado positivo obtido em pelo menos um dos testes diagnósticos para LVC. Em nove cães (25,7%), foi observada a presença de formas promastigotas de *Leishmania* em amostra de aspirado esplênico mantida em meio de cultura. Anticorpos anti-*Leishmania* foram detectados no soro de oito (22,8%) de 35 cães infectados, enquanto que a amplificação de DNA de *Leishmania* utilizando qPCR foi detectada em todas as 34 amostras de pele avaliadas (100%), em 29 das 35 amostras de aspirado esplênico (82,8%) e 27 das 35 amostras de sangue (77,1%) (Anexo 1).

De acordo com a avaliação clínica realizada, doze animais não apresentavam sinais clínicos da infecção (assintomáticos), quinze tinham até três sinais clínicos (oligossintomáticos) e oito mais de três manifestações clínicas da doença (polissintomáticos). Em relação às formas clínicas, todos os 12 cães assintomáticos apresentaram resultado negativo no ELISA, mas foram diagnosticados como positivos para infecção por *Leishmania* (100%), pois utilizando qPCR DNA do parasito foi detectado em pelo menos um dos tecidos avaliados. Empregando cultura para o diagnóstico, somente dois dos 12 (16,7%) foram positivos.

Em relação à positividade no ELISA, a maior prevalência foi encontrada nos cães polissintomáticos, com 62,5% dos animais positivos. Em relação à cultura, as formas clínicas em que mais amostras apresentaram o crescimento do parasita, foram os cães oligossintomáticos e os polissintomáticos, 3 de 15 (30,7%) e 3 de 8 (37,5%), respectivamente (Tabela 1). Quanto à sensibilidade do diagnóstico de LVC nos 35 animais avaliados, a cultura e o ELISA obtiveram 25% e 23% de sensibilidade, respectivamente.

Tabela 1 - Positividade dos testes diagnósticos de acordo com as diferentes formas clínicas em cães naturalmente infectados

Formas Clínicas	Testes Diagnósticos				
	Elisa <i>in house</i>	Cultura		qPCR	
		Baço	Baço	Pele	Sangue
Assintomático (n=12)	0/12 (0%)	2/12 (16,6%)	10/12 (83%)	11/11* (100%)	11/12 (91,6%)
Oligossintomático (n=15)	3/15 (20%)	4/15 (26,6%)	12/15 (80%)	15/15 (100%)	11/15 (73,3%)
Polissintomático (n=8)	5/8 (62,5%)	3/8 (37,5%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	6/8 (75%)
Total	8/35 (22,8%)	9/35 (25,7%)	29/35 (82,8%)	34/34 (100%)	27/35 (77,1%)

*Não foi coletada amostra de pele de um dos 12 cães assintomático

5.2 Carga parasitária nas amostras de tecidos dos cães infectados apresentando diferentes apresentações clínicas de LVC

A carga parasitária da infecção por *Leishmania* foi avaliada pela técnica de qPCR nas amostras dos três tecidos coletados. A mediana da carga parasitária foi de $75,0 \pm 5,9 \times 10^8$ parasitos em 100mg de DNA de pele, $158,0 \pm 4,4 \times 10^6$ nas amostras de aspirado esplênico e $25,0 \pm 2,5 \times 10^4$ nas amostras de sangue. Diferença estatisticamente significativa na carga parasitária apenas foi detectada entre as amostras de pele e sangue ($p < 0,05$).

A avaliação da carga parasitária nos tecidos relacionada com a manifestação de diferentes sinais clínicos no cão naturalmente infectado por *Leishmania*. As amostras de aspirado esplênico apresentaram a maior carga parasitária em cães polissintomáticos quando comparada à carga do mesmo tecido em cães oligossintomáticos ($p < 0,05$) e assintomáticos ($p < 0,01$). Não foram detectadas diferenças significativas na carga parasitária entre as amostras de pele e sangue obtidas de animais com diferentes formas clínicas (Figura 3).

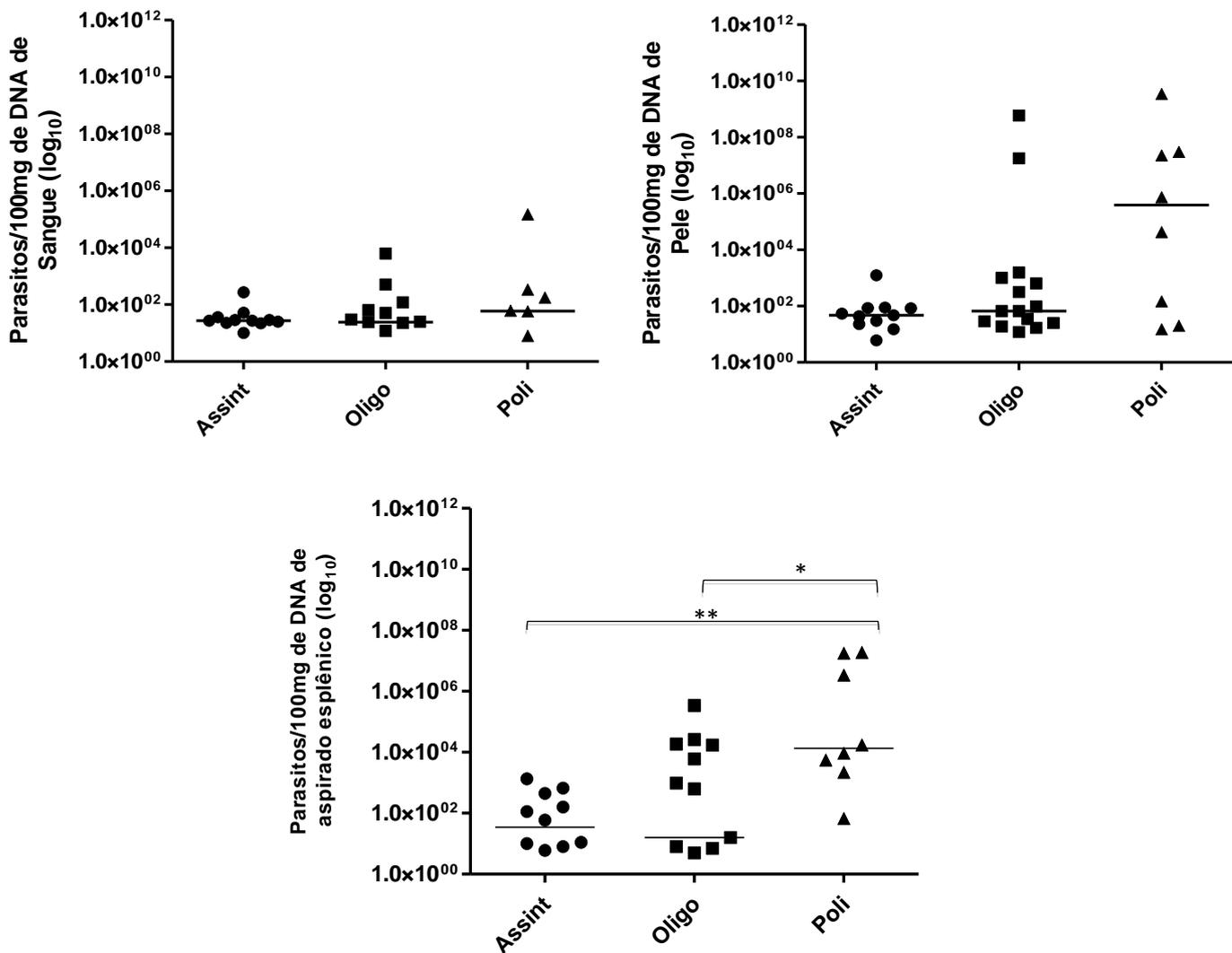


Figura 3 - Quantificação da carga parasitária por qPCR nas amostras de tecidos de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Os cães selecionados foram agrupados conforme a apresentação de sinais clínicos como descrito na seção Metodologia. A carga parasitária foi determinada a partir de DNA extraído de amostras de sangue (A), pele (B) e aspirado esplênico (C) realizados em triplicata, utilizando a técnica de qPCR. O resultado é representado pelo número de parasitos em 100mg de DNA do tecido avaliado. A linha representa a mediana da carga parasitária de cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis, pós-teste de comparações múltiplas de Dunn).

