



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS, ALTERAÇÕES
ESTRUTURAIS, IMUNOMARCAÇÃO E CARGA PARASITÁRIA EM ÓRGÃOS DO
SISTEMA URINÁRIO DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania*
(*leishmania*) *infantum* (Nicolle, 1908)**

JACILENE LOURENÇO DA SILVA

RECIFE
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS, ALTERAÇÕES
ESTRUTURAIS, IMUNOMARCAÇÃO E CARGA PARASITÁRIA EM ÓRGÃOS DO
SISTEMA URINÁRIO DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania*
(*leishmania*) *infantum* (Nicolle, 1908)**

JACILENE LOURENÇO DA SILVA

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciência
Animal Tropical, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da
Silva Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara
Alves

RECIFE
2015

Ficha catalográfica

S586a Silva, Jacilene Lourenço da

Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos, alterações estruturais, imunomarcacão e carga parasitária em órgãos do sistema urinário de cães com infecção natural por *leishmania (leishmania) infantum* (nicolle, 1908) / Jacilene Lourenço da Silva – Recife, 2015.

72 f.: il

Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Júnior.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.

Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Cães 2. Leishmaniose 2. Rins 3. Glomerulonefrite
4. Imunohistoquímica 5. qPCR I. Silva Junior, Valdemiro Amaro da, orientador II. Título

CDD 636.089

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS,
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, IMUNOMARCAÇÃO E CARGA
PARASITÁRIA EM ÓRGÃOS DO SISTEMA URINÁRIO DE CÃES COM
INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)**

Jacilene Lourenço da Silva
Recife, 05 de Agosto de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr. Rafael Antonio Do Nascimento Ramos
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profa. Dra. Milena de Paiva-Cavalcanti
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Severina, *In memoriam*.
Sempre os amarei!

Dê a quem você ama: asas para voar, raízes para voltar e motivos para ficar.”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir viver e ter saúde para enfrentar as batalhas nossas de cada dia.

Aos Meus Pais, que sempre me fizeram ver que o melhor caminho a seguir é o do estudo e do trabalho. Sei que onde estiverem no plano espiritual estão muito felizes com mais essa conquista, serei eternamente grata aos seus ensinamentos.

Aos Meus irmãos e irmãs, que souberam entender as minhas muitas ausências nas reuniões familiares, em decorrência da dedicação nesse período.

Ao Meu Orientador e grande amigo, Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior que, como amigo, não tenho palavras para descrevê-lo e como orientador, acreditou em mim quando muitas vezes eu mesma não acreditei, sempre me orientando na direção do melhor caminho a seguir.

Aos amigos do Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, Simone, Ebla, Fabiana, Jéssica, Ana Kelly, Alluanan, André e em especial Vinícius e Sandra.

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Bezerros, em especial ao Médico Veterinário Dr. Mércio, pela boa vontade e valiosa colaboração na disponibilização de cães para execução deste trabalho.

Ao Departamento de Controle de Vetores e Vigilância Animal da Prefeitura Municipal de Caruaru, em especial à Médica Veterinária Dra. Suely, pela boa vontade e valiosa colaboração na disponibilização de cães para execução deste trabalho.

Ao Professor Leucio Câmara Alves, por ter aberto as portas do Laboratório de Doenças Parasitárias, possibilitando parte da execução do trabalho e também por aceitar ser co-orientador deste trabalho contribuindo com seu conhecimento.

Aos Amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias, em especial Victor, Edson, Neurisvan e Bruno.

À Dra. Milena de Paiva-Cavalcanti, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Imunologia, e também seus orientados Rômulo e Lays.

Aos tutores, que mesmo em uma hora difícil de separação dos seus animais de estimação, autorizaram a eutanásia e necropsia, possibilitando a coleta do material que deu origem a esse trabalho.

Aos colegas companheiros de curso, com os quais dividimos nossos momentos de angústias, ansiedades, e alegrias, Débora Miranda, Juliana Ribeiro, Luciana Mascena e Alex.

Aos meus clientes, que souberam entender a minha ausência, me incentivando e adaptando-se a “horários especiais” para o atendimento dos seus animais.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical por terem contribuído para minha formação;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical pela possibilidade de realização deste curso;

E por fim, porém não menos importante, ao meu esposo, João Marcelo de Souza Figueiredo que me deu o presente mais lindo que uma mulher pode receber, a benção de ser mãe, que nossa filha seja criada em um lar de carinho, compreensão e ajuda mútua.

OBRIGADA!

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho de dissertação teve o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no financiamento da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Epidemiologia	18
2.2. Imunopatologia e Sinais Clínicos	21
2.3. Lesões Renais	26
2.4. Métodos Diagnósticos	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
3. OBJETIVOS	48
3.1. Geral	48
3.2. Específicos	48
4. ARTIGO	49
4.1 Artigo	50
5. CONCLUSÃO	62

LISTA DE FIGURAS
REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	19
Figura 2	Amastigotas de <i>Leishmania</i> em punção de medula de cão.....	19
Figura 3	Ciclo biológico de <i>L.(l.) infantum</i>	20

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

- Figura 1.** Achados histopatológicos de rins de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.....63
- Figura 2.** Detecção imunohistoquímica de formas amastigotas de *L. infantum* em órgãos do sistema urinário de cães naturalmente infectados.....65

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Intensidade das reações inflamatórias e o comprometimento do órgão avaliado para a variável HE e para determinação do número de formas amastigotas imunomarcadas através da IHQ..... 54
- TABELA 2** - Detecção de DNA de *L. infantum* por qPCR, imunomarcção e lesões histopatológicas em diferentes órgãos do sistema urinário de cães naturalmente infectados..... 57
- TABELA 3** - Distribuição das frequências relativas e absolutas dos escores de HE nos órgãos do sistema urinário de cães naturalmente infectados..... 58
- TABELA 4** - Análise quantitativa dos resultados da qPCR nos órgãos/urina de cães naturalmente infectados por *L. infantum*..... 59
- TABELA 5** - Relação entre os escores da IHQ e HE com a qPCR..... 59

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

LV - Leishmaniose Visceral

T CD4+ - Linfócitos T helper

TCD8+ - Linfócitos T Citotóxicos

Th - Linfócitos T helper

APC - Células Apresentadoras de Antígenos

INF γ - Interferon Gama

TNF α - Fator de Necrose Tumoral

IL - Interleucina

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

IRA - Insuficiência Renal Aguda

IRC - Insuficiência Renal Crônica

TFG - Taxa de Filtração Glomerular

HE - Hematoxilina-Eosina

PAS - Ácido Periódico de Schiff

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

RIFI - Reação de Imunoflorescência indireta

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

IHQ - Imunohistoquímica

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

DAB - Diaminobenzidina

μ l - microlitro

ml - mililitro

fg – fentograma

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença de distribuição mundial causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. No Brasil, o principal vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, responsável por abrigar a forma promastigota infectante. O cão, por sua proximidade com o homem, é considerado o principal reservatório para a doença. Vários órgãos e sistemas podem ser afetados, incluindo o sistema urinário. O objetivo deste trabalho foi avaliar as lesões histopatológicas que ocorrem no sistema urinário, as alterações bioquímicas e correlacionar com a carga parasitária e detecção do parasito. Foram utilizados 30 cães positivos para a doença, com presença do parasito em aspirado de medula óssea, provenientes da rotina do Hospital Veterinário da UFRPE. Foi coletado sangue para análise bioquímica com dosagem de ureia, creatinina, cálcio, fósforo e albumina, em seguida os animais foram submetidos à eutanásia. Amostras dos rins, ureteres, bexiga e urina foram coletadas para avaliação estrutural, imunohistoquímica e molecular. No estudo, as principais alterações observadas foram glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite proliferativa, glomerulonefrite crônica, nefrite intersticial e nefrose. Imunomarcção de formas amastigotas de *L. infantum* foram observadas em todos os órgãos do sistema, exceto nos ureteres. Foi possível observar que existe relação entre a carga parasitária e o grau de lesões e imunomarcção. Por outro lado, esta mesma carga parasitária não influencia nos parâmetros bioquímicos de avaliação renal.

Palavras chave: Cães, leishmaniose, rins, bexiga, glomerulonefrite, imunohistoquímica, qPCR.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a worldwide distribution of disease caused by *Leishmania infantum*. In Brazil, the main vector is the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, which sheltered the infective promastigote form. The dog, due to its proximity with the man, can be considered the main reservoir for the disease. Various organs and systems can be affected, including the urinary system. The aim of this study was to establish a relationship between the histopathological lesions in the urinary system, biochemical changes and parasite load and IHQ detection of the parasite. Thirty positive dogs from Veterinary Hospital of UFRPE were used in this experiment. Blood was collected and the serum was used to obtain the levels of urea, creatinine, calcium, phosphorus and albumin. After the euthanasia procedures, the tissue samples of the kidneys, ureters, bladder and urine were collected to evaluate structural, immunohistochemistry and molecular changes arising from leishmaniasis. In the study, the main histopathological changes were membranous glomerulonephritis, membranoproliferative glomerulonephritis, proliferative glomerulonephritis, chronic glomerulonephritis, interstitial nephritis and nephrosis. Immunostaining of amastigotes of *L. infantum* were observed in all organs of the system, except in the ureters. It was observed that there is a relationship between parasite load and the degree of injury and immunostaining. On the other hand, the parasite load does not influence biochemical parameters of renal evaluation.

Keywords: Dogs, leishmaniasis, kidneys, bladder, glomerulonephritis, immunohistochemistry, qPCR.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, na rotina da clínica veterinária tem aumentado muito a incidência de casos de Leishmaniose Visceral (LV) e muitos destes com sinais clínicos de insuficiência renal.

Causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, esta doença é uma zoonose que ocorre em diversas partes do mundo, sendo relatada em mais de 98 países (ALVAR et al., 2012) . A doença acomete não só o homem como também outras espécies de mamíferos como: cães, gatos, canídeos silvestres, marsupiais e roedores. Porém o cão, pelo seu contato mais próximo ao homem, tornou-se o principal reservatório e fonte de infecção e transmissão desta importante doença (GARCIA & MARCONDES, 2007).

A transmissão entre hospedeiros vertebrados ocorre primariamente por meio vetorial através do flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*. No Brasil, encontramos o *L. longipalpis* e o *L. cruzi*, que ao realizar o repasto sanguíneo veiculam as formas promastigotas do parasita de animais infectados para animais suscetíveis e, eventualmente, o homem. Este vetor é popularmente conhecido, dependendo da região, como mosquito-palha, tambaqui, birigui, cangalhinha. É um inseto muito pequeno que costuma reproduzir-se em locais com muita matéria orgânica em decomposição e ambientes sombrios. (COSTA, 2011); Estes flebotomíneos tem intensa atividade crepuscular e pós-crepuscular, porém podem atacar durante o dia caso sejam perturbados em suas tocas (ROSYPAL et al., 2003).

Em áreas endêmicas os cães tem grande importância na manutenção do ciclo da LV, assim são considerados um importante elo na cadeia de transmissão da doença. (GARCIA & MARCONDES, 2007).

A LV em cães é um grave problema de saúde pública devido à sua incidência e letalidade nas Américas, Europa, África, Ásia e Oriente Médio. No continente americano, ela ocorre desde o México até a Argentina, porém, quase 90% dos casos humanos descritos provêm do Brasil (MONTEIRO et al., 2005; MARCONDES et al.,

2013). Ela pode se apresentar de uma forma assintomática até uma grave forma sistêmica, muitas vezes levando o paciente a óbito.

Os sinais viscerais mais comumente observados são: linfadenomegalia, emaciação, neuralgia, poliartrite, polimiosite, insuficiência renal (poliúria, polidipsia, vômitos e convulsões), hepato-esplenomegalia, febre, epistaxe, uveíte, emagrecimento, apatia, diarreia. Além dos sinais clínicos cutâneos como onicogribose, dermatite seca, alopecia, hiperqueratose, úlceras (TILLEY & SMITH JR., 2008; BRITO et al., 2004).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia

A LV é uma doença de distribuição mundial, causada por um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomidae e gênero *Leishmania* (DESJEUX, 2004). Hoje, várias espécies são encontradas em todo o mundo resultando em múltiplos sinais clínicos (NOLI, 1999).

No velho mundo, predomina a *L. infantum* em toda a região do mediterrâneo (França, Itália, Grécia, Portugal, Espanha), Ásia, China e Norte da África (PRATA & SILVA, 2005). Na América Latina e no Brasil, a *L. chagasi* é o causador da doença tanto em cães quanto no homem (GARCIA & MARCONDES, 2007). Porém, após alguns estudos bioquímicos e moleculares, pesquisadores consideraram que a *L. chagasi* e *L. infantum* são a mesma espécie (DANTAS-TORRES, 2006).

No Brasil, o principal vetor da LV, também conhecida como Calazar, é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, responsável por abrigar a forma promastigota infectante. Por sua vez, os hospedeiros vertebrados são animais selvagens (roedores, gambás, tamanduás, tatus, primatas, raposas, preguiças), animais domésticos (cães, gatos, equinos) e o homem. O cão, por sua proximidade com o homem, é considerado o principal reservatório para a doença. (FEITOSA, 2006; SOARES et al., 2013).



Fig. 1- *Lutzomyia longipalpis*. Foto: Ray Wilson, *Liverpool School of Tropical Medicine*

A forma amastigota é encontrada no hospedeiro vertebrado, sendo parasitos intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocitário mononuclear, notadamente macrófagos (ALENCAR et al., 1991).