Em seguida, os cães que apresentavam diferentes manifestações clínicas foram caracterizados quanto à carga parasitária. Para isso, o número de parasitos nos diferentes tecidos avaliados foi estratificado em faixas de acordo com a intensidade, tendo sido considerada baixa quando eram detectados de 1 a 100 parasitos para cada 100mg de DNA do tecido avaliado, média de 101-10.000 e alta

com mais de 10.000 parasitos, e os resultados foram expressos em percentual de cães distribuídos de acordo com a intensidade da carga parasitária. O maior percentual dos cães assintomáticos apresentou baixa intensidade de carga parasitária (1 a 100 parasitos para cada 100mg de DNA parasitos) nas amostras de sangue (83%) ($p < 0,01$) e pele (90%) ($p < 0,01$). Enquanto que a maioria dos cães oligossintomáticos apresentou baixa carga parasitária apenas nas amostras de sangue (46%) ($p < 0,05$). (Figura 4; Anexo 2). Em relação, ao grupo de cães polissintomáticos, não houve diferença em relação à proporção dos cães com baixa carga parasitária em relação aqueles com média e alta carga nos diferentes tecidos (Figura 1C).

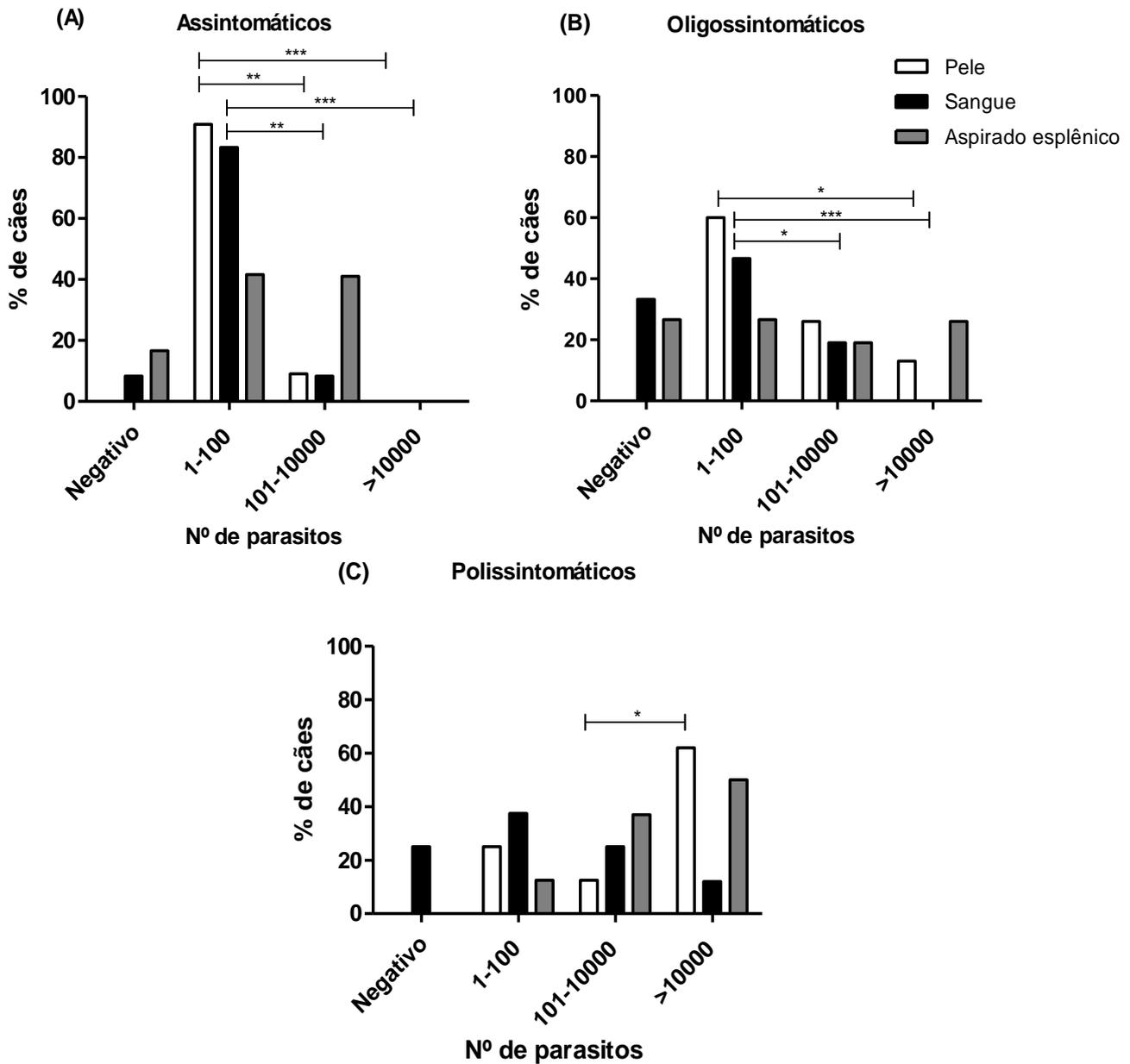


Figura 4 - Percentual de cães infectados estratificados de acordo com a carga parasitária. Amostras de pele (barra branca), sangue (barra preta) e aspirado esplênico (barra cinza) foram obtidas a partir de cães apresentando diferentes manifestações clínicas da LVC: (A) assintomáticos, (B) oligossintomáticos e (C) polissintomáticos. Para determinação da carga parasitária a partir de DNA extraído das amostras clínicas foi realizado a qPCR de acordo com o descrito na seção Metodologia. A carga parasitária, detectada em amostras de pele, sangue e aspirado esplênico, foi estratificada de acordo com intensidade em: baixa (1-100 parasitos em 100mg de DNA do tecido avaliado), média (101-10000 em 100mg de DNA do tecido avaliado) e alta carga parasitária (<10000 em 100mg de DNA do tecido avaliado) e os resultados foram expressos em percentual de cães que apresentaram carga parasitária em cada faixa. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (Exato Fisher).

5.3 Avaliação da capacidade de transmissão de cães naturalmente infectados ao vetor flebotomíneo

Para determinar a capacidade de transmissão de cães naturalmente infectados ao vetor flebotomíneo foi realizado xenodiagnóstico em cães com diferentes formas clínicas, e foram avaliados os seguintes parâmetros: a infectividade, a taxa de infecção ao flebótomo e a carga parasitária transmitida ao vetor flebotomíneo. Do total de 1035 flebótomos avaliados, 148 (14,2%) foram positivos na qPCR para detecção de DNA de *Leishmania*. Em seguida, a infectividade dos cães ao flebótomo foi determinada de acordo com as diferentes formas clínicas dos animais (Figura 5). O percentual de flebótomos que se infectaram ao se alimentar de sangue de cães assintomáticos foi de 91% (11/12), dentre os oligossintomáticos foi de 60% (9/15) e nos polissintomáticos foi de 75% (6/8). Apesar dos percentuais de flebótomos positivos mostrarem diferenças numéricas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 5).

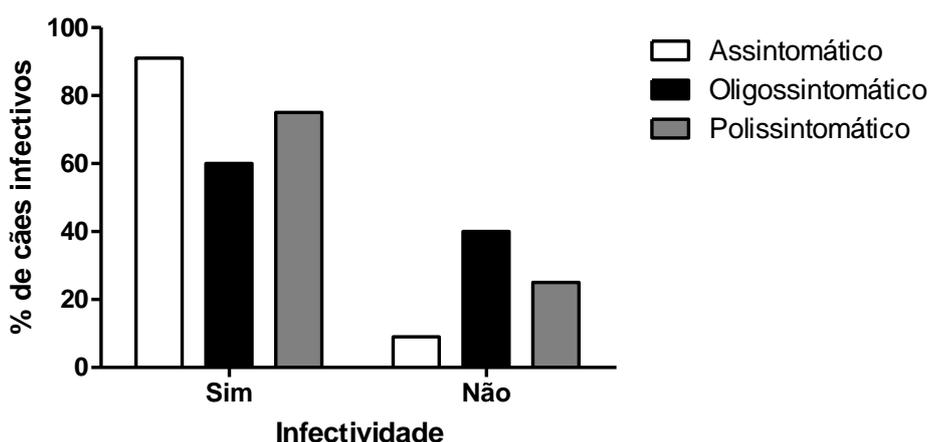


Figura 5 - Infectividade ao flebótomo de cães com as diferentes formas clínicas. Cães apresentando diferentes apresentações clínicas da LVC, assintomático, oligossintomático e polissintomático foram submetidos ao xenodiagnóstico para avaliar a capacidade de o cão transmitir o parasito ao vetor flebotomíneo. Para determinação da infectividade, amostras de DNA extraído a partir de flebótomos utilizados no xenodiagnóstico foram submetidos à qPCR para detecção de DNA de *Leishmania* de acordo com o descrito na seção Metodologia

Em seguida, avaliamos a taxa de infecção que mede o número de flebótomos positivos, após o xenodiagnóstico de cada animal, esta avaliação mostrou que o maior percentual (51%) de cães transmitiram parasitos a um pequeno número de flebótomos (de 1 a 5) (Figura 6). Adicionalmente, a taxa de infecção ao flebótomo mostrou que não houve diferença estatística entre o número de flebótomos positivos no xenodiagnóstico dos grupos de cães assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos.

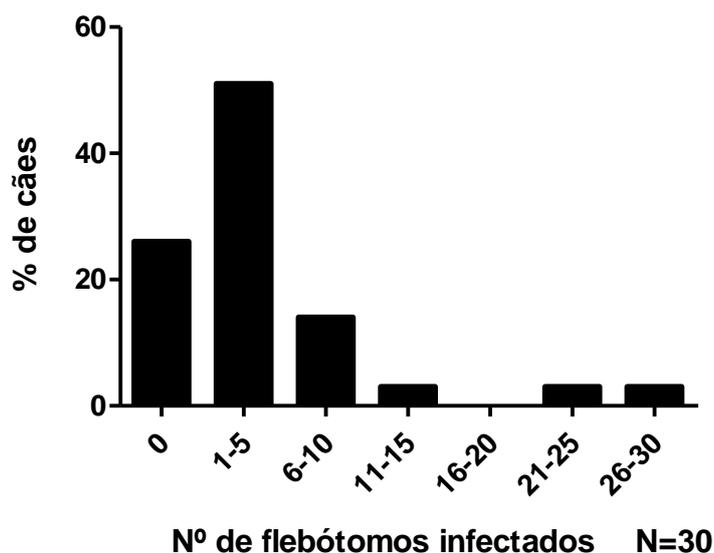


Figura 6 - Percentual de cães naturalmente infectados com *L. infantum* distribuídos de acordo com número de flebótomos infectados no xenodiagnóstico. Os flebótomos foram considerados positivos quando ocorreu detecção do DNA de *Leishmania* pela técnica de qPCR. O número de flebótomos infectados, normalizado, foi estratificado em classes de 1 a 5, 6 a 10, 11 a 15, 16-20, 21 a 25 e 26 a 30 flebótomos positivos após o xenodiagnóstico. Flebótomos infectados x 30 / total de flebótomos utilizados no xenodiagnóstico) foi avaliada nos 35 cães selecionados

Assim, para adicionalmente avaliar a capacidade dos cães em transmitir o parasito ao flebótomo, foi determinada a carga parasitária em cada flebótomo submetido ao xenodiagnóstico utilizando qPCR. No total de 148 flebótomos infectados, a carga parasitária variou de 1 a 5971 parasitos por flebótomo, com uma

mediana de $3 \pm 850,0$. Devido ao baixo valor encontrado na mediana e a grande variação da carga parasitária, os flebótomos foram estratificados de acordo com o número de parasitos. A figura 7 ilustra o percentual de flebótomos infectados estratificados de acordo com número de parasitos, de 1 a 10, 11 a 100, 101 a 1000 e acima de 1000. Foi observado que a maior proporção de flebótomos infectados (67,5%) apresentava carga parasitária entre 1 e 10 parasitos ($p < 0,01$) (Figura7).

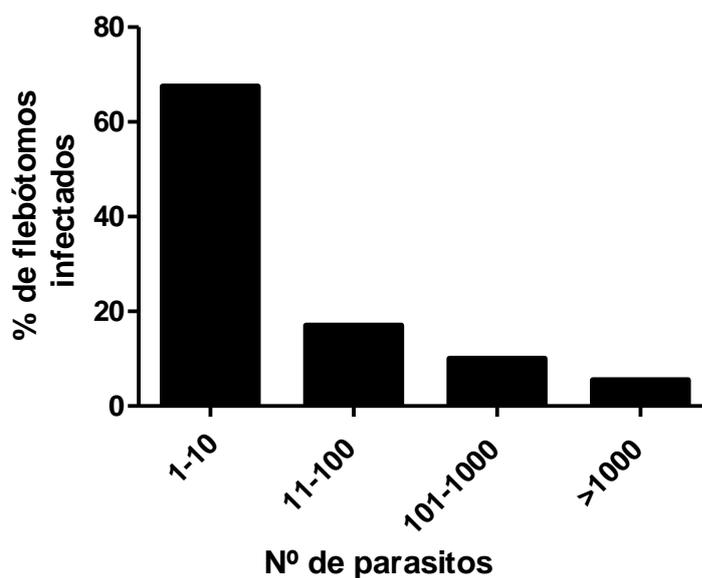


Figura 7 - Quantificação da carga parasitária nos flebótomos utilizados no xenodiagnóstico de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A carga parasitária foi determinada a partir de DNA extraído de cada flebótomo, utilizando qPCR. Foram identificados 148 flebótomos infectados após o xenodiagnóstico realizados em cães naturalmente infectados como descrito na seção Metodologia. A carga parasitária nos flebótomos foi estratificada em de 1 a 10, 11 a 100, 101 a 1000 e acima de 1000 parasitos por flebótomo.

A avaliação da média da carga parasitária transmitida a cada flebótomo a partir de cães com diferentes formas clínicas demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos de cães polissintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos (Figura 08).

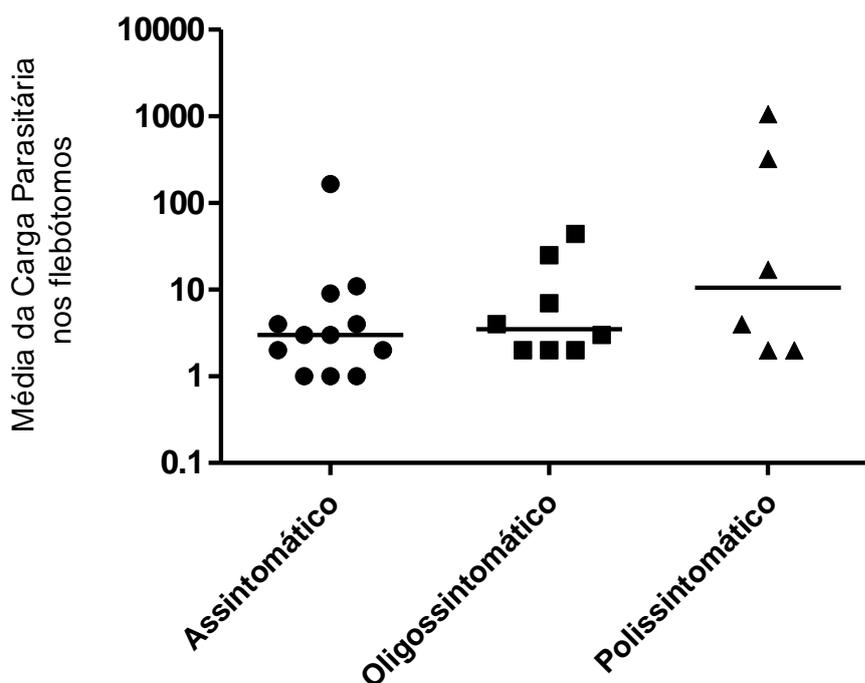


Figura 8- Distribuição da média da carga parasitária nos flebotomos infectados no xenodiagnóstico realizados em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Xenodiagnóstico foi realizado em cães com diferentes formas clínicas: assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. A carga parasitária em cada flebótomo infectado (n = 148) foi determinada por qPCR e cada ponto corresponde à média da carga parasitária dos flebotomos infectados utilizados em cada xenodiagnóstico.

A Figura 9 ilustra a distribuição da carga parasitária nas amostras de sangue de cães naturalmente infectados com *L. infantum* quanto à infectividade ao flebótomo. Foi detectada correlação positiva entre a infectividade ao vetor flebotomíneo e o número de parasitas detectados nas amostras de sangue ($r = 0,50$, $p < 0,01$).