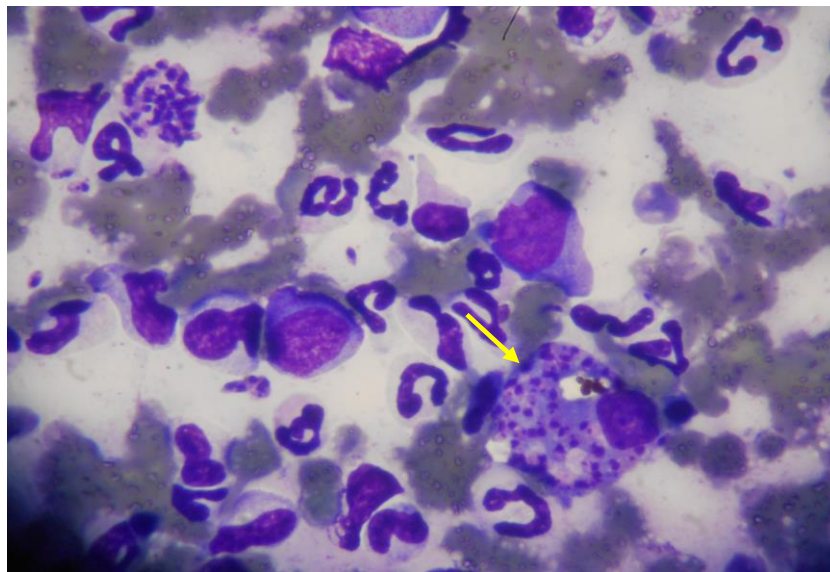
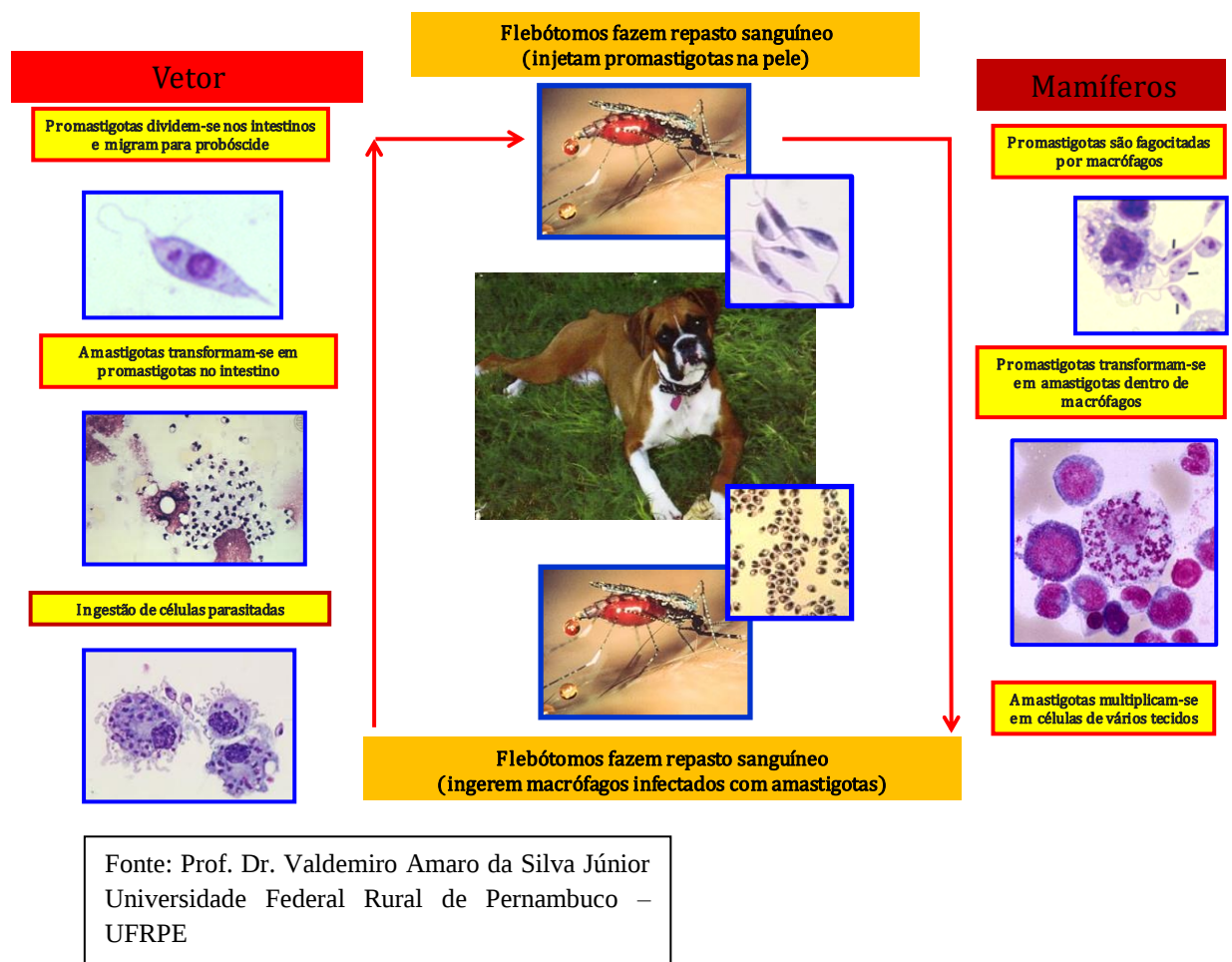


Fig. 2 - Amastigotas de *Leishmania* em punção de medula de cão (seta). Obj. 40x. Fonte: Acervo Pessoal.

O ciclo biológico do *Lutzomyia longipalpis* se dá em ambiente terrestre e divide-se em quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto, levando o ciclo completo aproximadamente 30 a 40 dias. As fêmeas são hematófagas e responsáveis pela transmissão da doença, vivem cerca de 20 dias e alimentam-se de várias espécies de animais vertebrados (BRASIL, 2006).

Ao realizarem o repasto sanguíneo em cães ou outros mamíferos silvestres infectados, as fêmeas dos flebotomíneos albergam o protozoário. No intestino destas, o protozoário passa da fase amastigota para promastigota tornando-se infectante. Ao realizar novo repasto sanguíneo, estas formas promastigotas serão inoculadas na pele dos hospedeiros (KILLICK-KENDRICK, 1999; BRASIL, 2006).



Nos cães, o *Lutzomyia longipalpis* alimenta-se principalmente na pele das orelhas, focinho e áreas inguinais e perianais. Estes cães, ao serem infectados, poderão

ou não apresentar sinais, dependendo de sua resposta imune (ALVAR et al., 2004). Quando inoculadas na pele, os parasitos são fagocitados por macrófagos do hospedeiro e dentro do vacúolo, são liberados óxido nítrico e hidrolases lipossomais tentando assim eliminar o parasito. Porém, alguns mecanismos de evasão desenvolvidos pelo protozoário podem permitir a fuga das defesas do hospedeiro, o que leva à sobrevivência e multiplicação dentro dos macrófagos (ALVAR et al., 2004).

Não se observa predileção sexual, racial, ou faixa etária para o desenvolvimento da infecção, porém acredita-se que animais de porte pequeno sejam menos afetados por viverem dentro dos domicílios e desta forma estarem menos expostos à ação dos flebotomíneos (CIARAMELLA et al., 1997; AMUSATEGUI et al., 2003).

2.2. Immunopatologia e Sinais Clínicos

Depois da inoculação do parasito no cão, os animais resistentes à infecção irão promover ativação de células TCD4^+ Th1, e produzirão citocinas interferon gama ($\text{IFN}\gamma$), fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) e interleucinas (IL) 2 e 12, ativando macrófagos que destruirão as formas amastigotas intracelulares. Há fortes evidências que células TCD8^+ citotóxicas também estão envolvidas na resistência à doença (PINELLI et al., 1995).

Já nos animais que desenvolvem sinais clínicos, há uma diminuição de células TCD4^+ Th1 e aumento de TCD4^+ Th2, produzindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, promovendo proliferação de células B e conseqüentemente, produção de grande quantidade de anticorpos (PINELLI et al., 1994, 1999). Esses anticorpos não protegem e, muitas vezes são prejudiciais, pois formam imunocomplexos que se depositam nas membranas basais de diversos órgãos (SLAPPENDEL, 1988; MARTINEZ-MORENO et al., 1995). Desta forma, as citocinas produzidas pelas células Th, a depender da resposta imunológica do hospedeiro, poderão ativar mecanismos que resultam tanto em proteção, quanto na exacerbação da doença (PINELLI et al., 1999).

Os cães, quando são infectados, podem ser assintomáticos ou apresentar uma grande diversidade de sinais clínicos. Os animais assintomáticos respondem por 20 a 40% do total de soropositivos, sendo que destes, cerca de 80% irão desenvolver a doença (MORETTI et al., 1995).

Os sinais clínicos da doença são amplos, devido aos vários mecanismos patogênicos do parasito, diversidade de resposta imunológica apresentada e dos diferentes órgãos afetados (SOLANO-GALLEGO & BANETH, 2008). A doença pode ainda ser classificada como aguda, subaguda ou crônica, de acordo com o quadro evolutivo, sendo as formas subaguda e aguda raras em comparação à forma crônica, apresentando uma evolução entre 3 a 4 semanas e 2 a 3 meses, respectivamente (CAMPILLO et al., 1999).

Na forma crônica, do período de incubação até o aparecimento dos primeiros sinais, o tempo pode variar de 3 meses até 6 anos (ROZE, 2005). Inicialmente, há uma alteração do estado geral do animal, com perda de peso progressiva, apatia, anorexia e hipertermia, o que pode confundi-la com qualquer outra doença, já que os sinais são inespecíficos (CAMPILLO et al., 1999). Histologicamente, observa-se uma reação inflamatória intensa, granulomatosa, devido à ação da *L. infantum* nos órgãos, principalmente, pele, fígado, baço, linfonodos, rins, olhos, ossos e intestinos. Há também a ação indireta do parasito, com deposição de imunocomplexos nas articulações, vasos, olhos e rins (BUENO, 2006; NOLI et al., 2006).

Lesões cutâneas são frequentes na LV em cães e possuem características diversas (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999). Estas lesões estão presentes em cerca 81 a 89% dos animais sintomáticos, podendo ocorrer isoladamente ou em conjunto com outros sinais ou alterações laboratoriais (BANETH et al., 2008; BOURDEAU 2009). Os principais padrões de lesões são: alopecia e descamação, ulcerações, nódulos e dermatite pustular. Ainda, é comum a apresentação de mais de um padrão de lesão (NOLI et al., 2006).

A alopecia e descamação estão presentes em cerca de 60% dos cães com alterações cutâneas, normalmente se apresentam simétricas, na cabeça, proeminências ósseas, extremidade de membros e ponta da cauda, podendo chegar a uma alopecia generalizada. Na cabeça, esta alopecia ocorre principalmente na região periocular dando um aspecto de “óculos”, além de lesões no focinho e nos pavilhões auriculares. O pelo fica fraco e quebradiço, a descamação é seca. Ao corte histológico, observa-se hiperqueratose e dermatite difusa não supurativa com infiltração de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos, sendo alguns, parasitados. Os cães que apresentam este

padrão de lesão são tidos como os mais imunocompetentes, já que foi identificado um número apropriado de células de Langerhans nessas lesões (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008).

A dermatose ulcerativa atinge aproximadamente 23% dos animais e caracteriza-se pela presença de úlceras, sem tendência para cicatrização, principalmente em proeminências ósseas, extremidade dos membros e junção muco-cutâneas. Histologicamente, notam-se úlceras limitadas por hiperplasia da epiderme e infiltrado celular misto (neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos) e ainda, alguns protozoários. Estes animais são considerados como de imuno competência intermediária (NOLI et al., 2006; ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008).

Já a forma nodular atinge cerca de 12% dos animais acometidos, há a formação de nódulos, por vezes ulcerados, com consistência variável e diâmetro que vai de alguns milímetros até 10 centímetros, com distribuição generalizada, atingindo a região torácica, lombar e falanges. Na histologia observam-se focos de necrose e infiltração de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes multinucleadas com grande número de parasitos. Não se observam células de Langerhans contribuindo para resposta imunitária ineficaz (NOLI et al., 2006; ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008).

Outras lesões a serem destacadas são a hiperqueratose, despigmentação do focinho e onicogribose, que ocorre em aproximadamente 20 a 31% dos cães sintomáticos. Estas lesões são devidas à presença de *L. infantum* na matriz ungueal e hipersensibilidade dos coxins plantares e palmares, dificultando o desgaste natural, além de inflamação da base ungueal e pele adjacente (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008; BANETH et al., 2008).

As lesões oftalmológicas são frequentes, podendo ocorrer isoladamente ou ainda serem a principal manifestação clínica de cães com LV (BRITO et al., 2006). As principais lesões são: conjuntivites, ceratites, uveítes, blefarite ulcerativa, conjuntivite granulomatosa refratária a tratamento, uveíte granulomatosa, edema de córnea, esclerite e hemorragia de retina (NOLI, 1999; PENA et al., 2000; GELLAT, 2003). Porém, em casos avançados pode haver ceratoconjuntivite seca, atrofia de íris, descolamento de retina, úlcera, glaucoma, catarata e exoftalmia (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008).

A conjuntivite decorre de uma reação inflamatória devido à deposição de imunocomplexos e presença da *L. infantum* no local (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008; BRITO et al., 2004). A ceratoconjuntivite seca decorre da destruição das glândulas lacrimais e obstrução das vias lacrimais causadas pela inflamação piogranulomatosa local e hipoestesia da córnea lesionada que levam a uma redução da produção e secreção de lágrimas (BRITO et al., 2006).

Nas pálpebras podem-se encontrar lesões granulomatosas semelhantes às alterações da conjuntiva ou ainda às lesões de pele, havendo formação de blefarite furfurácea e alopecia (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008).

As lesões musculares, articulares e ósseas podem surgir em animais com bom estado clínico levando a claudicações e enfraquecimento dos membros (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008). Há uma atrofia muscular seguida de caquexia, esta atrofia tem início nos músculos da cabeça e decorre da infiltração de células fagocitárias, da deposição de imunocomplexos e presença de anticorpos contra as fibras musculares (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008). Nos ossos observam-se lesões periósticas e intramedulares, assim como osteólise cortical e medular (BANETH et al., 2008); enquanto que, nas articulações, devido à deposição de imunocomplexos, há a ocorrência de sinovites, poliartrites, polimiosites e lesões ósseas podem ocorrer, causando dor, claudicação e atrofia muscular (SPRENG, 1993; KOUTINAS et al., 1999; McCONKEY et al., 2002; KOHN, 2007).

A LV afeta o sistema gastroentérico provocando gastrite e enterite que tanto podem ser causadas pelas alterações hepáticas e renais quanto pela lesão direta do parasito. As lesões gastroentéricas são acompanhadas por uma síndrome de má absorção, diarreia, hematoquesia, melena (NOLI et al., 2006; ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008). Outros sinais atípicos que podem surgir são nódulos na língua e gengiva (ROZE, 2005; PARPAGLIA et al., 2007).

A linfadenomegalia é comum e está presente em mais de 62% dos cães sintomáticos, sendo os mais acometidos: submandibulares, cervicais, pré-escapulares, axilares e poplíteos. Histologicamente, observa-se uma depleção de linfócitos e uma reação proliferativa de plasmócitos e macrófagos estando este último com o citoplasma repleto de *L. infantum*. Geralmente a carga parasitária destes linfonodos não tem correlação com o tipo e gravidade de outras lesões, sendo comum a regressão da

adenopatia à medida que a doença evolui (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008; BANETH et al., 2008). A linfadenopatia é um sinal bastante consistente, porém pode estar ausente em alguns casos (NOLI, 1999).