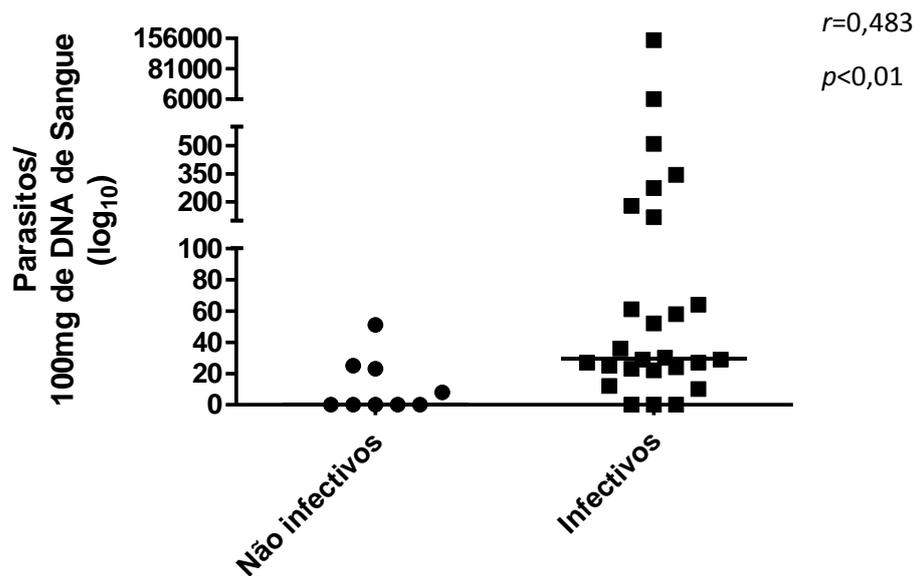


Figura 9 - Distribuição da carga parasitária nas amostras de sangue de cães naturalmente infectados com *L. infantum* quanto à infectividade ao flebótomo. O total de 35 cães foi submetido ao xenodiagnóstico (ver seção metodologia) e agrupados conforme a capacidade de transmitir (infectivos) ou não (não infectivos) o parasito ao vetor flebotomíneo. A carga parasitária foi determinada a partir de DNA extraído das amostras de sangue conforme descrito anteriormente, representada pelo número de parasitos em 100mg de DNA de sangue. Cada ponto representa a carga parasitária de cada cão. O índice de correlação de Spearman (r) e o valor de p são mostrados no gráfico

Em seguida foi avaliada correlação entre a taxa de infecção do flebótomo e a carga parasitária nos diferentes tecidos. Foi observada, correlação positiva entre menor taxa de infecção dos flebótomos e a baixa carga parasitária no sangue ($r = 0.53, p < 0.01$) (Figura 10).

Não foram encontradas correlações entre a carga parasitária nos demais tecidos e a infectividade de cães ao vetor ou a taxa de infecção dos flebótomos (Figura 12 Anexa).

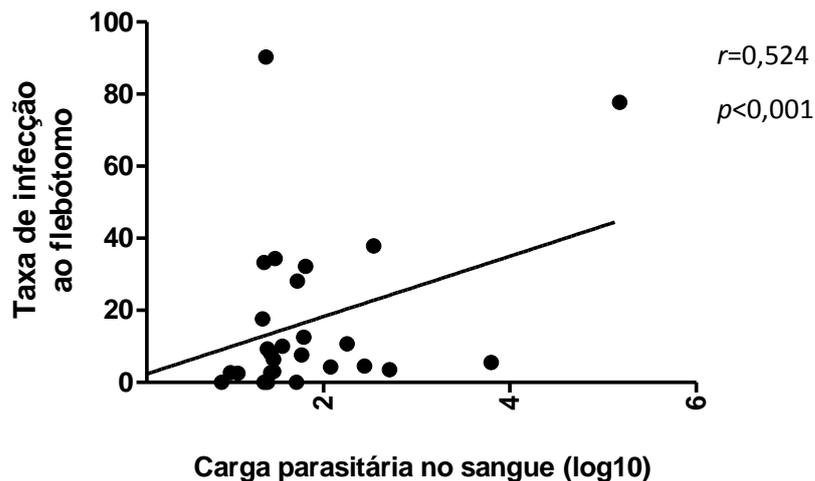


Figura 10 - Correlação da taxa de infecção de flebótomos avaliados no xenodiagnóstico e a carga parasitária nas amostras de sangue de cães infectados com *L. infantum*. O percentual de flebótomos infectados representa o número de vetores infectados após o xenodiagnóstico de cada cão. Os flebótomos são considerados positivos quando ocorre a detecção do DNA de *Leishmania* pela técnica de qPCR. A carga parasitária foi determinada a partir de DNA extraído das amostras de sangue, utilizando como ferramenta a técnica de qPCR como descrito anteriormente, e é representada pelo número de parasitos em 100mg de DNA de sangue. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha de tendência ilustra a correlação. A correlação de Spearman (r) e o valor de p são mostrados no gráfico.

Na tentativa de identificar o tecido mais apropriado como marcador de infectividade dos cães aos flebótomos, foi avaliado a correlação entre carga parasitária presente nos cães em diferentes tecidos e a carga parasitária transmitida ao vetor flebotomíneo no xenodiagnóstico. A figura 11 ilustra a existência de correlação positiva entre o número de parasitos presentes no tecido sanguíneo e o número de parasitos detectados nos flebótomos ($r= 0,4156$; IC= 0.9493 - 0.9899). Não foi detectada correlação entre carga parasitária detectada na pele (Figura 11 B) ou no aspirado esplênico (Figura 11 C) e a carga parasitária transmitida ao vetor flebotomíneo.

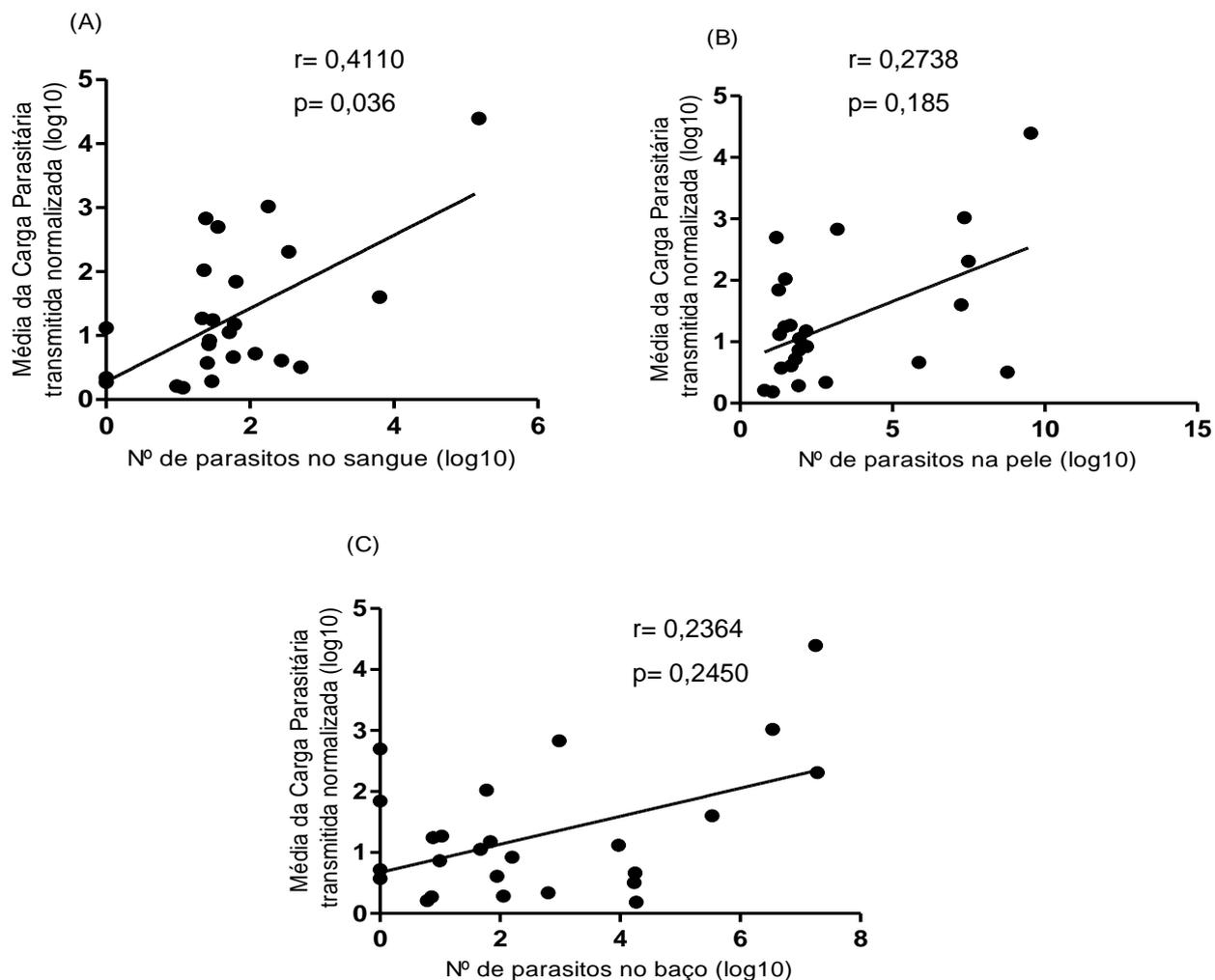


Figura 11 - Correlação entre a carga parasitária nos flebótomos infectados e a carga parasitária em amostras de tecidos dos cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A carga parasitária foi determinada por qPCR. Cada ponto representa a média normalizada da carga parasitária detectada nos flebótomos utilizados no xenodiagnóstico realizado em cada cão como descrito na seção Metodologia. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra a linha de tendência da correlação. Correlação de Spearman (r) e os valores p , para cada tecido, são mostrados nos respectivos gráficos.