A esplenomegalia ocorre em 10 a 53% dos animais sintomáticos e está relacionada com a proliferação de monócitos e macrófagos e modificações no tecido. Há o desenvolvimento de vênulas e veias pulpare e desaparecimento de grande parte dos sinusóides que envolvem a polpa branca, bem como o aumento das fibras reticulares (BANETH et al., 2008). Assim, na fase aguda, o baço apresenta-se congestionado e aumentado de tamanho, já na fase crônica apresenta a cápsula espessada, atrofia e aumento de consistência (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008).

A medula óssea apresenta diminuição de consistência, aumento de plasmócitos e formação de granulomas ricos em macrófagos, granulócitos e linfócitos T (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008).

A lesão hepática mais característica é a inflamação crônica proliferativa, onde há lesão vascular, degeneração dos hepatócitos e infiltração celular, podendo haver hiperplasia, hipertrofia e mobilização das células de Kupffer. O infiltrado celular pode se apresentar de forma difusa ou em microgranulomas. Com a evolução da doença, as alterações e degenerações levam à necrose e formação de tecido fibroso, podendo chegar à cirrose (CAMPILLO et al., 1999; ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008). Já a hepatite crônica pode levar à hepatomegalia, vômito, poliúria, polidipsia, anorexia e perda de peso (NOLI et al., 1999). Colite ulcerativa crônica com diarreia profusa e melena, além de enterite aguda hemorrágica já foi associada à LV (FERRER et al., 1991; DENEROLLE, 1996).

No miocárdio, há formação de granulomas ricos em macrófagos, granulócitos e linfócitos T (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008; MENDES et al., 2014).

Nos pulmões, há alterações vasculares e pneumonia do tipo exsudativo, com infiltração linfoplasmocitária, observa-se a presença de macrófagos parasitados, na clínica ocorre dispneia e hemoptise (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008).

Caso a mucosa das fossas nasais apresente poucas lesões, o único sinal clínico será o de espirros persistentes. A epistaxe está presente em 6 a 10% dos animais sintomáticos, podendo ser uni ou bilateral (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008).

A epistaxe é comum e ocorre devido às lesões ulcerativas na mucosa nasal e/ou coagulação diminuída (SLAPPENDEL, 1988). Rinites também podem estar presentes (NELSON & COUTO, 2010).

No aparelho reprodutor, nos machos, destaca-se orquite intersticial linfoplasmocítica, epididimite e balanopostite (DINIZ et al., 2005; ROSYPAL et al., 2005).

Em relação aos sinais neurológicos, pode-se destacar: hipoestesia, hiperestesia, paresia e paralisia, que pode se apresentar de forma paraplégica ou afetando nervos periféricos, como o nervo ciático (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008).

As lesões normalmente são discretas, estando associadas à deposição de imunocomplexos no plexo coroide, podendo predispor a uma degeneração neuronal, mobilização de células da glia e acúmulo de substância amiloide. Até agora ainda não foram isoladas formas amastigotas no sistema nervoso central (LIMA et al., 2003; NOLI et al., 1996).

2.3. Lesões Renais

Há um frequente envolvimento renal, sendo muitas vezes a doença renal a única manifestação clínica apresentada, podendo ir de uma proteinúria assintomática até uma grave síndrome nefrótica ou insuficiência renal crônica (IRC), esta causando uma degradação do estado geral e sendo a principal causa de morte em cães acometidos (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008; BOURDEAU, 2009; MILLER, 1995; FONT et al., 1993). Entre as alterações histopatológicas, as mais comuns são: glomerulonefrite e nefrite túbulo-intersticial, raras vezes detecta-se amiloidose (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Já foi descrita a insuficiência renal aguda, rápida e fatal, mesmo sem a presença de outros sinais clínicos (CIARAMELLA et al., 1997). Apesar das lesões renais em cães e humanos com LV serem similares, nesta última, a patogênese ainda não foi elucidada (COSTA et al., 2003). As lesões glomerulares decorrem da deposição de imunocomplexos circulantes na membrana basal glomerular (TAFURI et al., 1989).

Inicialmente ocorrem alterações nos túbulos renais, levando à degeneração hidrópica e hialina, atrofia ou dilatação tubular, há presença de cilindros hialinos, calcificação e necrose que progridem de acordo com o avanço da doença (CAMPILLO et al., 1999; GOMES et al., 2008).

A nefrite intersticial aguda ou crônica é comum, pode haver edema, degeneração tecidual, fibrose, infiltrado linfoplasmocitário e alguns macrófagos parasitados com *L. infantum* (GOMES et al., 2008). Por haver a identificação de depósitos de imunoglobulinas e frações do complemento, acredita-se que haja uma origem imunológica (SOARES, MORAIS & MORAIS, 2009). Já a interação dos antígenos de *leishmania*, existentes no interstício renal com os linfócitos T foi descrita como o mecanismo básico das lesões túbulo-intersticiais e é mediada por macrófagos do infiltrado inflamatório e células epiteliais tubulares, as quais apresentam atividade fagocitária e atuam como APC (GOMES, 2007). É importante notar que a nefrite intersticial parece não ter relação ou influência com o tipo de glomerulonefrite apresentada (GOMES et al., 2008).

A glomerulonefrite está associada à deposição de imunocomplexos (BANETH et al., 2008). Alguns estudos mostraram que há a presença de depósitos de imunoglobulinas, principalmente Giga e Gim e da fração C do complemento, o que reforça a importância das reações imunológicas na patogenia das lesões (PIRES et al., 2012). Os linfócitos T $CD4^+$ também foram implicados no desenvolvimento da glomerulonefrite (COSTA et al., 2000).

Após haver a deposição dos imunocomplexos nas paredes dos capilares glomerulares é que ocorre a ativação do complemento, a infiltração de neutrófilos, a agregação plaquetária, ativação da cascata de coagulação e deposição de fibrina. Nos glomérulos pode haver a proliferação celular, espessamento da membrana basal e, eventualmente, hialinização e esclerose (NELSON & COUTO, 2010).

Os critérios de classificação das glomerulonefrites pela Organização Mundial de Saúde são: Glomerulopatia com alterações mínimas; glomeruloesclerose segmentar focal; glomerulonefrite membranoproliferativa; glomerulonefrite proliferativa mesangial; glomerulonefrite membranosa; glomerulonefrite crescêntica; glomerulonefrite crônica (CHURG et al., 1985).

Na glomerulopatia com alterações mínimas, os glomérulos apresentam-se normais ou com alterações muito discretas à microscopia de luz, podendo haver ligeira expansão da matriz mesangial com ou sem proliferação celular e os capilares podem apresentar um aspecto rígido (GODOY, 2000).

Na glomeruloesclerose segmentar focal, os glomérulos apresentam esclerose parcial (segmentar) em um ou mais lóbulos (GODOY, 2000). Acomete principalmente glomérulos da região justaglomerular (ANTONOVYCH & MOSTOFI, 1980; GODOY, 2000). Há espessamento da cápsula de Bowman e presença de áreas com aspecto hialino, as quais se mostram positivas na coloração do ácido periódico de Schiff (PAS), na porção glomerular afetada (COSTA et al., 2003).

A glomerulonefrite membranoproliferativa também é chamada de glomerulonefrite capilar mesangial, observam-se alterações pronunciadas no mesângio e nas alças capilares glomerulares (GODOY, 2000), há espessamento e duplicação da parede dos capilares glomerulares (visualizada na coloração Prata-Metamina PAMS), associada à lobulação e proliferação celular acentuada do tufo glomerular porque há proliferação das células mesangiais e aumento da matriz do mesângio (ANTONOVYCH & MOSTOFI, 1980; COSTA, 2003).

A principal característica da glomerulonefrite proliferativa mesangial é a proliferação global e difusa de células mononucleares no mesângio, o que leva a uma expansão e um aumento da matriz mesangial. O tufo glomerular preenche quase todo o espaço da cápsula de Bowman (COSTA, 2003).

Já na glomerulonefrite membranosa, há um acentuado espessamento e duplicação da membrana basal dos capilares glomerulares, não há aumento de celularidade mesangial (FIGUEIREDO, 1994). Porém, a arquitetura glomerular se mantém preservada e as alterações acometem os glomérulos de forma homogênea (SOARES et al, 2005), com a progressão da lesão, a espessura das paredes das alças vai aumentando, até estreitar ou fechar completamente o lúmen capilar (ANTONOVYCH & MOSTOFI, 1980).

Na glomerulonefrite crescêntica, há proliferação extracapilar de células epiteliais parietais, células mononucleares e fibroblastos, ocupando parcial ou totalmente o espaço de Bowman de modo segmentar ou circunferencial, fechando o tufo capilar seja em maior ou em menor intensidade (COSTA et al., 2003).

E por fim, a glomerulonefrite crônica (atrofia glomerular), que é o estágio final das diversas glomerulonefrites descritas (GODOY, 2000). Nesta, boa parte dos glomérulos exibe uma intensa proliferação da matriz mesangial e obstrução do lúmen capilar (esclerose capilar), o tufo glomerular transforma-se em uma massa amorfa,

atrófica, hipocelular ou até mesmo acelular (ANTONOVYCH & MOSTOFI, 1980; COSTA et al., 2003). Há fibrose, atrofia tubular e infiltrado inflamatório severo mononuclear (FIGUEIREDO et al., 1994; COSTA et al., 2003).

Já a glomeruloesclerose segmentar focal ocorre principalmente nos glomérulos justamedulares, onde se pode observar a proliferação de colágeno, alterações dos podócitos e hiper celularidade ao redor das zonas de esclerose glomerular (COSTA et al., 2003).

A amiloidose é descrita em um número reduzido de cães sintomáticos, podendo ser responsável pelo aparecimento de lesões glomerulares e IRC (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Na microscopia pode-se identificar a deposição de material amiloide através da visualização de material amorfo, acelular, de aspecto vítreo, geralmente eosinofílico e que se cora em rosa no vermelho congo (REIS et al., 2001).

A LV provoca lesões renais intersticiais e tubulares graves, estreitamente relacionadas com a alteração da função renal, independentemente da presença de alterações glomerulares (GOMES et al., 2008; COSTA et al., 2003; ZATELLI et al., 2003). Por sua vez, a presença de lesões glomerulares irreversíveis que são causadas pela amiloidose ou pela glomerulonefrite vai contribuir para uma perda de função do néfron sendo substituído por tecido fibroso. Por consequência, a redução do número de néfrons, leva a uma redução da taxa de filtração glomerular levando à retenção de sódio e hipertensão sistêmica, enquanto isso, os néfrons restantes tentam compensar, aumentando a taxa individual de filtração glomerular, porém esta “hiperfiltração” agrava ainda mais as lesões (NELSON & COUTO, 2010).

Mesmo sendo alta a prevalência de patologia renal, a azotemia, típica em falha renal é um achado laboratorial incomum e se torna evidente apenas quando mais de 75% dos néfrons estão afunacionais o que costuma ocorrer apenas em fase mais tardia da doença e quando os dois rins já estão seriamente comprometidos (GRAUER, 2005; COOK & COWGILL, 1996; LOPES et al., 2007).

Como consequência deste processo, há perda urinária de proteínas plasmáticas, como a albumina, que ocorre pelo aumento da permeabilidade da membrana basal glomerular, resultando em aumento das lesões glomerulares e túbulo-intersticiais o que pode acarretar o surgimento de alterações clínicas que são compatíveis com a síndrome nefrótica, como hipoalbuminemia, ascite, edema de membros e hipercolesterolemia. A

ascite e o edema são resultados da diminuição da pressão oncótica plasmática e aumento da atividade da aldosterona que leva à retenção de sódio e por consequência de água. Já a hipercolerestemia é resultado do aumento da síntese hepática de proteínas e lipoproteínas e diminuição de catabolismo (NELSON & COUTO, 2010).

A glomerulonefrite está frequentemente associada à deposição de imunocomplexos e quando está presente é do tipo membranoproliferativa e mesangioproliferativa (PLEVRAKI et al., 2006).

A deposição de imunocomplexos nos glomérulos pode ser a causa da glomerulonefrite membranoproliferativa e da nefrite intersticial com comprometimento da função renal (LOPES et al., 1996). A nefropatia pode ser causada pelo infiltrado de células TCD4⁺ (COSTA et al., 2000; COSTA et al., 2010). A doença renal pode ser a única patologia apresentada pelos cães com LV, o que pode progredir da proteinúria leve a síndrome nefrótica chegando a um quadro de falha renal, sendo esta uma das principais causas de morte dos cães com LV (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Desta forma, torna-se essencial a avaliação da função renal dos cães com LV, de forma a diagnosticar precocemente a doença renal, podendo assim prolongar a vida (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

A IRC é caracterizada quando há perda progressiva definitiva e irreversível da massa funcional e estrutural dos rins, onde se observa uma queda na taxa de filtração glomerular de 50% (WAKI et al., 2010). Clinicamente, só se observa quando 75% dos rins estão comprometidos (GOMES et al., 2008). Os sinais clínicos de IRC mais característicos são: Perda de peso, letargia, anorexia, poliúria, polidipsia, palidez das mucosas, desidratação, vômitos, sendo mais raro úlceras, estomatite, hematêmese, melena, diarreia, hipertensão arterial, descolamento de retina, estupor e ataxia (ELLIOT & LETEBVRE, 2008).

Durante a evolução clínica da doença nos animais naturalmente infectados, há alterações sorológicas, parasitológicas, bem como nos parâmetros bioquímicos, estando estes diretamente relacionados com a situação clínica do animal, sendo, portanto, de extrema importância a averiguação destes parâmetros na rotina clínica (REIS et al., 2006).

Nos achados laboratoriais hematológicos, a anemia normocítica normocrômica arregenerativa é frequente em cães acometidos (FEITOSA et al., 2000; MOURA et al.,

2002; SOARES et al., 2005; REIS et al., 2006; AGUIAR et al., 2007; COSTA-VAL et al., 2007; DIAS et al., 2008). Enquanto que AMUSATEGUI et al.(2003), encontrou uma correlação entre anemia e a severidade dos sinais clínicos apresentados pelos animais.

Na série leucocitária podem ser encontradas tanto leucocitose (SLAPPENDEL et al., 1988; CIAMARELLA et al., 1997; MOURA et al., 2002; AMUSATEGUI et al., 2003; SOARES et al., 2005; AGUIAR et al., 2007) quanto leucopenia (AMUSATEGUI et al., 2003; SOARES et al., 2005); Há um aumento no número de bastonetes (AGUIAR et al., 2007) e eosinofilia associada às alterações cutâneas (DIAS et al., 2008). Trombocitopenia também já foi descrita (MOURA et al., 2002; SOARES et al., 2005).

Como principal alteração, encontra-se a hiperglobulinemia, isso ocorre porque há a ativação de células B policlonais produzindo anticorpos (RAMOS et al., 1994; NOLI et al., 1999; MOURA et al., 2002; AMUSATEGUI et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005). Encontra-se uma hipoalbuminemia decorrente das perdas renais, doenças hepáticas ou desnutrição (RAMOS et al., 1994; AMUSATEGUI et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005); Observa-se também um aumento das proteínas totais séricas devido à hiperglobulinemia, porém esta proteína total sérica pode estar dentro da normalidade se, paralelo à hiperglobulinemia houver uma hipoalbuminemia intensa (LAPPIN,2004). Na eletroforese das proteínas totais observa-se uma característica típica da doença, a diminuição da albumina, junto com um aumento da β e γ -globulinas (CIAMARELLA et al., 1997; AMUSATEGUI et al., 2003). As globulinas β -1 e β -2 aumentam principalmente na fase inicial da doença, em seguida, aumentam as β -3 e γ -globulinas à medida que a infecção evolui (AMUSATEGUI et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005).

Quanto à azotemia e uremia, estas tem sido relatadas em frequência que variam de acordo com a evolução da doença renal causada pelo parasito (SOARES et al., 2005). A proteinúria é frequentemente diagnosticada com consequência da doença renal sendo ocasionada pelo aumento da permeabilidade capilar glomerular à proteína do plasma, em especial, a albumina (NIETO et al., 1992; MOURA et al., 2002; COSTA et al., 2003; SOARES et al., 2005).

No exame de sedimentos da urina pode-se encontrar também: hemácias e leucócitos (NIETO et al., 1992; MOURA et al., 2002; COSTA et al., 2003; SOARES et al., 2005).

Já foi relatada a presença de DNA da *Leishmania spp* em urina de cães acometidos, numa frequência de 25% em um estudo realizado com 40 animais, no entanto, ainda não está esclarecida nem a origem nem o que define a presença ou não na urina (FRANCESCHI et al., 2007).

2.4. Métodos Diagnósticos

Quanto aos métodos diagnósticos para detecção da LV existem três principais que são: parasitológico, sorológico e molecular (NOLI, 1999; GONTIJO & MELO, 2004).

O teste parasitológico consiste na identificação das formas amastigotas livres ou dentro de macrófagos em aspirados de linfonodos, baço ou medula óssea, posteriormente corados com Wright ou Giemsa (LAPPIN, 2004; REIS et al., 2006). Estas formas amastigotas são identificadas por sua morfologia que vai de esférica a ovóide e tamanho de 2-5µm, possuindo um núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado, são visualizadas ao microscópio de luz, em aumentos de 400x ou 1000x (SLAPPENDEL & FERRER, 1998; SUNDAR & RAI, 2002). A presença de um único parasito já é suficiente para o diagnóstico da doença (GONTIJO & MELO, 2004). Vantagens da técnica: Fácil, rápida, barata e baixa lesão tecidual (FERRER, 1999). Entretanto, os parasitos não são sempre encontrados com esta técnica, especialmente em casos crônicos (MILLER, 1995). A especificidade do teste é de 100%, porém a sensibilidade é baixa, variando de 50 a 70% nos esfregaços de medula óssea e menos de 30% em esfregaços de linfonodos (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999); porém, quando se usa a imunohistoquímica, aumenta bastante a sensibilidade (FERRER et al., 1988). A princípio, parece não haver relação entre a severidade dos quadros clínicos e o número de parasitos encontrados (DENEROLLE, 1996). Pode-se também semear o material coletado em meio de cultura específico (BRASIL, 2006; PRATA & SILVA, 2005), há a desvantagem da necessidade de um período de 3-5 dias para que haja o início do crescimento das formas promastigotas e também laboratórios específicos, sem contar a baixa sensibilidade, sobretudo no início da doença (REALE et

al., 1999). Mesmo sendo útil, o isolamento do parasito não é feito rotineiramente (FERRER, 1999).

Testes sorológicos detectam anticorpos circulantes anti-leishmania (LAPPIN, 2004; QUEIROZ et al., 2010). Os testes mais utilizados atualmente são o ensaio imunoenzimático (ELISA); a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (BRASIL, 2006); a imunocromatografia; o teste de aglutinação direta; a técnica de Western Blot. Os primeiros, no entanto, tem baixa especificidade possibilitando a reação cruzada com outras espécies da família Trypanosomatidae e também com organismos filogeneticamente distantes (SILVA et al., 2014; QUEIROZ et al., 2010; GONTIJO & MELO, 2004). Quanto à interpretação dos testes, esta deve ser feita de forma cautelosa, já que pode haver falha em detectar cães infectados no período pré-patente antes da soro conversão, também em animais que nunca farão a soro conversão e ainda naqueles positivos que se converteram em soronegativos, porém ainda são infectados (FERRER et al, 1995; LEONTIDES et al., 2002). O ELISA apresenta sensibilidade de 95 a 99,5% e especificidade de 97,1 a 100% (BADARÓ et al., 1996). Já a RIFI apresenta sensibilidade de 90 a 100% e especificidade de 80% (ALVES & BEVILACQUA, 2004). A imunocromatografia é uma técnica qualitativa, rápida e de fácil execução. Apresenta especificidade de 93% e sensibilidade de 97% (ASSIS et al., 2008).

Hoje há kits comerciais constituídos por tiras de papel de nitrocelulose impregnadas com antígenos recombinantes, por exemplo, a proteína rk39 e com anti anticorpos com outro coloidal. Os anticorpos anti-leishmania específicos, são detectados sendo que o resultado positivo é demonstrado por duas linhas (controle e amostra); quando o resultado é negativo aparece apenas a linha de controle e caso a linha de controle não seja visível, o teste é considerado como inválido (OTRANTO et al., 2005; CLWG, 2007).

No teste de aglutinação direta, é utilizada uma solução diluente para facilitar a incubação do soro em estudo com o antígeno figurado, é feita a leitura visual do resultado em alguns minutos. Este teste tem alta sensibilidade e especificidade, baixo custo, é de simples execução, não há necessidade de equipamentos específicos, permite detectar baixos níveis de anticorpos mesmo durante a fase inicial da doença ou ainda nos casos assintomáticos. Encontram-se, no mercado, testes rápidos baseados nessa

técnica (CAMPILLO et al., 1999; GONZÁLEZ, 2007; PEREIRA DA FONSECA & VILLA DE BRITO, 2008).

A técnica de Western Blot consiste em detectar os anticorpos anti-*Leishmania*, e também determinar a sua especificidade junto a diferentes frações do antígeno. É bastante sensível e específica, importante na detecção de fases iniciais da doença e de portadores assintomáticos, quando a produção de anticorpos é mais reduzida, identifica também reações cruzadas com outras infecções. É um método complexo, caro, requer um profissional habilitado, por isso se restringe a investigações laboratoriais, não é utilizado na rotina de laboratório (CAMPILLO et al., 1999; GONZÁLEZ, 2007).

Há também os métodos de avaliação da resposta imunitária celular, utilizados nos animais onde há manifestações clínicas da LV ou ainda no estudo de casos onde há resistência à doença. São elas: Reação de Montenegro e Citometria de Fluxo. Na Reação de Montenegro é indicada sobretudo para estudos epidemiológicos e avaliação quanto à evolução da doença durante o tratamento, para isso, inocula-se por via intradérmica, o antígeno da *Leishmania* e após 72 horas realiza-se a medição o diâmetro do eritema formado. Quando negativo, quer dizer que não houve contato com o protozoário, ou ainda, imunossupressão, o que é comum em cães sintomáticos. Nos animais assintomáticos, há uma forte reação (GONZÁLEZ, 2007; PEREIRA DA FONSECA & VILLA DE BRITO, 2008).

Já na Citometria de Fluxo, se faz a contagem de diferentes subpopulações de linfócitos CD3⁺ ou CD5⁺ (linfócitos T), CD21⁺ (linfócitos B), CD4⁺ (linfócitos T helper) e CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos). Pode ser útil no diagnóstico de LV, uma vez que há redução do número de linfócitos B, das células T CD4⁺ em animais com manifestações clínicas. Quando do tratamento, há a descrição de aumento do número e porcentagem de linfócitos TCD4⁺, o que leva a crer que estes parâmetros podem ser bons indicadores do prognóstico. Porém, só é utilizado na investigação científica, não estando disponível na rotina (FERRER, 2002; CLWG, 2007).

A biologia molecular permite realizar o exame de identificação de DNA do parasito, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (REALE et al., 1999; GOMES, 2007).

É um método sensível para detecção do parasita, independe da condição imunológica ou história clínica do animal (GONTIJO & MELO, 2004). Apresenta

sensibilidade e especificidade muito alta, próximas a 100% (ASHFORD et al., 1995; FERRER, 1999). É possível detectar DNA e amplificar quantidades mínimas do parasito em uma grande variedade de tecidos, incluindo sangue, medula óssea, aspirados de linfonodos, biópsia cutânea e cortes histológicos de tecidos parafinados, utilizando para isto sequências específicas (*primers*) (MAIA, 2005; XAVIER et al., 2006; GOMES et al., 2007; PEREIRA DA FONSECA & VILLA BRITO, 2008) uma desvantagem é o alto custo e a necessidade de laboratórios bem equipados e habilidade técnica (FERRER, 1999). Em amostras de medula óssea a PCR tem apresentado melhores resultados em relação ao sangue e à pele, uma vez que nas amostras de sangue a sensibilidade é baixa, o que pode ser devido ao número de parasitos presentes no sangue periférico (GARCIA & MARCONDES, 2007).

Os dados obtidos com a PCR devem sempre ser relacionados com a clínica do animal, exames físicos, laboratoriais e sorológicos (SOLLANO-GALEGO et al., 2009). No entanto, a PCR ainda precisa se tornar uma técnica mais simples e ter seu custo diminuído de forma que seu uso seja difundido na rotina clínica (GONTIJO & MELO, 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D. V. V.; COSTA, R. L. G.; JULIÃO, F. S.; SANTOS, W. L. C.; BARROUIN-MELO, S. M. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p. 283-294, 2007.
- ALENCAR, J. E.; NEVES, J. DIETZE, R. Leishmaniose visceral. In VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1082 p, 1991.
- ALEXANDRE-PIRES, G.M.; CORREIA, J.J. Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In G.M. SANTOS-GOMES & I.M. PEREIRA DA FONSECA. **Leishmaniose canina**, p.53-68, Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008.
- ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.3-4, p.227-232, 2005.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA R.; MORENO, J.; NIETO J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, n. 57,p.1-88, 2004.
- ALVAR, J.; VÉLEZ I. D.; BERN C.; HERRERO, M.; DESJEUX, O.; CANO J.; JANNIN, J.; BOER, M. D. WHO THW LEISHMANIASIS CONTROL TEAM **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence**. Plos one, v.7, n.5, p.1-12, 2012.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, v.20, n.1, p.259-265, 2004.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v.18, p.147-156, 2003.
- ANTONOVYCH, T. T.; MOSTOFI, F. K. **Atlas of Kidneys Biopsies**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 386p, 1980.
- ASHFORD D. A.; BOZZA M.; FREIRE M.; MIRANDA J. C.; SHERLOCK I.; EULÁLIO C.; LOPES U.; FERNANDES O.; DEGRAVE W.; BARKER J. R.; BADARÓ R. DAVID J. R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology

for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** v.53, n.3, p. 251-255, 1995.

ASSIS, T. S. M.; BRAGA, A. S. C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C.; COSTA, C. H. N.; COSTA, D. L.; OLANDA, T. A.; SOARES, V. Y. R.; BIÁ, M.; CALDAS, A. J. M.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.17n.2, p.107-116, 2008.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULALIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRO-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, R.L.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J.R.; REED, S.G. rK39: cloned antigen for *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v,173,p.758-761, 1996.

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

BOURDEAU, P. J.(2009) Update on canine leishmaniosis: From infection to optimized management. **Proceedings of the Bayer Pre-Congress Symposium**, Bled, Slovenia, p.10-27, 2009.

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

BRAZIL, R. P.; GOMES, B.B. Bionomia. In: RANGEL, E. F., LAINSON, R. (Orgs). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 368 p, 2003.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; ORTIZ, J. P. D. ; MAIA, F. C. L; SILVA JUNIOR, V. A.; LAUS, J. L. Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from the, Olinda city, Pernambuco, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v34, n.3, p.925-929, 2004.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; MAIA, F. C. L; LAUS, J. L.; MEUNIER I. M. J. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arq. Bras. Med. Vet. E Zootec.**, v. 58, n.5, p.768-775, 2006.

BUENO, R. **Estudo do gene Nramp 1 canino em macrófagos infectados com *Leishmania (leishmania) chagasi***. Tese de doutorado. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo:1ª. ed. Rocca, 376 p, 2004.

CAMPILLO, M. C.; VASQUEZ, F. A. R.; FERNANDEZ, A. R. M.; ACEDO, M. C. S.; RODRIGUEZ, S. H.; LOPEZ-COZAR, I. N.; BAÑOS, P. D.; ROMEROM, H. Q.; VARELLA, M.C. **Parasitologia veterinária**, Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1999.

CARRERA, M. **Insetos de Interesse Médico e Veterinário**. Curitiba:Ed. Universidade Federal do Paraná, 228 p, 1991.

CHURG, J.; BERNSTEIN, J.; GLASSOCK, R. J. (1985) **Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Disease**. 2^a. Ed. New York:Igaku-Shoin. 541 p, 1985.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem (nota prévia). **O Hospital**, v11, p.5-9, 1937.

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

CLWG Canine leishmaniasis:Guidelines for diagnosis, staging, therapy, monitoring and prevention. **Canine leishmaniasis working group**. 19 p, 2007.

COOK, A. K.; COWGILL, L. D. Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a reaview of 137 cases (1985-1992). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.32, n.4, p.313-322, 1996.

CORTADELLAS, O.; PALACIO, M. J. F.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease at diferente stages of severity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.24,n.1, p.73-79, 2010.

COSTA, F. A. L.; GUERRA, J. L.; SILVA, S. M. M. S.; KLEIN, R. P.; MENDONÇA, I. L.; GOTO, H. CD⁴⁺ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med.Res**, v.33, n.12, p.1455-1458, 2000.