6 DISCUSSÃO

Em resumo, o presente estudo visa correlacionar a carga parasitária de cães com as diferentes apresentações clínicas da LVC e a transmissão ao vetor da *Leishmania infantum*. Baixa carga parasitária na pele e no sangue foi detectada em aproximadamente 85% dos cães assintomáticos, contudo estes apresentaram alta infectividade ao flebótomo, sendo esta similar aos cães com manifestações clínicas. Em cães assintomáticos foram detectadas baixas taxas de infecção e de carga parasitária nos flebótomos. Na avaliação da correlação entre a carga parasitária dos tecidos de cães naturalmente infectados e sua capacidade de transmissão, o sangue foi o único tecido em que foi detectada correlação.

Em nosso estudo, a pele foi o tecido mais sensível na detecção do DNA de *Leishmania*, apresentando resultado positivo em 100% dos cães, corroborando com dados na literatura que sugerem que a pele é o melhor tecido para o diagnóstico da infecção (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Manna *et al.*, 2004; Quaresma *et al.*, 2009). Adicionalmente, na avaliação da carga parasitária detectada nos cães, a pele em comparação com o sangue foi o tecido em que houve detecção do maior número de parasitos, esses dados estão de acordo com o estudo de Reis e colaboradores (2006) que demonstraram pelo método de imuno-histoquímica que a pele e o baço são os tecidos com detecção do maior número de parasitos. Baixa carga parasitária no sangue de cães no curso da infecção por *Leishmania* foi anteriormente demonstrada por MANNA e colaboradores (2006). Esses dados em conjunto sugerem que o parasito circula no sangue, e não funciona como reservatório do parasito no cão (Quaresma *et al.*, 2009).

Os grupos de cães com diferentes formas clínicas: assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos apresentaram diferença estatística na carga parasitária detectada nas amostras de aspirado esplênico. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando avaliados os demais tecidos (pele e sangue). De acordo com Manna e colaboradores (2009) uma relação positiva entre a carga parasitária determinada por qPCR e a gravidade

clínica da doença é mais evidente em cães com quadros clínicos graves. O número reduzido de animais apresentando quadro grave de LV no presente estudo pode ter sido um empecilho para evidenciar diferenças estatísticas entre a carga parasitária nos tecidos de pele e sangue e as diferentes manifestações clínicas.

Todos os cães assintomáticos apresentaram resultado negativo no ELISA. Adicionalmente, o maior percentual dos cães assintomáticos apresentou baixa carga parasitária nas amostras de sangue (83%) e pele (90%). Dados da literatura apontam que baixa carga parasitária assim como baixa resposta humoral estão relacionadas com a ausência de manifestações clínicas. Esses dados demonstram a dificuldade no diagnóstico destes cães, principalmente pelos métodos de detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (Reis, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2006; Cortes *et al.*, 2007).

A literatura é controversa em relação à infectividade ao vetor nos grupos de cães assintomáticos e sintomáticos. Alguns autores demonstram que a infectividade dos cães polissintomáticos é maior do que a de cães assintomáticos (Courtenay *et al.*, 2002; Vercosa *et al.*, 2008). Entretanto os achados no presente trabalho, assim como outros estudos realizados, mostraram que a infectividade nos grupos de animais com diferentes formas clínicas é similar, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos de cães com diferentes números de sinais (Molina *et al.*, 1994; Guarga *et al.*, 2000; Travi *et al.*, 2001). Recentemente, Laurenti e colaboradores (2013) demonstraram que cães assintomáticos podem transmitir o parasito, em maior percentual que cães sintomáticos. Deste modo, nossos achados e os da literatura indicam que cães assintomáticos participam da transmissão da infecção ao vetor e que o número de manifestações clínicas parece não ser um bom marcador da infectividade de cães ao vetor.

A partir do número de flebótomos infectados em cada xenodiagnóstico foi identificado que o maior percentual dos cães avaliados transmitiu a um número reduzido de flebótomos (de 1 a 5), percentual que corresponde a aproximadamente 10% dos flebótomos utilizados no xenodiagnóstico. Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Courtenay e colaboradores (2002) que mostraram que a maior parcela dos cães infectivos transmite a um

percentual de até 10% dos flebótomos. Esses dados evidenciam que a transmissão a partir de cães ocorre geralmente para um número pequeno de flebótomos (*L. longipalpis*). Apesar de nossos dados corroborarem a outros trabalhos, um fator limitante deste estudo é o fato da análise ter sido realizada em todos os flebótomos, não apenas nos alimentados. Portanto, as taxas de infecção dos flebótomos podem estar subestimadas, uma vez que nem todos os flebótomos se alimentaram durante o xenodiagnóstico.

Assim como no presente trabalho, estudos anteriores mostraram que não foi identificada diferença na taxa de infecção de flebótomos após o xenodiagnóstico realizado em cães com diferentes manifestações clínicas (Molina *et al.*, 1994; Guarga *et al.*, 2000). Entretanto, em outros estudos a taxa de infecção dos flebótomos foi maior para os cães sintomáticos em relação aos cães assintomáticos (Courtenay *et al.*, 2002; Michalsky *et al.*, 2007). Portanto, assim como na análise da infectividade de cães ao vetor, a correlação entre a taxa de infecção de flebótomos e as manifestações clínicas presente nos animais permanece controversa.

Em relação à avaliação da capacidade de transmissão de cães naturalmente infectados, nesse estudo foi identificado que cães mesmo que assintomáticos com baixa carga parasitária na pele e no sangue são capazes de infectar o vetor flebotomíneo. A elevada infectividade dos cães assintomáticos identificada pela qPCR no presente trabalho, difere do que outros estudos encontraram. Essa diferença pode ser devida ao fato que, nesses estudos, a infecção do flebótomo foi avaliada pela visualização do parasito por microscopia, técnica consideravelmente menos sensível quando comparada à qPCR (Ranasinghe *et al.*, 2008), uma vez que 95% dos flebótomos infectados dos cães assintomáticos apresentavam carga parasitária menor que 13 parasitos.

No presente estudo, identificamos que quanto menor a carga parasitária no sangue, menor a taxa de infecção dos flebótomos ($r = 0.53$, $p < 0.01$). Estudos similares demonstraram (Ribeiro *et al.*, 2008; Miro *et al.*, 2011) que em cães após o tratamento com drogas anti-*Leishmania*, quando houve redução da carga parasitária em diversos tecidos, esta foi acompanhada de redução parcial ou completa da infectividade de cães ao vetor flebotomíneo. Esse

estudo reforça a ideia que em cães existe associação entre carga parasitária e a infectividade desses animais ao vetor.

A identificação de cães infectivos ao vetor, elementos essenciais na dinâmica de transmissão da LV, é necessária, sobretudo para colaborar com a revisão dos programas de controle da doença, tornando-os mais efetivos. Durante a infecção por *Leishmania*, o parasitismo em diferentes órgãos pode variar, por isso é relevante a identificação de tecidos em que a carga parasitária seja correlacionada com a identificação de cães infectivos. Deane e Deane (1954) demonstraram em área endêmica, que cães assintomáticos podem abrigar o parasito na pele. Esse achado foi a base para se propor que a pele de cães assintomáticos pode ser uma fonte essencial do parasita na transmissão da doença aos flebótomos. No entanto, ainda não é claro se os parasitas são transmitidos diretamente da pele ou são transmitidos a partir de sangue dos capilares ao vetor flebotomíneo durante o repasto sanguíneo. Verçosa e colaboradores (2008) demonstraram que apenas cães sintomáticos com linfadenopatia e esplenomegalia apresentaram resultado positivo no xenodiagnóstico. Os autores sugerem que essas manifestações clínicas estão associadas com altas parasitemia e transmissão. Adicionalmente, no presente estudo foi identificada correlação positiva entre a carga parasitária no sangue e a infectividade de cães, bem como com a taxa de infecção dos flebótomos, sugerindo que o número de parasitos no sangue pode ser um importante marcador para avaliar a transmissibilidade. Porém, para melhor compreender a importância da carga parasitária na pele e no sangue na transmissão do parasito, faz-se necessário a realização de estudos adicionais, analisando a carga parasitária nestes dois tecidos e a transmissão ao vetor ao longo da infecção.