COSTA, F. A. L. **Patologia e imunopatogenia da nefropatia da leishmaniose visceral canina**. São Paulo:USP, Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2001.

COSTA, F. A. L.; GOTO, H., SALDANHA; L. C. B.; SILVA, S. M. M. S.; SINHORINI, I. L.; SILVA, T. C.; GUERRA, J. L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v.40, n.6, p.677-684, 2003.

COSTA, F. A. L.; PRIANTI, M. G.; SILVA, S. M. M. S.; GUERRA, J. L.; GOTO, H. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. **BMC Infectious Diseases**, v.10, p.112, 2010.

COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis. A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.2, p.232-242, 2011.

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S. M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, O.; MELO, M. N.; (2007) Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *lutzomyia (lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v.174, n.3, p.636-643, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.1, p.117-118, 2006.

DENEROLLE, P. Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du treatment. **Pratique Médicale et Chirurgicale de L'Animal de Compagnie**.v.31, p.137-145, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. Comparative Immunology. **Microbiology and Infectious Disease**, v27, n.5, p.305-318, 2004.

DIAS, E. L.; BATISTA, A. L.; GUERRA, R. M. S. N. C.; CALABRESE, K. S.; LIMA, T. B.; ABREU-SILVA, A. L. Canine visceral leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematology and biochemical findings of dogs naturally infected in a endemic área of São José do Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n.3, p.740-745, 2008.

DINIZ, S. A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M.; BUENO, R.; REIS, B. P.; TAFURI, W. L.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania sp.* in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v.42, n.5, p.650–658, 2005.

ELLIOT, D. & LEFEBVRE, H. **Chronic renal disease: the importance of nutrition**. In P.PILOT, V. BIOUGE & D. A. ELLIOT (Eds), Encyclopedia of canine clinical nutrition, 2008. Disponível em < <http://www.ivis.org/advances/rc/toc.asp>> acesso em: 10 de fev de 2011.

FEITOSA, M. M.(2006) **Avaliação clínica de animais naturalmente infectados**. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, I, 2006, Jaboticabal, Anais... Jaboticabal, p. 9-13, 2006.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILLA, D.; RAMOS, J.A.; DOMINGO, M. (1988) Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.29, p.381-388, 1988.

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

FERRER, L.; AISA M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v.36, n.20, p.514-516, 1995.

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

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. **Proceedings of the second leishmaniasis international canine leishmaniasis forum**, Granada, 2002. Disponível em< <http://www.studioveterinariosanrocco.it>> acessado em 9 de fevereiro de 2013.

FIGUEIREDO, L. M. A.; IAMAGUTI, P.; BANDARRA, E. P.; SEQUEIRA, J. L. Estudo anátomo-imuno-histopatológico e ultra-estrutural das glomerulonefrites em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v6, p.65-76, 1994.

FINCO, D. R. In: Kaneko, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. California: Academic Press, 916 p, 1997.

FONT, A.; CLOSA, J. M.; MOLINA, A.; MASCORT, J.(1993) Trombosis and nephrotic syndrome in a dog with visceral leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.34, n.9, p.466-470, 1993.

FRANCESCHI, A.; MERILDI, V.; GUIDI, G.; MANCIANTI, F. Occurrence of *leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. **Veterinary Research Communications**, v.31, n.3, p.335-341, 2007.

GARCIA, F. A. I; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista Clínica Veterinária**. v.71, p.34-42, 2007.

GELLAT, K. N. **Manual de oftalmologia veterinária**. 3ª. ed. São Paulo: Ed. Manole, 594 p, 2003.

GODOY, P. Sistema Urinário. In: FILHO, G. B. **Bogliolo patologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 421-480, 2000.

GOMES, L. **Nefrite intersticial na leishmaniose visceral**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal. Teresina:Universidade Federal do Piauí, 2007.

GOMES, L. A.; GOTO, H.; GUERRA, J. L. G.; MINEIRO, A. L. B.; SILVA, S. M. M. S.; COSTA, F. A. L. Lesões renais intersticiais e tubulares na leishmaniose visceral. **RPCV**. v. 103, n.567-568, p. 157-163, 2008.

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

GONZÁLEZ, L. I.; **Diagnóstico de la leishmaniosis críptica en el perro. Expresión isotípica e idiotípica de los anticuerpos producidos en distintas fasea de la infección.** Tese Doutorado. Barcelona: Facultat de farmàcia – Universitat de Barcelona, 2007.

GRAUER, G. F. Glomerulonephritis. Seminars. **Veterinary medicine and surgery**, v.7, p.187-197, 1992.

GRAUER,G. F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 46, n.10, p.469-478, 2005.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v.354, p.1191-1199, 1999.

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

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

KOHN, B. Canine immune-mediated polyarthritis. **The European Journal of Companion Animal Practice**. v. 17, n.2, p.119-124, 2007.

LAPPIN, M. R. Infecções por protozoários e mistas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna Veterinária**. 5a. ed. Rio de Janeiro: Ed. Manole, 2236 p, 2004.

LAISON, R.; SHAW, J. J.(1978) Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. **Nature**, n.273, p.595-600, 1978.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. (2002) A cross-sectional study of *leishmania spp.* infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.11-2, p.19-27, 2002.

LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FEITOSA M. M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with

visceral leishmaniasis, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 36, p.485-489, 2003.

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

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3ª ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007, 117 p.

MAIA, C. Diagnóstico laboratorial da leishmaniose canina. **Veterinária Técnica**, n. 2, p. 34-37, 2005.

MALLA, N.; MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis – some recent concepts. **Indian Journal of Medical Research**, n. 123, p.267-274, 2006.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001, 589 p.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n.5, p.341-352, 2013.

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

McCONKEY, S.; LÓPEZ, A.; SHAW, D.; CALDER, J. Leishmanial polyarthritis in a dog. **The Canadian Veterinary Journal**, v.43, n.8, p.607-609, 2002.

MENDES, R. S.; GURJÃO, T. A.; OLIVEIRA, L. N.; SANTANA, V. L.; TAFURI, W. L.; SANTOS, J. R. S.; DANTAS A. F. M.; SOUZA, A. P. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: aspectos clínicos e patológicos. **Arq. Bras. Med. Vet. E Zootec.**, v.66, n.1, p.79-84, 2014.

MENDONÇA, I. L.; ALVES, M. M. M.; BATISTA, J. F.; ROCHA, F. S. B.; SILVA, E. M. C. Alterações bioquímicas e hematológicas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (infantum) chagasi*. **Revista Clínica Veterinária**, v. 116, p.78-84, 2015.

MILLER, J. B. Zoonoses de pequenos animais. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Manole, 1995, 2257 p.

MONTEIRO E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R.A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. (2005) Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and

canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.38, n.2, p.147-152, 2005.

MORETTI, A. PIERGILI, F.D.; FARINELLI, M.; Leishmaniosi canina. **Obiettivi e Documenti Veterinari**, v.10, n.5, p.19-25, 1995.

MOURA, R. O. D.; PAULA, V. V.; SOARES, M. J. V.; SILVA, S. M. M. S. Alterações renais em cães (*canis familiaris*) soropositivos para leishmaniose: aspectos clínicos, laboratoriais e histopatológicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 2, p.61-64, 2002.

NELSON, R. W.; COUTO, G. C. Infecções polissistêmicas por protozoários. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2010, 1504 p.

NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A.; SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *leishmania* infection. **Veterinary Pathology**, v.45, n.1-2, p.33-47, 1992.

NOLI, N. **Canine Leishmaniasis**. Waltham Focus. v. 9, n.2, p.16-24, 1999.

NOLI, C.; LLOYD, D.; LOEFFLER, A.; SCHWENDENWEIN, I.; MEREDITH, A. Protozoal infections: Canine leishmaniasis. **Proceedings of Dermatology Course on the European School for Advanced Veterinary Studies**, Luxemburg, p. 19-27, 2006.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; SASANELLI, M.; LEONE, N.; CAPRARIS, D.; CHIRICO, J.; SPINELLI, R.; CAPELLI, G.; BRANDONISIO, O. Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n.1, p.32-37, 2005.

PARPAGLIA, M. L. P.; VERCELLI, A.; COCCO, R.; ZORBA, R.; MANUNTA, M. L. Nodular lesions of the tongue in canine leishmaniosis. **J. Vet. Med.**, v. 54, n.8, p.414-417, 2007.

PARANHOS-SILVA, M. FREITAS, L. A.; SANTOS, W. C.; JUNIOR, G.; PONTES, L. C. C.; SANTOS, A. J. O. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *L. chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n.1, p.39-44, 1996.

PENA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, v.3, n.1, p.35-41, 2000.

PEREIRA DA FONSECA, I. M.; VILLA BRITO, M. T. **Leishmaniose Canina**, Lisboa: Chaves Ferreira Publicações. 2008, p.83-92.

PINELLI, E.; LILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dog experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, n.1, p.229-235, 1994.

PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D., DEAL REAL, G.; RUITENBERG, E. J. *Leishmania infantum* – specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of immunology**, v. 25, n.6, p.1594-1600, 1995.

PINELLI, E.; RUTTEN, P. M. G. V.; RUITENBERG E. J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS:AN UPDATE. **Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum**, Barcelona, 1999, p.60-64.

PIRES, A. M. S.; COSTA, G. C.; GONÇALVES, E. G. R.; ALVIM, A. C.; NASCIMENTO, F. R. F. Aspectos imunológicos e clínicos da leishmaniose tegumentar Americana: uma revisão. **Rev. Ciênc. Saúde**, v.14, n.1, p.30-39, 2012.

PLEVRAKI, K.; KOUTINAS, A. F.; KALDRYMIDOU, H.; ROUMPIES, N.; PAPAZOGLU, L. G.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; SAVVAS, I.; LEONIDIS, L. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n.2, p.228-233, 2006.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 2025 p.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; STARKE-BUZETTE, W. A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação a RIFI e ELISA-teste. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.19, n.1, p.32-38, 2010.

RAMOS, G. P.; RANGEL FILHO, F. B.; BOTELHO, G. G.; VOGEL, J. Valores bioquímicos séricos de cães portadores de leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.16, n.5, p.192-196, 1994.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. **J. Clin. Microbiol**, v. 37, n.9, p.2931-2935, 1999.

REIS JÚNIOR, J. L.; SILVA, F. L.; RACHID, M. A.; NOGUEIRA, R. H. G. Amiloidose renal em cão Shar-pei: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n.4, p.420-423, 2001.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORRÊA-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*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n.3-4, p.102-116, 2006.

ROSYPAL A. C.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S. Canine Visceral Leishmaniasis and its emergence in the United States. **Vet Clin North Am Small Animal Pract.**, v.33, n.4, p. 921-937, 2003.

ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. **J. Parasitology**, v. 91, n.4, p.970-972, 2005.

ROZE, M. Canine Leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. **EJCAP**. n. 15, p.39-52, 2005.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FEITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12, n.3, p.315-317, 1998.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**. v. 20, n.5-6, p.471-489, 2009.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. Viral, rickettsial and protozoal skin diseases. In: **Muller & Kirk's, Small Animal dermatology**. 6ª. Ed. Philadelphia: Saunders, 2001, 1528 p.

SILVA, D. T.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ALVES-MARTIN, F.; PAIXÃO, M. S.; TENÓRIO, M. S.; LOPES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.23, n.2, p.179-186, 2014.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniosis. A review baseado n 95 cases in Netherlands. **Veterinary Quarterly**. n.1, p.1-16, 1988.

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**, Philadelphia: W.B. Saunders, 1990, 967 p.

SOARES, I. R. ; SILVA, S. O.; MOREIRA F. M; PRADO, L. G.; FANTINI, O. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v.197, n.8, p.665-669, 2013.

SOARES, M. J. V.; MORAES, J. R. E.; BORGES, V. P.; MIYAZATO, L. G.; MORAES, F. R. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.11, n.4, p.579-593, 2005.

SOARES, M. J. V.; MORAES J. R. E.; & MORAES, F. R. Renal involvement in canine leishmaniasis: a morphological and immunohistochemical study. **Arq. Bra. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n.4, p.785-790, 2009.

SOLANO-GALLEGÓ, L.; BANETH, G. Canine leishmaniosis - a challenging zoonosis. **EJCAP**, v.18, n.3, p.232-241, 2008.

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

SPRENG, D. Leishmanial polyarthritis in two dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.34, n.11, p.559-563, 1993.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**, v.9, n.5, p.951-958, 2002.

TAFURI, W. L.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; GENARO, O.; LEITE, V. H. R.; BARBOSA, A. J. A.; BAMBIRRA, E. A.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MAYRINK, W. Estudo, ao microscópio óptico e eletrônico, do rim de cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania (leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.31, n.3, p.139-145, 1989.

TILLEY, L.P.; SMITH JR., F.W.K. **Consulta veterinária em cinco minutos. Espécies canina e felina**. 3ª. ed., São Paulo: Manole, 2008, 1604 p.

TORRES, M. M; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. B; PAULA, D. A. J.; OLIVEIRA, A. C. S.; PESCADOR, C. A.; MENDOÇA, A. J.; NAKAZATO, L. Associação da carga parasitária renal com achados laboratoriais em cães com leishmaniose visceral. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n.5, p.894-896, 2013.

TOZ, S.O.; NASEREDDIN, A.; OZBEL, Y.; ERTABAKLAR, H.; CULHA, G.; SEVIL, N.; ALKAN, M. Z.; JAFFE, C. Leishmaniasis in Turkey: molecular

characterization of Leishmania from human and canine clinical samples. **Tropical Medicine and International Health**, v.14, n.11, p.1401-1406, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3156.2009.02384.x/pdf>>. Acesso em: 10 out. 2012.

XAVIER, S. C.; ANDRADE, H. M.; MONTE, S. J. H.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Comparision of paraffin – embedded skin biopsies from diferente anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dog using histological, immunohistochemicaland PCR methods. **BMC Veterinary research**, v.2, n.17, p.1-7, 2006.

WAKI, M. F.; MARTORELLI, C. R.; MOSKO, P. E.; KOGIKA, M. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos – abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.10, p.2226-2234, 2010.

ZATELLI, A.; BORGARELLI, M.; SANTILLI, R.; BONFANTI, U.; NIGRISOLI, E.; ZANATTA, R.; TARDUCCI, A.; GUARRACI, A. Glomerular lesions in dogs infected with Leishmania organisms. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n.5, p.558-561,2003.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O presente trabalho tem como objetivo identificar e avaliar as lesões histopatológicas ocorridas tanto nos rins, quanto nas vias urinárias de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* sejam eles sintomáticos ou não; estabelecendo uma correlação entre a carga parasitária e as lesões renais.

3.2. Específicos

- Demonstrar positividade da doença através de exames parasitológicos e sorológicos;
- Descrever as alterações bioquímicas decorrentes ou provenientes da doença em questão, analisando os seguintes parâmetros: Ureia, creatinina, cálcio, fósforo e albumina;
- Descrever as alterações histopatológicas ocorridas nas vias urinárias dos animais infectados;
- Realizar IHQ – Imunohistoquímica para detecção de amastigota no parênquima renal;
- Realizar PCR em tempo real das amostras para detecção de *Leishmania infantum*.

4. ARTIGO

4.1 Artigo

Artigo submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(Formatado de acordo com as normas da Revista)

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, IMUNOMARCAÇÃO E CARGA PARASITÁRIA EM ÓRGÃOS DO SISTEMA URINÁRIO DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)

Jacilene Lourenço da Silva^a, Vinícius Vasconcelos de Oliveira^a, Leucio Câmara Alves^b, Milena de Paiva Cavalcanti^c, Frederico Celso Lyra Maia^a, Valdemiro Amaro da Silva Júnior^{a*}

^aLaboratório de Imunopatologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

^bLaboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

^cFundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Pernambuco, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

*Autor para correspondência. Tel.: +55 81 33206430; fax:

E-mail: valdemiroamaro@gmail.com

Resumo: A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença de distribuição mundial causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. No Brasil, o principal vetor é o flebotômico *Lutzomyia longipalpis*, responsável por abrigar a forma promastigota infectante. O cão, por sua proximidade com o homem, é considerado o principal reservatório para a doença. Vários órgãos e sistemas podem ser afetados, incluindo o sistema urinário. O objetivo deste trabalho foi avaliar as lesões histopatológicas que ocorrem no sistema

urinário, as alterações bioquímicas e correlacionar com a carga parasitária e detecção do parasito. Foram utilizados 30 cães positivos para a doença, com presença do parasito em aspirado de medula óssea, provenientes da rotina do Hospital Veterinário da UFRPE. Foi coletado sangue para análise bioquímica com dosagem de ureia, creatinina, cálcio, fósforo e albumina, em seguida os animais foram submetidos à eutanásia. Amostras dos rins, ureteres, bexiga e urina foram coletadas para avaliação estrutural, imunohistoquímica e molecular. No estudo, as principais alterações observadas foram glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite proliferativa, glomerulonefrite crônica, nefrite intersticial e nefrose. Imunomarcção de formas amastigotas de *L. infantum* foram observadas em todos os órgãos do sistema, exceto nos ureteres. Foi possível observar que existe relação entre a carga parasitária e o grau de lesões e imunomarcção. Por outro lado, esta mesma carga parasitária não influencia nos parâmetros bioquímicos de avaliação renal.

Palavras-chave: Rins, leishmaniose, glomerulonefrite, imunohistoquímica, qPCR.

Abstract: Visceral leishmaniasis (VL) is a worldwide distribution of disease caused by *Leishmania infantum*. In Brazil, the main vector is the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, which sheltered the infective promastigote form. The dog, due to its proximity with the man, can be considered the main reservoir for the disease. Various organs and systems can be affected, including the urinary system. The aim of this study was to establish a relationship between the histopathological lesions in the urinary system, biochemical changes and parasite load and IHQ detection of the parasite. Thirty positive dogs from Veterinary Hospital of UFRPE were used in this experiment. Blood was collected and the serum was used to obtain the levels of urea, creatinine, calcium, phosphorus and albumin. After the euthanasia procedures, the tissue samples of the kidneys, ureters, bladder and urine were collected to evaluate structural, immunohistochemistry and molecular changes arising from leishmaniasis. In the study, the main histopathological changes were membranous glomerulonephritis, membranoproliferative glomerulonephritis, proliferative glomerulonephritis, chronic glomerulonephritis, interstitial nephritis and nephrosis. Immunostaining of amastigotes of *L. infantum* were observed in all organs of the system, except in the ureters. It was observed that there is a relationship between parasite load and the degree of injury and immunostaining. On the

other hand, the parasite load does not influence biochemical parameters of renal evaluation.

Keywords: Kidneys, leishmaniasis, glomerulonephritis, immunohistochemistry, qPCR.

1. Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença de distribuição mundial causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (DESJEUX, 2004). No Brasil, o principal vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, responsável por abrigar a forma promastigota infectante. (FEITOSA, 2006). Por sua vez, os hospedeiros vertebrados são animais selvagens (roedores, gambás, tamanduás, tatus, primatas, raposas, preguiças), animais domésticos (cães, gatos, equinos) e o homem. Dentre eles, o cão, por sua proximidade com o homem, é considerado o principal reservatório para a doença (FEITOSA, 2006; SOARES et al., 2013).

Os sinais clínicos da doença são amplos devido aos vários mecanismos patogênicos do parasito, diversidade de resposta imunológica apresentada e dos diferentes órgãos afetados (SOLANO-GALLEGO E BANETH, 2008). Sendo assim, podem-se encontrar lesões em diferentes órgãos e sistemas, dentre eles, o sistema tegumentar, músculo-esquelético, nervoso central e órgãos como coração, pulmões e olhos (NOLI et al., 2006; ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008 ; FEITOSA, 2006). Hepatoesplenomegalia e linfadenopatia são sinais bastante consistentes, porém, podem estar ausentes em alguns casos (NOLI, 1999).

Dentre os órgãos afetados, incluem-se os rins, sendo muitas vezes a doença renal a única manifestação clínica apresentada, podendo se observar desde uma proteinúria assintomática até uma grave síndrome nefrótica ou insuficiência renal crônica (IRC). Desta forma, as lesões renais causam uma degradação do estado geral e constituem a principal causa de morte em cães acometidos por LV (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008; BOURDEAU, 2009; MILLER, 1995; FONT et al., 1993). Por outro lado, já foi descrita a insuficiência renal aguda (IRA), rápida e fatal, mesmo sem a presença de outros sinais clínicos (CIARAMELLA et al., 1997).

Entre as alterações histopatológicas, a glomerulonefrite e nefrite túbulo-intersticial são comumente encontradas, raras vezes detecta-se amiloidose (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Apesar das lesões renais em cães e humanos com LV serem similares, nesta última, a patogênese ainda não foi elucidada (COSTA et al., 2003).

Em cães, as lesões glomerulares decorrem da deposição de imunocomplexos circulantes na membrana basal glomerular (TAFURI et al., 1989; BANETH et al., 2008). Por sua vez, a nefrite intersticial aguda ou crônica é comum, podendo haver edema, degeneração tecidual, fibrose, infiltrado linfoplasmocitário e alguns macrófagos parasitados com *L. infantum* (ALEXANDRE-PIRES & CORREIA, 2008; GOMES et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as lesões histopatológicas que ocorrem no sistema urinário, as alterações bioquímicas e correlacionar com a carga parasitária (qPCR) e detecção do parasito (IHQ). O estudo destes parâmetros seria de grande importância no estabelecimento do grau de comprometimento da função renal, uma vez que os protocolos de tratamento recentemente utilizados para o tratamento da LVC são potencialmente nefrotóxicos podendo levar ao agravamento do quadro clínico dos animais infectados sintomáticos e assintomáticos.

2. Material e Métodos

2.1 Amostras biológicas

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob número 23082.005355/2014.

Foram utilizados 30 cães, todos soropositivos ($R_{\text{IFI}} \geq 40$) e com presença de formas amastigotas de *L. infantum* na biopsia de medula óssea. Os animais foram provenientes da rotina do Hospital Veterinário da UFRPE. Os cães foram recebidos, tendo sido coletado 3 ml sangue venoso para posterior centrifugação, obtenção de soro e realização de exames de bioquímica. Posteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia de acordo com a resolução 1000/2012 do CFMV.

Após a constatação do óbito por criteriosa ausculta e observação de ausência de todos os reflexos/sinais vitais, iniciou-se a necropsia onde foram coletadas amostras dos rins (direito e esquerdo) em suas porções cortical e medular, ureteres e bexiga, além de urina. O material coletado foi devidamente armazenado em tubos de polipropileno de 2mL e congelados à temperatura de -20°C para posterior análise de qPCR e uma parte

deles, em recipientes plásticos com formalina tamponada a 10%, para posterior processamento laboratorial e análise histopatológica.

2.2 Análise bioquímica

As amostras de soro obtidas foram submetidas aos testes pelo método cinético/colorimétrico em analisador semiautomático (THERMO PLATE) utilizando kits comerciais (laboratório Koles®) para dosagens de ureia, creatinina, cálcio, fósforo e albumina (FINCO, 1997).

Os valores de referência utilizados no trabalho foram os descritos por BUSH, 2004.

2.3 Histopatologia

Feita a coleta, o material foi colocado em tubos de polipropileno e fixado em formalina tamponada a 10% por 48 horas. Após a fixação, as amostras foram submetidas ao processamento rotineiro para inclusão em parafina. Foram feitos cortes de 5µm os quais montados em lâmina e corados por Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômico de Gomori e Ácido Periódico de Schiff (PAS) (TOLOSA et al., 2003). Os cortes foram analisados em microscópio de luz e as patologias encontradas foram descritas quanto à presença de infiltrados inflamatórios e classificação das patologias existentes segundo a Tabela 1.

Tabela 1. Intensidade das reações inflamatórias e o comprometimento do órgão avaliado para a variável HE e para a determinação do número de formas amastigotas imunomarcadas através da IHQ.

“Score”	HE	IHQ
0	Nenhuma inflamação	Nenhuma forma amastigota detectada
1	Inflamação discreta	1 – 3 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica
2	Inflamação moderada	4 – 10 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica

Continuação Tabela 1.

3	Inflamação intensa	>10 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica
---	--------------------	---

2.4 Imunohistoquímica

O material destinado à imunohistoquímica foi processado para imuno-deteção de formas amastigotas de acordo com a metodologia descrita por Tafuri et al., 2004, com a utilização de soro de cão hiperimune como anticorpo primário de um sistema de detecção à base de estreptavidina-biotina-peroxidase disponível comercialmente (LSAB+ kit, Dako USA). A marcação foi revelada com diaminobenzidina (DAB).

O número de formas amastigotas imunomarcadas foi pontuado de 0 a 3 segundo número de formas amastigotas por campo de maior ampliação microscópica (Tabela 2).

2.5 Diagnóstico molecular

Extração de DNA

O DNA genômico do material coletado foi extraído utilizando-se o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen® Hilden-Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

PCR

A reação para detecção de DNA de *L. infantum* foi realizada utilizando-se os primers Linf.1-23F: 5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3' and Linf.1-154R: 5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3' e reagentes SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) 1x descritos por Cavalcanti et al., 2009.

A reação de qPCR foi realizada utilizando o ABI PRISM 7500 system (Applied Biosystems). O protocolo de amplificação constituiu-se de uma desnaturação inicial passo a 95° C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de amplificação (95° C/15 s, 60° C/1 min). Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata contendo em cada bateria de reação controle negativo (Non-template controls) e positivo (curva-padrão de *L. infantum*).

2.6 Análise estatística

Para a análise dos dados, utilizou-se uma estatística descritiva, através das frequências relativas, absolutas e médias e desvios padrão. Além disso, realizou-se uma análise de normalidade dos valores quantitativos através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Para a comparação entre as variáveis foram utilizados os testes não paramétricos de Qui-quadrado, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U. A análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos e os resultados da qPCR (positiva e negativa) foi feita através do teste de Spearman (SAMPAIO, 1998) e a concordância entre a qPCR, IHQ e HE através do teste de Kappa (THRUSFIELD, 2004). O programa IBM SPSS Statistics 19.0 – Statistical Package for the Social Science, foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

3. Resultados

Com relação à análise bioquímica dos parâmetros de avaliação renal (ureia, creatinina, cálcio, fósforo e albumina), os dados encontrados foram os seguintes:

Dos animais estudados, 53,3% (16/30) apresentaram valores de ureia menor que 40 mg/dl; 6,7% (2/30) apresentaram valores entre 40 e 60 mg/dl; 30% (9/30) apresentaram valores entre 60 e 90 mg/dl e 13,3% (4/30), valores superiores a 100mg/dl. Em relação à creatinina, 13,3% (4/30) dos animais estudados apresentaram creatinina abaixo de 0,5 mg/dl; 36,7% (11/30) entre 0,5 e 1,5 mg/dl e 50% (15/30), valores acima de 1,5 mg/dl. (LOPEZ et al., 1996; KANEKO et al., 1997).

Para o cálcio, os números foram os seguintes: 73,3% (22/30), apresentaram valores abaixo de 12 mg/dl, e apenas 26,7% (8/30) dos animais tiveram valores acima dos valores de referência, revelando uma hipocalcemia em boa parte dos animais estudados. Em relação ao fósforo, 16,7% (5/30), tiveram valores dentro da faixa de referência e 83,3% (25/30) tiveram valores superiores a 5 mg/dl, apresentando portanto hiperfosfatemia.

Na albumina, 86,7% (26/30) dos animais apresentaram valores inferiores ao mínimo esperado da faixa referência e apenas 13,3% (4/30) dos animais apresentaram valores normais.

Quanto às alterações histopatológicas, foram observadas glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite proliferativa, atrofia glomerular (glomerulonefrite crônica) e nefrite intersticial com infiltrados inflamatórios linfocitoplasmocitários variando de discreto, moderado a intenso, além de fibrose e nefrite intersticial. (figura 1).

Todos os órgãos do sistema urinário de cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentaram lesão (Tabela 2), sendo os ureteres aqueles que apresentaram menor número de lesões. Com relação ao tipo e intensidade das lesões inflamatórias, todos os órgãos, a exceção dos ureteres, apresentaram lesões variando de discreto a intenso. Os ureteres foram os únicos órgãos que apresentaram somente lesões discretas (Tabela 3).

Com relação à imunohistoquímica, todos os órgãos do sistema urinário apresentaram detecção de formas amastigotas de *L. infantum*, a exceção dos ureteres (Tabela 2) (Figura 2).

Em relação aos resultados da qPCR, foi observado em 96,7% dos animais DNA de *L. infantum* em pelo menos um dos órgãos avaliados. Nos rins, foi observado DNA em 60% (18/30), da porção cortical do rim direito e na porção medular, 76,7% (23/30). Em relação ao rim esquerdo, foi observado DNA em 53,3% (16/30) e 56,7% (17/30), nas porções cortical e medular, respectivamente. No que diz respeito aos ureteres, o direito apresentou maior número de positividade (66,7% - 20/30) em relação ao esquerdo (60% - 18/30). Enquanto a bexiga apresentou 66,7% (20/30) de positividade e a na urina foi encontrado DNA em 30% (9/30).