Este estudo traz uma abordagem inovadora, que consiste na avaliação da carga parasitária pela qPCR de flebótomos infectados a partir de cães naturalmente infectados, esta metodologia fornece dados mais próximos das condições que ocorrem naturalmente no campo, quando comparada com estudos que avaliam a carga parasitária nos flebótomos a partir de uma infecção experimental. Em nosso estudo, a carga parasitária encontrada nos flebótomos variou de 1 até 5971 *Leishmania*. Em trabalhos em que flebótomos

foram infectados experimentalmente (com cerca de 10^6 parasitos) estes apresentaram grande variação na carga parasitária, alcançando valores entre 10^3 e 10^5 parasitos (Kimblin *et al.*, 2008; Ranasinghe *et al.*, 2008). A menor carga parasitária encontrada nos flebótomos em nosso estudo provavelmente deve-se a menor disponibilidade do parasito nos tecidos do hospedeiro em relação à quantidade de parasitos (10^6) utilizados em infecções experimentais.

Foi demonstrado que o número de parasitos transmitidos para o hospedeiro é inferior à carga parasitária presente no flebótomo infectado e apresenta grande variação (Rogers *et al.*, 2004; Kimblin *et al.*, 2008). No presente estudo, foi identificado que 95% dos flebótomos infectados a partir de cães assintomáticos apresentaram carga parasitária menor que 13 parasitas. A partir desses dados pode-se sugerir que cães assintomáticos, com baixa carga parasitária, transmitem baixo número de parasitos ao vetor flebotomíneo e podem apresentar baixa importância na transmissão da doença em áreas endêmicas.

Dentre os tecidos avaliados no presente estudo, demonstramos uma correlação positiva entre a carga parasitária no sangue e esta em flebótomos infectados. Adicionalmente, foi identificada correlação positiva entre a infectividade de cães ao vetor e o percentual de flebótomos infectados nesse tecido. Esses achados sugerem que o sangue é um tecido importante na transmissão do parasito ao vetor.

Em conjunto, estes dados mostram que cães com baixa carga parasitária são capazes de transmitir o parasito, porém a um pequeno número de flebótomos e com uma baixa carga parasitária. O papel dos cães com este perfil no ciclo de transmissão da *Leishmania* precisa ser melhor investigado.

7 CONCLUSÃO

Cães com baixa carga parasitária são capazes de transmitir o parasito, porém a um pequeno número de flebótomos e com baixa carga parasitária. Adicionalmente, o sangue foi o melhor tecido para avaliação da capacidade de transmissão do parasito por cães ao vetor flebotomíneo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; SANTOSGOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. L. An Experimental-Model for Canine Visceral Leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 13, n. 5, p. 537-550, Sep 1991.

ALBUQUERQUE, P. L.; SILVA JUNIOR, G. B.; FREIRE, C. C.; OLIVEIRA, S. B.; ALMEIDA, D. M.; SILVA, H. F.; CAVALCANTE MDO, S.; SOUSA ADE, Q. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceara, Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 26, n. 4, p. 330-3, Oct 2009.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 18, p. 2993-3002, Sep 1999.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous Vacuoles of *Leishmania-Amazonensis*-Infected Macrophages Maintain an Acidic Ph. **Infect Immun**, v. 58, n. 3, p. 779-787, Mar 1990.

ANTONIOU, M.; HARALAMBOUS, C.; MAZERIS, A.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; SOTERIADOU, K. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 76-7, Feb 2009.

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 Parasitol**, v. 24, n. 7, p. 324-330, Jul 2008.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 106, n. 4, p. 315-24, Jul 2002.

BARRAL, A.; PEDRALSAMPAIO, D.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; MCMAHONPRATT, D.; DEJESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRALNETTO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil - Evidence That *Leishmania-Amazonensis* Produces a Wide Spectrum of Clinical-Disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536-546, May 1991.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; SANTOS, S. O.; CHAGAS-JUNIOR, A. D.; PAIXAO, M.; AGUIAR, P. H.; DOS-SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine

visceral leishmaniosis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 111, n. 3-4, p. 251-61, Jun 15 2006.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, Aug 2007.

BENDERITTER, T.; CASANOVA, P.; NASHKIDACHVILI, L.; QUILICI, M. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 82, n. 4, p. 335-41, Aug 1988.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 3, p. 273-7, Sep 1996.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXAO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 53, n. 1, p. 1-8, Feb 2001.

BEZERRA-VASCONCELOS, D. R.; MELO, L. M.; ALBUQUERQUE, E. S.; LUCIANO, M. C.; BEVILACQUA, C. M. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening of target genes and assessment of quantitative methods. **Exp Parasitol**, v. 129, n. 3, p. 234-9, Nov 2011.

BIGELI, J. G.; OLIVEIRA, W. P., JR.; TELES, N. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, State of Tocantins, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 1, p. 18-23, Feb 2012.

BOGGIATTO, P. M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; METZ, K.; GALLUP, J. M.; HOSTETTER, J. M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C. A. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 4, p. e1019, 2011.

BOSSOLASCO, S.; GAIERA, G.; OLCINI, D.; GULLETTA, M.; MARTELLO, L.; BESTETTI, A.; BOSSI, L.; GERMAGNOLI, L.; LAZZARIN, A.; UBERTI-FOPPA, C.; CINQUE, P. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 5080-4, Nov 2003.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; GEVREY, J. Cellular and humoral modifications of the blood in the canine leishmaniasis. Follow-up of infected treated and untreated dogs. **Revue De Medecine Veterinaire**, v. 148, n. 3, p. 219-8, Mar 1997.

BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J. F.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 4, p. 828-31, Jul 2001.

BUNN-MORENO, M. M.; MADEIRA, E. D.; MILLER, K.; MENEZES, J. A.; CAMPOS-NETO, A. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. **Clin Exp Immunol**, v. 59, n. 2, p. 427-34, Feb 1985.

BURILLO, F. L.; PEREZ, F. M. G.; LIESA, J. P.; FABIAN, M. C. A. Iron Status and Anemia in Canine Leishmaniasis. **Revue De Medecine Veterinaire**, v. 145, n. 3, p. 171-176, Mar 1994.

CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; GOMES, S.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Vet Parasitol**, v. 76, n. 3, p. 173-180, Apr 15 1998.

CABRAL, M.; OGRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* Specific Cell-Mediated and Humoral Immunity in Asymptomatic Dogs. **Parasite Immunol**, v. 14, n. 5, p. 531-539, Sep 1992.

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*. **Vet Rec**, v. 141, n. 21, p. 539-43, Nov 22 1997.

CORTES, S.; AFONSO, M. O.; ALVES-PIRES, C.; CAMPINO, L. Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 9, p. 1431-2, Sep 2007.

COSTA, F. A.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C.; SILVA, S. M.; SINHORINI, I. L.; SILVA, T. C.; GUERRA, J. L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Vet Pathol**, v. 40, n. 6, p. 677-84, Nov 2003.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; REIS, L. E.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H.; REIS, A.; CARNEIRO, M. Prevalence and Risk Factors Associated with Infection by *Leishmania infantum* in Dogs from an Urban Area of Brazil Identified by Molecular Methods. **J Epidemiol Community Health**, v. 65, p. A360-A360, Aug 2011.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis**, v. 186, n. 9, p. 1314-20, Nov 1 2002.

COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 128, n. 1-2, p. 149-55, Mar 10 2005.

COUTINHO, M. T.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet Parasitol**, v. 147, n. 3-4, p. 320-5, Jul 20 2007.

DA COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M. S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet J**, v. 174, n. 3, p. 636-43, Nov 2007.

DA SILVA, A. V. M.; CANDIDO, C. D. D. S.; PEREIRA, D. D. P.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. C. A. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Trop**, v. 105, n. 1, p. 92-94, Jan 2008.

DA SILVA, S. M.; RIBEIRO, V. M.; RIBEIRO, R. R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 166, n. 1-2, p. 159-62, Dec 3 2009.

DANTAS-TORRES, F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog? **Vet Parasitol**, v. 136, n. 3-4, p. 379-80, Mar 31 2006.

DE CARVALHO, M. R.; VALENCA, H. F.; DA SILVA, F. J.; DE PITA-PEREIRA, D.; DE ARAUJO PEREIRA, T.; BRITTO, C.; BRAZIL, R. P.; BRANDAO FILHO, S. P. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (Franca, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Trop**, v. 116, n. 1, p. 108-10, Oct 2010.

DE PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum* chagasi in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop**, v. 107, n. 1, p. 66-9, Jul 2008.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. [Isolation of leishmaniae in the viscera and the skin of a fox in the kala-azar endemic zone in Sobral, Ceara]. **Hospital (Rio J)**, v. 45, n. 4, p. 419-21, Apr 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 198-212, May-Jun 1962.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 5, p. 305-18, Sep 2004.

DOS-SANTOS, W. L.; DAVID, J.; BADARO, R.; DE-FREITAS, L. A. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. **Parasitol Res**, v. 92, n. 2, p. 89-94, Jan 2004.

DOS SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; DE PAIVA HOFFMANN, M.; DE FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v. 12, n. 3, p. 315-7, Jul 1998.

DOS SANTOS, W. L.; RAHMAN, J.; KLEIN, N.; MALE, D. K. Control of lymphocyte adhesion to brain and aortic endothelium: ICAM-1, VCAM-1 and negative charge. **J Neuroimmunol**, v. 66, n. 1-2, p. 125-34, May 1996.

DUPREY, Z. H.; STEURER, F. J.; ROONEY, J. A.; KIRCHHOFF, L. V.; JACKSON, J. E.; ROWTON, E. D.; SCHANTZ, P. M. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 3, p. 440-6, Mar 2006.

DYE, C. Serengeti wild dogs: what really happened? **Trends Ecol Evol**, v. 11, n. 5, p. 188-9, May 1996.

FERNANDEZ-BELLON, H.; SOLANO-GALLEGO, L.; BARDAGI, M.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Vet Parasitol**, v. 135, n. 2, p. 181-185, Jan 30 2006.

FISA, R.; GALLEGO, M.; CASTILLEJO, S.; AISA, M. J.; SERRA, T.; RIERA, C.; CARRIO, J.; GALLEGO, J.; PORTUS, M. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. **Vet Parasitol**, v. 83, n. 2, p. 87-97, Jun 15 1999.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 56, n. 3-4, p. 319-27, May 1997.

FRAGA, D. B. M.; SOLCA, M. S.; SILVA, V. M. G.; BORJA, L. S.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; VERAS, P. S. T.; DOS-SANTOS, W. L. C. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Vet Parasitol**, v. 190, n. 3-4, p. 591-594, Dec 21 2012.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 3-4, p. 214-21, Apr 30 2006.

GALVAO-CASTRO, B.; SA FERREIRA, J. A.; MARZOCHI, K. F.; MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; LAMBERT, P. H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v. 56, n. 1, p. 58-66, Apr 1984.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **J Comp Pathol**, v. 135, n. 2-3, p. 100-7, Aug-Oct 2006.

GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Vet Parasitol**, v. 100, n. 1-2, p. 87-103, Sep 12 2001.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Vet Parasitol**, v. 181, n. 1, p. 23-30, Sep 8 2011.

GRIMALDI, G., JR.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg**, v. 41, n. 6, p. 687-725, Dec 1989.

GUARGA, J. L.; LUCIENTES, J.; PERIBANEZ, M. A.; MOLINA, R.; GRACIA, M. J.; CASTILLO, J. A. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Trop**, v. 77, n. 2, p. 203-7, Nov 2 2000.

HARRIS, M. P. Suspected transmission of leishmaniasis. **Vet Rec**, v. 135, n. 14, p. 339, Oct 1 1994.

JERONIMO, S. M.; OLIVEIRA, R. M.; MACKAY, S.; COSTA, R. M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E. T.; LUZ, K. G.; FERNANDES, M. Z.; JERNIGAN, J.; PEARSON, R. D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 88, n. 4, p. 386-8, Jul-Aug 1994.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, Aug 2011.

KILLICK-KENDRICK, M.; KILLICK-KENDRICK, R. The Initial Establishment of Sandfly Colonies. **Parassitologia, Vol 33, Suplemento, December 1991**, p. 315-320, 1991.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279-289, May-Jun 1999.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M. P.; CADIERGUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v. 11, n. 2, p. 105-11, Apr 1997.

KIMBLIN, N.; PETERS, N.; DEBRABANT, A.; SECUNDINO, N.; EGEN, J.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; KAMHAWI, S.; SACKS, D. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 29, p. 10125-30, Jul 22 2008.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-4, Jul-Sep 1987.

LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecology of Leishmaniasis in the South of France .10. Developmental Stages and Clinical Characterization of Canine Leishmaniasis in Relation to Epidemiology. **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 54, n. 3, p. 277-295, 1979.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E.; SECUNDINO, N. F.; PIMENTA, P. F.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Vet Parasitol**, Mar 21 2013.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania spp.* infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet Parasitol**, v. 109, n. 1-2, p. 19-27, Oct 16 2002.

LONGSTAFFE, J. A.; GUY, M. W. Canine Leishmaniasis - United-Kingdom Update. **Journal of Small Animal Practice**, v. 27, n. 10, p. 663-671, Oct 1986.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; DE SOUSA-GOMES, M. L.; DE SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos De Saude Publica**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, Dec 2008.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, n. 4, p. 566-7, 1988.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; FOGLIA MANZILLO, V.; PAVONE, L. M.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 142, n. 3-4, p. 271-80, Dec 20 2006.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A. E. Evidence for a relationship between Leishmania load and clinical manifestations. **Res Vet Sci**, v. 87, n. 1, p. 76-8, Aug 2009.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, L. M.; GRAVINO, A. E. Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet J**, v. 177, n. 2, p. 279-82, Aug 2008.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 125, n. 3-4, p. 251-62, Nov 10 2004.

MARTIN-SANCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUNOZ-PEREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Vet Parasitol**, v. 145, n. 3-4, p. 267-273, Apr 30 2007.

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

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; DA ROCHA LIMA, A. C.; FRANCA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; DOS SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Vet Parasitol**, v. 147, n. 1-2, p. 67-76, Jun 20 2007.

MIRO, G.; GALVEZ, R.; FRAILE, C.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 52, 2011.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 88, n. 4, p. 491-3, Jul-Aug 1994.

MOLL, H. Experimental Cutaneous Leishmaniasis - Langerhans Cells Internalize Leishmania-Major and Induce an Antigen-Specific T-Cell Response. **Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology**, v. 329, p. 587-592, 1993.

MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. The Biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Domestic-Animals - Molyneux,Dh, Ashford,Rw. **Nature**, v. 303, n. 5920, p. 834-835, 1983.

MONTOYA-LERMA, J.; CADENA, H.; OVIEDO, M.; READY, P. D.; BARAZARTE, R.; TRAVI, B. L.; LANE, R. P. Comparative vectorial efficiency of Lutzomyia evansi and Lu. longipalpis for transmitting *Leishmania chagasi*. **Acta Trop**, v. 85, n. 1, p. 19-29, Jan 2003.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 9, p. 399-405, Sep 2002.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVAR, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 71, n. 3-4, p. 181-195, Nov 30 1999.

MURAILLE, E.; DE TREZ, C.; PAJAK, B.; TORRENTERA, F. A.; DE BAETSELIER, P.; LEO, O.; CARLIER, Y. Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. **Infect Immun**, v. 71, n. 5, p. 2704-2715, May 2003.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 5, p. 1666-9, May 2002.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; FOGLIA MANZILLO, V.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 4, p. 1318-22, Apr 2006.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI, G. J.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 1, p. 39-44, Jul 1996.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DELREAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and Humoral Immune-Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania-Infantum*. **Infect Immun**, v. 62, n. 1, p. 229-235, Jan 1994.

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M.; FERREIRA EDE, C.; DA ROCHA-LIMA, A. C.; XAVIER, A. A.; GONTIJO, C. M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Trop**, v. 111, n. 3, p. 289-94, Sep 2009.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915-34, Dec 2009.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, n. Pt 3, p. 253-61, Mar 2001.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.; DYE, C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. **Parasitology**, v. 115 (Pt 2), p. 143-56, Aug 1997.

RALLIS, T.; DAY, M. J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; PAPAZOGLU, L.; FYTIANOU, A.; KOUTINAS, A. F. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **J Comp Pathol**, v. 132, n. 2-3, p. 145-152, Feb-Apr 2005.

RANASINGHE, S.; ROGERS, M. E.; HAMILTON, J. G.; BATES, P. A.; MAINGON, R. D. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 9, p. 875-82, Sep 2008.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v. 81, n. 1, p. 68-75, Aug 2006.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 112, n. 3-4, p. 102-16, Aug 15 2006.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JAFFE, C. L. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 71, n. 1, p. 69-76, Oct 1 1999.

RIBEIRO, R. R.; MOURA, E. P.; PIMENTEL, V. M.; SAMPAIO, W. M.; SILVA, S. M.; SCHETTINI, D. A.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; TAFURI, W. L.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; FREZARD, F.; MICHALICK, M. S. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 7, p. 2564-72, Jul 2008.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292-297, Jul 2000.

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A.; BATES, P. A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463-7, Jul 22 2004.

SACKS, D. L.; BRODIN, T. N.; TURCO, S. J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 42, n. 2, p. 225-33, Sep-Oct 1990.

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*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70, n. 6, p. 618-24, Jun 2004.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol**, v. 30, n. 10, p. 515-24, Oct 2008.