Tabela 2. Detecção de DNA de *L. infantum* por qPCR, imunomarcção e lesões histopatológicas em diferentes órgãos do sistema urinário de cães naturalmente infectados.

Variáveis	N	qPCR	IHQ	HE	Valor P
Rim direito cortical	30	60,0%(18)aB	46,7% (14)aB	96,7% (29)a	<0,001*
Rim direito medular	30	76,7%(23)aA	50,0% (15)aB	96,7% (29)a	<0,001*
Rim esq cortical	30	53,3%(16)abB	33,3%(10)bB	83,3% (25)a	<0,001*
Rim esq medular	30	56,7% (17)aB	33,3% (10)bB	90,0% (27)a	<0,001*

Continuação Tabela2

Ureter direito	30	66,7% (20)aA	0,0% (0)cB	23,3% (7)b	<0,001*
Ureter esquerdo	30	60,0% (18)aA	0,0% (0)cB	6,7% (2)b	<0,001*
Bexiga	30	66,7% (20)aA	13,3% (4)bB	73,3% (22)a	<0,001*
Urina	30	31,0% (9)b	-	-	-
Valor P		0,034*	<0,001*	<0,001*	

Convenções: N- Número de amostras; qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real; IHQ- Imunohistoquímica; HE- Histopatologia; *Significância do teste de Qui-Quadrado; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indica diferença estatística no teste de Mann-Whitney U; Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indica diferença estatística no teste de Mann-Whitney U.

Tabela 3. Distribuição das frequências relativas e absolutas dos escores de HE nos órgãos do sistema urinário de cães naturalmente infectados.

Estruturas	HE			
	0	1	2	3
Rim direito cortical	3,3% (1)	26,7% (8)	33,3% (10)	36,7%(11)
Rim direito medular	3,3% (1)	40,0%(12)	33,3% (10)	23,3% (7)
Rim esquerdo cortical	16,7% (5)	26,7% (8)	26,7% (8)	30,0% (9)
Rim esquerdo medular	10,0% (3)	26,7% (8)	33,3% (10)	30,0% (9)
Ureter direito	76,7% (23)	23,3% (7)	0,0% (0)	0,0% (0)
Ureter esquerdo	93,3% (28)	6,7% (2)	0,0% (0)	0,0% (0)
Bexiga	26,7% (8)	30,0% (9)	36,7% (11)	6,7% (2)
Valor P	<0,001*			

Convenções: HE - Histopatologia; *Associação significativa no teste de Qui-Quadrado.

Todos os órgãos apresentaram uma carga parasitária estatisticamente semelhante. A urina, por sua vez, apresentou uma carga parasitária menor quando comparada aos órgãos, exceto, da região cortical do rim esquerdo. Apesar de a região ter sido a que apresentou a maior concentração de parasitos, seu desvio padrão foi bastante elevado devido a heterogeneidade da distribuição dos resultados. (Tabela 4).

Tabela 4. Análise quantitativa dos resultados da qPCR nos órgãos/urina de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Estruturas	qPCR
Rim direito cortical	$2,78 \times 10^7 \pm 4,61 \times 10^7^a$
Rim direito medular	$1,30 \times 10^7 \pm 3,28 \times 10^7^a$
Rim esquerdo cortical	$4,38 \times 10^7 \pm 5,12 \times 10^7^{ab}$
Rim esquerdo medular	$1,19 \times 10^7 \pm 3,32 \times 10^7^a$
Ureter direito	$1,76 \times 10^5 \pm 6,46 \times 10^{5a}$
Ureter esquerdo	$3,84 \times 10^5 \pm 8,31 \times 10^{5a}$
Bexiga	$1,49 \times 10^6 \pm 3,59 \times 10^{6a}$
Urina	$1,26 \times 10^3 \pm 3,74 \times 10^3^b$
Valor P	0,012*

Convenções: qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real;

*Significância do teste de Qui-Quadrado; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indica diferença estatística no teste de Mann-Whitney U.

No teste de Mann-Whitney, foi possível observar que em relação à IHQ, a maior carga parasitária foi encontrada nos escores 2 e 3. Em relação a HE, as maiores concentrações de parasitos foram observadas no escore 3 (Tabela 5).

Tabela 5. Relação entre os escores da IHQ e HE com a qPCR.

Escore	IHQ		HE	
	N	qPCR	N	qPCR
0	84	$8,22 \times 10^6 \pm 2,67 \times 10^7^{bc}$	29	$3,20 \times 10^6 \pm 1,68 \times 10^7^b$
1	24	$1,27 \times 10^7 \pm 3,37 \times 10^7^b$	31	$3,33 \times 10^5 \pm 8,92 \times 10^5^b$
2	15	$4,10 \times 10^7 \pm 4,99 \times 10^7^a$	35	$8,74 \times 10^6 \pm 2,68 \times 10^7^b$
3	3	$3,33 \times 10^7 \pm 5,77 \times 10^7^{ab}$	31	$4,20 \times 10^7 \pm 5,01 \times 10^7^a$
Valor P	<0,001*		<0,001*	

Convenções: N- Número de amostras; qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real; IHQ- Imunohistoquímica; HE- Histopatologia; *Significância do teste de Kruskal-Wallis; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística no teste de Mann-Whitney.

Pela correlação de Spearman, foi possível observar que a carga parasitária não influenciou os parâmetros bioquímicos de avaliação renal.

4. Discussão

Os achados dos parâmetros bioquímicos da avaliação renal do presente estudo são descritos comumente em doenças renais avançadas (AMUSATEGUI et al., 2003; BUSH, 2004), onde os animais apresentam diminuição da capacidade de filtração glomerular (SARIDOMICHELAKIS 2009; CORTADELLAS et al., 2010). Por consequência, a hipoalbuminemia que a maioria dos animais apresentou é decorrente desta causa.

O aumento de ureia e a consequente queda da taxa de filtração glomerular (TFG) levam ao aumento da creatinina e fósforo, além da queda do cálcio, caracterizando a IRC (BUSH, 2004).

A hiperfosfatemia 83,3% (25/30) observada nos animais deste trabalho, seguida de hipocalcemia 73,3% (22/30), reiteram os resultados de POLZIN et al. (2005) e de CORTADELLAS et al. (2012), demonstrando que nos indivíduos com hiperfosfatemia devido à insuficiência renal, ocorre concomitantemente uma hipocalcemia.

Os resultados bioquímicos obtidos demonstram que a LV em cães leva a uma perda progressiva da função renal. Posteriormente, a progressão da doença desencadeará uma grave síndrome nefrótica (TORRES et al, 2013).

A detecção dessas alterações é importante para o esclarecimento da evolução da doença e elaboração de prognóstico, em conjunto com os sinais clínicos, podem ser sugestivos da doença em áreas sabidamente endêmicas (MENDONÇA et al., 2015).

As lesões histopatológicas descritas no trabalho são semelhantes às encontradas por Rigo et al. (2013), indicando que o envolvimento renal é comum na LV em cães e os padrões de glomerulonefrite membranosa e membranoproliferativa são frequentes. O comprometimento renal é muito comum em cães com LV devido à deposição de imunocomplexos nas membranas basais do parênquima renal, principalmente nos glomérulos renais. Isso é causado por infecção persistente associada com antigenemia prolongada (MORENO et al., 1999). As condições encontradas no presente estudo

podem levar à insuficiência renal, que é considerada a principal causa de morte entre os animais com LV (TAFURI et al., 2001).

As lesões renais, além de comuns em cães com LV, são alterações que ocorrem nos primeiros estágios da infecção, independentemente dos sinais clínicos apresentados. As diferenças nos padrões de lesões renais encontradas no presente estudo podem indicar que tais alterações podem ser resultantes de diferenças individuais na resposta imunitária por parte dos hospedeiros ou ainda pode ser a partir de alterações clínicas no mesmo animal durante a evolução da doença (CIARAMELLA et al., 1997).

Durante algum tempo, acreditou-se que à semelhança do homem, lesões renais em LV canina seriam predominantemente localizadas na região cortical (DUARTE et al., 1983). Contrapondo este fato, os resultados obtidos demonstram que as lesões renais ocorrem em alta frequência tanto na região cortical quanto medular.

As lesões histopatológicas encontradas na bexiga foram muito frequentes (73,3%). Por outro lado, cistite tem sido relatada em cães infectados por *L. infantum* como uma doença oportunista (FEITOSA, 2001; CAVALCANTI et al., 2005). Entretanto, como a LV é uma doença sistêmica com manifestações clínicas graves, pouco valor ainda tem sido dado para alterações urinárias.

Os resultados do trabalho confirmam que a IHQ é um procedimento importante para detectar *L. infantum* em diferentes órgãos (TASCA et al., 2009), uma vez que, foi demonstrado a imunomarcagem de formas amastigotas do parasito em todos os órgãos, a exceção dos ureteres. Os ureteres foram os órgãos que também apresentaram o menor número e intensidade de lesões histopatológicas, demonstrando não ser um órgão alvo para pesquisa do parasito.

O DNA de *L. infantum* foi detectado em mais da metade das amostras de cada órgão, com a maior carga parasitária sendo observada na região medular do rim direito (76,7%), evidenciando a alta sensibilidade desta técnica molecular o que possibilita determinar a extensão de infecções subclínicas. Apesar da ampla variação, grandes quantidades de parasitos foram encontradas em todos os órgãos. Somente na urina, o número de amostras positivas diferiu estatisticamente das demais. Neste trabalho, não foi feita uma correlação entre gravidade de lesões renais e presença de DNA do parasito na urina, porém, Solano-Gallego et al. (2007), realizando este tipo de estudo,

demonstrou que cães com danos renais graves apresentam carga parasitária maior na urina.

No teste de Mann-Whitney, foi possível observar que tanto em relação à IHQ quanto à HE, a carga parasitária determinada através de qPCR foi encontrada nos maiores escores. Desta forma, é possível deduzir que a carga parasitária influencia positivamente na imunomarcção de formas amastigotas de *L. infantum*, bem como, uma maior quantidade de parasitos induz a processos inflamatórios de maior intensidade. Estes resultados são dignos de nota, uma vez que, são os primeiros na literatura que indicam este tipo de associação.

Por outro lado, pela correlação de Spearman, foi possível observar que a carga parasitária não influenciou os parâmetros bioquímicos de avaliação renal. Desta forma, os resultados são similares aos obtidos por Torres et al. (2013), onde observaram que a quantidade de parasitos não influenciaram na característica das alterações bioquímicas, independente dos sinais clínicos apresentados pelos animais.

5. Conclusão

Cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentam perda progressiva da função renal além de lesões histopatológicas e marcação imunohistoquímica de formas amastigotas do parasito de forma muito frequentes. Associado a estes fatos, nos órgãos do sistema urinário, constatou-se presença marcante do parasito, onde é possível observar que existe relação entre a carga parasitária e o grau de lesões e imunomarcção. Por outro lado, esta mesma carga parasitária não influencia nos parâmetros bioquímicos de avaliação renal.

Agradecimento

Ao Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ - PE) pelo apoio na realização da PCR em tempo real.