SARAIVA, L.; CARVALHO, G. M.; GONTIJO, C. M.; QUARESMA, P. F.; LIMA, A. C.; FALCAO, A. L.; ANDRADE FILHO, J. D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **J Med Entomol**, v. 46, n. 5, p. 1159-63, Sep 2009.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-83, Nov-Dec 1996.

SIDERIS, V.; PAPADOPOULOU, G.; DOTSIKA, E.; KARAGOUNI, E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. **Eur J Epidemiol**, v. 15, n. 3, p. 271-276, Mar 1999.

SILVEIRA, F. T.; CARNEIRO, L. A.; RAMOS, P. K.; CHAGAS, E. J.; LIMA, L. V.; CAMPOS, M. B.; LAURENTI, M. D.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. A cross-sectional study on canine *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of specific IgG-antibody response than delayed-type hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. **Parasitol Res**, v. 111, n. 4, p. 1513-22, Oct 2012.

SLAPPENDEL, R. J. Canine Leishmaniasis - a Review Based on 95 Cases in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 1988.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study

of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **J Comp Pathol**, v. 130, n. 1, p. 7-12, Jan 2004.

SOLANO-GALLEGU, 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. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 560-3, Feb 2001.

SWENSON, C. L.; SILVERMAN, J.; STROMBERG, P. C.; JOHNSON, S. E.; WILKIE, D. A.; EATON, K. A.; KOCIBA, G. J. Visceral Leishmaniasis in an English Foxhound from an Ohio Research Colony. **J Am Vet Med Assoc**, v. 193, n. 9, p. 1089-1092, Nov 1 1988.

TAFURI, W. L.; BARBOSA, A. J.; MICHALICK, M. S.; GENARO, O.; FRANCA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, n. 2, p. 81-9, Mar-Apr 1996.

TRAVI, B. L.; OSORIO, E. Y.; SALDARRIAGA, O. A.; CADENA, H.; TABARES, C. J.; PENICHE, A.; LEE, S.; MELBY, P. C. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 81, n. 6, p. 994-1003, Dec 2009.

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. **Am J Trop Med Hyg**, v. 64, n. 3-4, p. 119-24, Mar-Apr 2001.

TRAVI, B. L.; VELEZ, I. D.; BRUTUS, L.; SEGURA, I.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 84, n. 5, p. 676-7, Sep-Oct 1990.

VERCOSA, B. L.; LEMOS, C. M.; MENDONCA, I. L.; SILVA, S. M.; DE CARVALHO, S. M.; GOTO, H.; COSTA, F. A. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet Res**, v. 4, p. 45, 2008.

VINHAS, V.; ANDRADE, B. B.; PAES, F.; BOMURA, A.; CLARENCIO, J.; MIRANDA, J. C.; BAFICA, A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 11, p. 3111-21, Nov 2007.

WHO. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 793, p. 1-158, 1990.

WHO. Control of the leishmaniases. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n. 949, p. xii-xiii, 1-186, back cover, 2010.

9 ANEXOS

Tabela 2-Anexo. Resultados dos testes diagnósticos para LVC em 35 incluídos no estudo para avaliação de transmissibilidade de *Leishmania* por xenodiagnóstico

Formas clínicas da LVC	Número do cão	Teste sorológico		Testes Parasitológicos			
		ELISA <i>in house</i>		Cultura	qPCR (kDNA de <i>Leishmania</i>)		
		Soro		Baço	Baço	Pele	Sangue
Assintomático	Cão 30	-	-	-	+	+	+
	Cão 16	-	+	+	+	+	+
	Cão 20	-	-	-	+	+	+
	Cão 21	-	+	+	+	+	-
	Cão 02	-	-	-	+	+	+
	Cão 27	-	-	-	+	+	+
	Cão 32	-	-	-	+	+	+
	Cão 35	-	-	-	+	+	+
	Cão 29	-	-	-	+	+	+
	Cão 36	-	-	-	-	+	+
Oligossintomático	Cão 26	-	-	-	-	+	+
	Cão 28	-	-	-	+	+	+
	Cão 33	-	-	-	-	+	+
	Cão 17	-	-	-	+	+	-
	Cão 19	-	-	-	+	+	-
	Cão 08	+	-	-	+	+	+
	Cão 12	-	-	-	+	+	-
	Cão 14	+	-	-	-	+	+
	Cão 31	-	-	-	-	+	+
	Cão 22	-	+	+	+	+	+
	Cão 25	-	+	+	+	+	+
	Cão 01	+	+	+	+	+	+
	Cão 34	-	-	-	+	+	+
	Cão 37	-	-	-	+	+	+
	Cão 18	-	+	+	+	+	+
Polissintomático	Cão 03	-	-	-	+	+	-
	Cão 05	-	-	-	-	+	-
	Cão 24	+	+	+	+	+	+
	Cão 23	+	+	+	+	+	+
	Cão 06	-	-	-	+	+	-
	Cão 10	-	-	-	+	+	+
	Cão 11	+	-	-	+	+	+
	Cão 13	-	-	-	+	+	-
	Cão 09	+	-	-	+	+	+
	Cão 15	+	+	+	+	+	+
Positividade geral		8/35 (22,80%)	9/35 (25,70%)	29/35 (82,80%)	34/34 (100%)	27/35 (77,10%)	

^a Não foi realizado

Tabela 3 Anexos. Percentual de distribuição de cães de acordo com a quantidade de *L. infantum* determinada por qPCR em três amostras de tecidos avaliadas de cada animal

Forma clínica dos animais	Distribuição de cães de acordo com a carga parasitária (%)														
	Negativa			1-100 parasitos			100-1000 parasitos			1000-10000 parasitos			>10000 parasitos		
	P	S	B	P	S	B	P	S	B	P	S	B	P	S	B
Assintomáticos	0	8	17	91	83	42	0	8	33	9	0	8	0	0	0
Oligossintomáticos	0	33	27	60	47	27	13	13	13	13	7	76.6	13	0	27
Polissintomáticos	0	25	0	25	38	13	13	25	0	0	0	38	63	13	50

P: Amostra de biópsia de pele; S: Amostra de sangue periférico; B: Amostra de aspirado esplênico

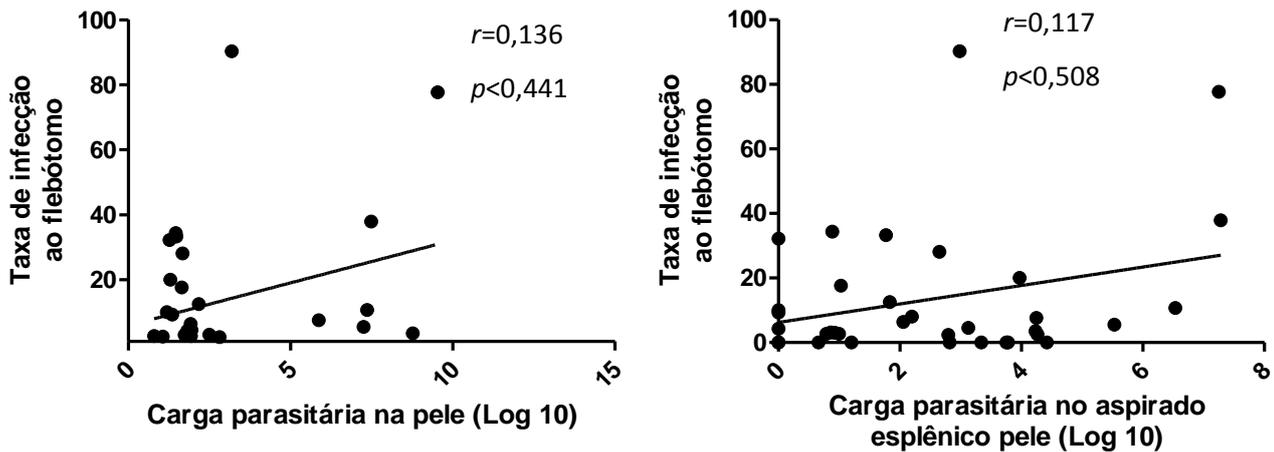


Figura 12 Anexo - Correlação da taxa de infecção de flebótomos avaliados no xenodiagnóstico e a carga parasitária nas amostras de pele e aspirado esplênico de cães infectados com *L. infantum*. O percentual de flebótomos infectados representa o número de vetores infectados após o xenodiagnóstico de cada cão. Os flebótomos são considerados positivos quando ocorre a detecção do DNA de *Leishmania* pela técnica de qPCR. A carga parasitária foi determinada a partir de DNA extraído das amostras de pele e aspirado esplênico, utilizando como ferramenta a técnica de qPCR como descrito anteriormente, e é representada pelo número de parasitos em 100mg de DNA do tecido. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha de tendência ilustra a correlação. A correlação de Spearman (r) e o valor de p são mostrados no gráfico.