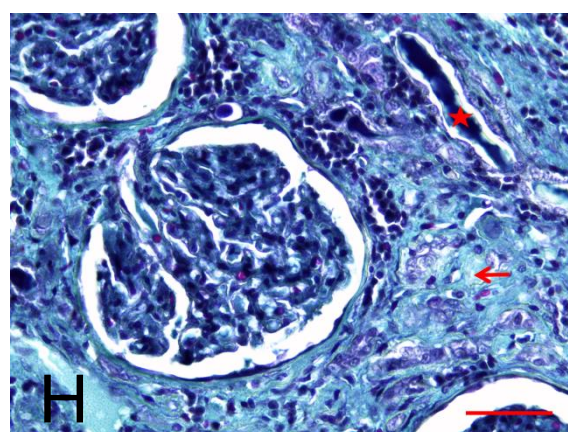
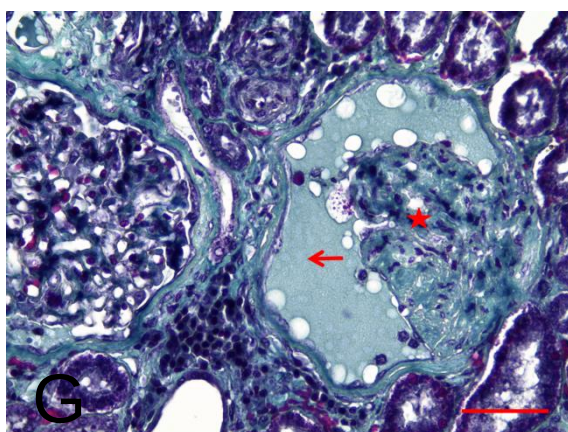
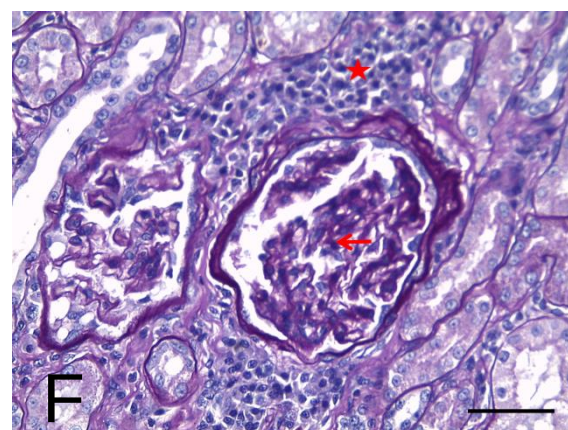
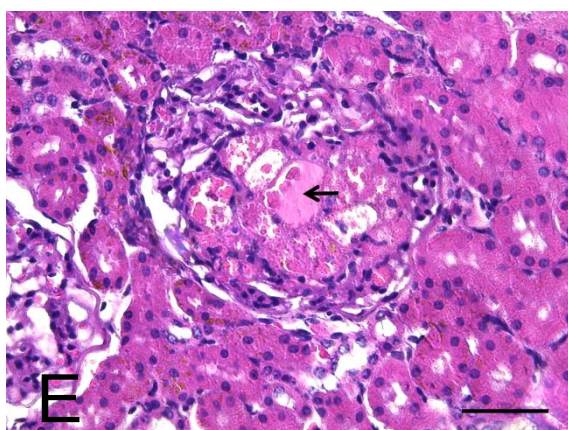
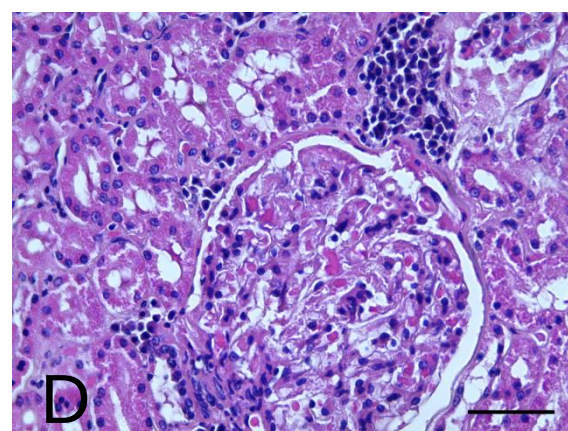
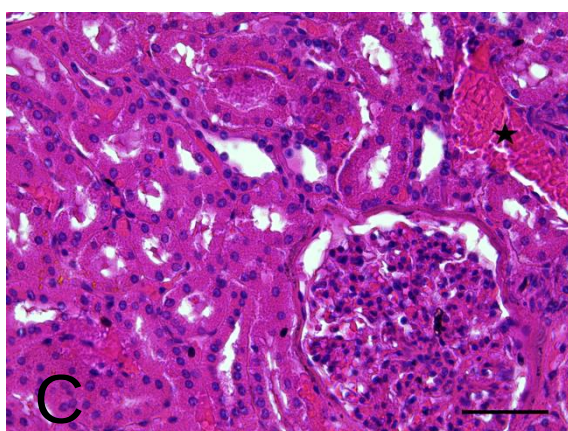
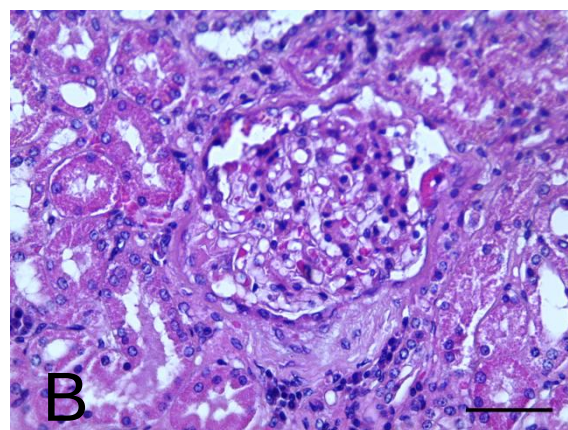
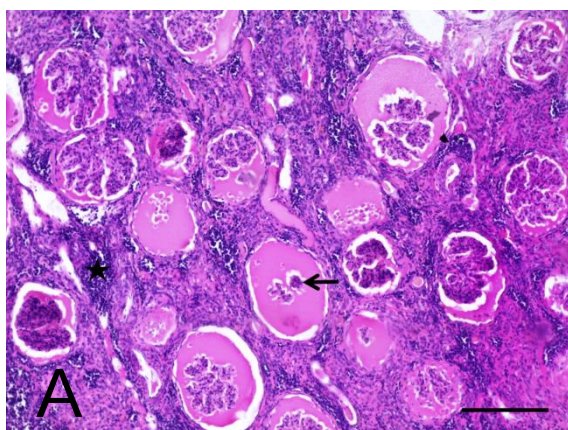


Figura 1. Achados histopatológicos de rins de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Figura 1A. Observar atrofia glomerular (seta) e infiltrado linfohistioplasmocitário difuso (estrela). HE. Barra = 200µm.

Figura 1B. Presença de glomerulonefrite membranoproliferativa. HE. Barra = 50µm.

Figura 1C. Observar glomerulonefrite proliferativa com presença de congestão (estrela). HE. Barra = 50µm.

Figura 1D. Presença de glomerulonefrite membranosa. HE. Barra = 50µm.

Figura 1E. Notar glomerulonefrite proliferativa com dilatação capilar e material proteináceo (seta). HE. Barra = 50µm.

Figura 1F. Observar atrofia glomerular (seta) infiltrado linfohistioplasmocitário (estrela). PAS. Barra = 50µm.

Figura 1G. Atrofia glomerular (estrela) e presença de material proteináceo subcapsular (seta). Tricrômico de Gomori. Barra = 50µm.

Figura 1H. Fibrose cortical com atrofia de túbulos renais (seta) e material proteináceo no lume dos túbulos néfricos (estrela). Tricrômico de Gomori. Barra = 50µm.

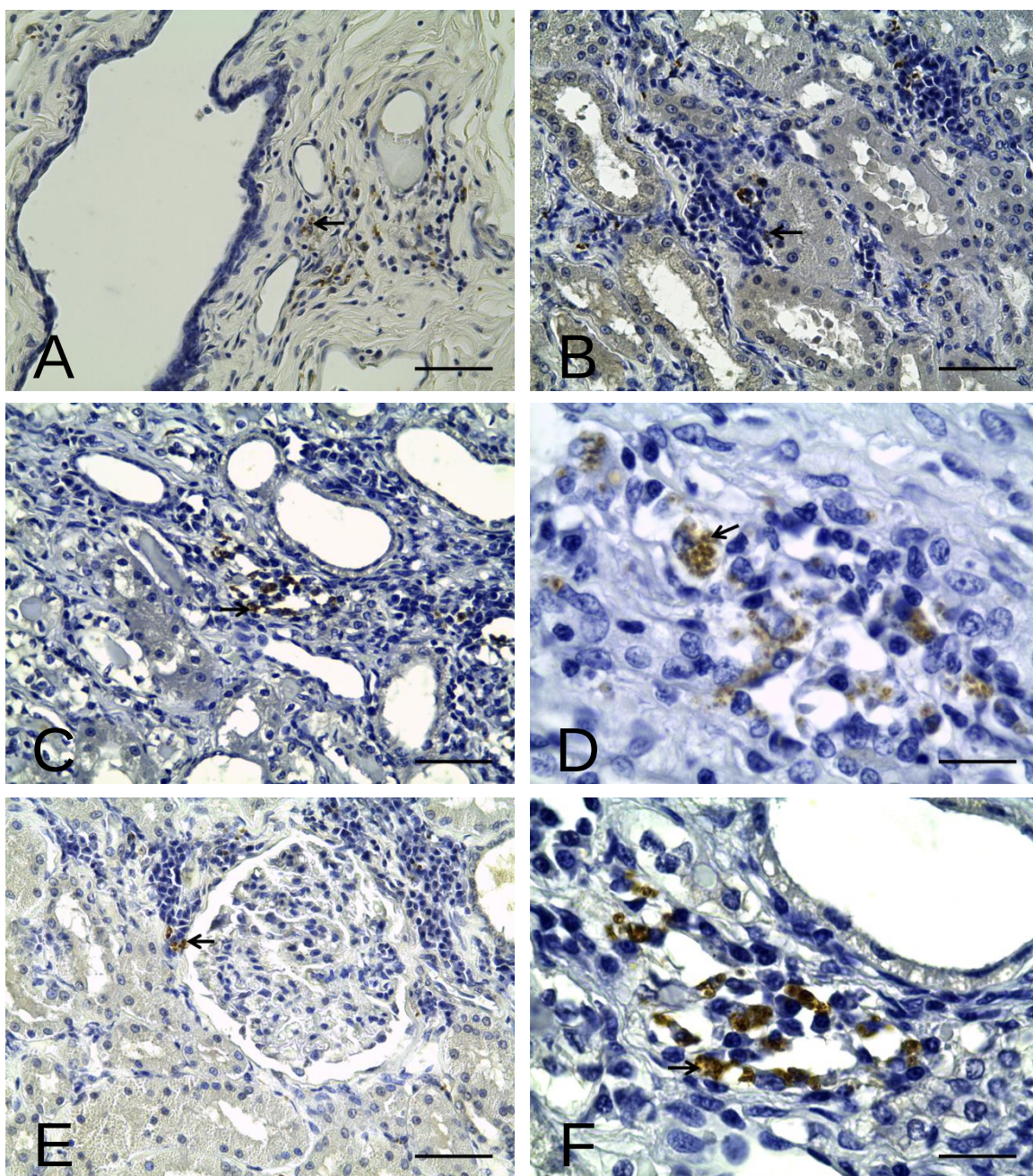


Figura 2. Detecção imunohistoquímica de formas amastigotas de *L. infantum* em órgãos do sistema urinário de cães naturalmente infectados.

Figura 2A. Bexiga. Formas amastigotas de *L. infantum* lâmina própria (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 50µm.

Figura 2B. Região medular do rim. Formas amastigotas de *L. infantum* (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 50µm.

Figura 2C. Região medular do rim. Formas amastigotas de *L. infantum* (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 50µm.

Figura 2D. Região medular do rim. Formas amastigotas de *L. infantum* (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 20µm.

Figura 2E. Região cortical do rim. Formas amastigotas de *L. infantum* (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 50µm.

Figura 2F. Região cortical do rim. Formas amastigotas de *L. infantum* (seta). Complexo estreptavidina-peroxidase. Barra = 20µm.

TERMO DE LIBERAÇÃO DO ANIMAL

Eu _____, proprietário (a) do animal denominado _____, da raça _____, espécie canina e idade _____, autorizo o Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior, Médico Veterinário, a realizar a eutanásia, com todos os requisitos humanitários, sendo este animal positivo para Leishmaniose Visceral Canina. Declaro que estou ciente dos procedimentos, e que me foi explicado em detalhes todas as condutas a serem realizadas.

Recife, _____ de _____ de _____.

NOME DO(A) PROPRIETÁRIO(A)

ASSINATURA DO(A) PROPRIETÁRIO(A)

RG _____



Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	051/2014
Número do processo	23082.005355/2014
Data de emissão da licença	05 de maio de 2014
Título do Projeto	Alterações renais em cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) infantum.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Valdemiro Amaro da Silva Júnior
Colaboradores	Valdemiro Amaro da Silva Júnior; Leucio Câmara Alves; Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira; Jacilene Lourenço da Silva; Ebla Lorena Sales de Araújo
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Cão; total de 30 animais.



Prof. Dr. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA

Prof. Dr. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Presidente em Exercício da CEUA-UFRPE)

Referências Bibliográficas

- ALEXANDRE-PIRES, G.M.; CORREIA, J.J. Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In G.M. SANTOS-GOMES & I.M. PEREIRA DA FONSECA. **Leishmaniose canina**, Lisboa: Chaves Ferreira Publicações. p.53-68, 2008
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, n.18, p.147-156, 2003.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A.F; SOLANO-GALLEGO, L. et al. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis, part one. **Trends Parasitology**, v.24, n.7, p.324-330, 2008.
- BOURDEAU, P. J. Update on canine leishmaniosis: From infection to optimized management. **Proceedings of the Bayer Pre-Congress Symposium**, Bled, Slovenia, 10-27, 2009.
- BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo:1ª. ed. Rocca, 376 p. 2004.
- CAVALCANTI, M. P.; FAUSTINO, M. A. G.; SILVA, L. B. G.; ALVES, L. C. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose Visceral. **Clin Vet**, n. 58, p.36-42, 2005.
- CAVALCANTI, M. P.; BRITO, M. E. F.; SOUZA, W. V. et al The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary journal**, n.182, p.356-358, 2009.
- CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R. et al. Retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, n.141,p. 539-543, 1997.
- CORTADELLAS, O.; PALACIO, M. J. F.; TALAVERA. J.; BAYÓN, A. (2010) Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease

at diferente stages of severity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**.v.24, n.1, p.73-79, 2010.

CORTADELLAS, O.; FERNANDEZ-DEL PALACIO, M. J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages of chronic kidney disease. **Veterinary Record**, n.164, p.487-490, 2012.

COSTA, F. A. L.; GOTO, H., SALDANHA; L. C. B. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v.40, n.6, p.677-684, 2003.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. Comparative Immunology, **Microbiology and Infectious Disease**, v.27, n.5, p.305-318, 2004.

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: Um desafio crescente. São Paulo: **Intervet Pet**, 15 p, 2001.

FEITOSA, M. M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, I, 2006, Jaboticabal, **Anais...** Jaboticabal, p 9-13.

FINCO, D.R. In: Kaneko, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. California: Academic Press, 916 p, 1997.

FONT, A.; CLOSA, J. M.; MOLINA, A.; MASCORT, J. Trombosis and nephrotic syndrome in a dog with visceral leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.34, n.9, p.466-470, 1993.

MENDONÇA, I. L.; ALVES, M. M. M.; BATISTA, J. F. et al. Alterações bioquímicas e hematológicas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (infantum) chagasi*. **Clínica Veterinária**, n.116, p.78-84, 2015.

MILLER, J. B. Zoonoses de pequenos animais. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Manole, 1995, 2257 p.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets in canine leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunopathology**, v.71, n.3-4, p.181-195, 1999.

NOLI, C.; LLOYD, D.; LOEFFLER, A.; SCHWENDENWEIN, I.; MEREDITH, A. Protozoal infections: Canine leishmaniasis. **Proceedings...**, Luxemburg, p.19-27, 2006.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; ROSS, S. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna Veterinária**. 5a. ed. Rio de Janeiro: Ed. Manole, 2005, 2236 p.

RIGO, R. S.; CARVALHO, C. M. E; HONER, M. R. et al. Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v.55, n.2, p.113-116, 2013.

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

SARIDOMICHELAKIS, M. N. (2009) Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**. v.20, n.5-6, p.471-489, 2009.

SOARES, I. R.; SILVA, S. O.; MOREIRA F. M. et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v.197, n.8, p.665-669, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRIGUEZ-CORTES, A.; TROTTA, M. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.3-4, p.315-319, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Canine leishmaniosis - a challenging zoonosis. **EJCAP**, v.18 n.3, p.232-241, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G. et al. Directions for diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.165, n.1-2, p.1-18, 2009.

TAFURI, W. L.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M. et al. Estudo, ao microscópio óptico e eletrônico, do rim de cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania (leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.31, n.3, p.139-145, 1989.

TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.96, n.3, p.203-212, 2001.

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

TASCA, K. I.; BUZETTI W.A.; TENORIO, M. S. et al. Exames parasitológicos, imunohistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.18, n.1, p.27-33, 2009.

THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia Veterinária**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2004, 556p.
TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Barueri: Ed. Manole, 2003, 331 p.

TORRES, M. M; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. B. et al. Associação da carga parasitária renal com achados laboratoriais em cães com leishmaniose visceral. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.5, p.894-896, 2013.