



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

DANIELLE JORDANY BARROS COUTINHO

**DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E MOLECULAR DE LEISHMANIA NA  
MEDULA ESPINHAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS.**

São Luís  
2023

**DANIELLE JORDANY BARROS COUTINHO**

**DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E MOLECULAR DE LEISHMANIA NA  
MÉDULA ESPINHAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA – Campus Paulo VI.

Orientador(a): Alcina Vieira de Carvalho Neta

Co-orientador: Fernando Almeida de Souza

São Luís  
2023

Coutinho, Danielle Jordany Barros.

Detecção imuno-histoquímica e molecular de Leishmania na medula espinhal de cães naturalmente infectados / Danielle Jordany Barros Coutinho. – São Luís, 2022

...f

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Almeida de Souza.

1.LVC. 2.Patologia. 3.SNC. I.Título.

CDU: 636.7:616.993.161



DANIELLE JORDANY BARROS COUTINHO

**DETECCÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E MOLECULAR DE LEISHMANIA NA  
MEDULA ESPINHAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS.**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, para a obtenção de título de mestre em Ciência Animal.

Aprovado em: 21/02/2020

BANCA EXAMINADORA

*Alcina Vieira de Cravalho Neta*

---

**Profa. Dra. Alcina Vieira de Cravalho Neta (Orientadora)**  
Doutora em Ciência Animal  
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

*Andrea Pereira da Costa*

---

**Profa. Dra. Andrea Pereira da Costa**  
Doutora em Ciências  
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

*Larissa Sarmiento dos Santos*

---

**Profa. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos**  
Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia  
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA



Aos cães, protagonistas deste trabalho, sem os  
quais não seria possível ser desenvolvido.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, maravilhoso ser que me guiou até aqui e me deu forças para finalizar essa trabalhosa caminhada.

A minha orientadora profa. Alcina Vieira pelo incentivo e oportunidade de ingressar na pós-graduação. Obrigada por estimular a busca pelo conhecimento, acreditar em meu potencial e me ter como filha nesses anos.

Aos cães, verdadeiros protagonistas deste trabalho. O céu dos cachorros com certeza ficou mais bonito quando vocês chegaram. Obrigada por fazerem este trabalho acontecer.

À CAPES pelo financiamento e suporte à pesquisa.

A professora Larissa Sarmiento, a qual desconheço palavras que a descrevam minha gratidão a todos os ensinamentos recebidos, a todos as preocupações compartilhadas e a todo incentivo dado por ela a mim. Um exemplo de pessoa e de profissional, uma inspiração. Lhe agradeço imensamente por tudo.

A minha família, meus pais Jorge e Lea, meu noivo Bruno e meu irmão Denilson que sempre apoiaram meus sonhos, foram os ouvintes dos meus lamentos e alegrias, meus sustentos nos momentos de tristeza e fadiga. Vocês são os amores da minha vida todinha. Não posso esquecer, jamais, dos meus avós, Raimundo e Raimunda, que sempre incentivaram meus estudos e acreditaram em meu potencial.

Ao professor Fernando Almeida pelo auxílio com as qPCRs, ensinamentos e paciência comigo.

Aos proprietários dos cães, pelas doações dos animais para este estudo.

Não poderia pensar em esquecer as minhas parceirinhas Ingrid, Hanna, Ellainy e Taynan, que realizaram esse lindo trabalho comigo. O que seria de mim se não tivesse vocês pra dividir o peso desse trabalho e os conhecimentos não conseguiria finaliza-lo. Também não posso esquecer dos momentos únicos de descontração que só a gente sabe o quanto são bons e fortalecem nossa amizade.

A Scarleth, Gabriela Bastos, Elizildo, Elaine Dias, Fernanda e Candinha, são outros amores de pessoa que tive o prazer de conhecer e trabalhar no Laboratório de Patologia molecular e a Gabriela Muniz, a pessoa mais fofa do mundo e minha parceirinha nas imunohistoquímicas. Me ajudaram bastante nesta caminhada. Vocês são os melhores companheiros de trabalho.

Ao Pablo Souza e Luis Carlos pela amizade e auxílio nas necropsias.

Ao Hospital Veterinário Francisco Edilberto Uchoa Lopes – UEMA pelo acesso aos cães e à infraestrutura cedida para a realização das necropsias.

A Unidade de Vigilância em Zoonose (UVZ), pela oportunidade de acesso aos cães, aos quais foram cruciais para a finalização deste estudo.

Ao Laboratório de Parasitologia em nome da profa. Andréa Pereira e Ana Vitória pelo auxílio e infraestrutura cedidos para a realização das RIFIs, sem falar das doações de água destilada e outros materiais importantes.

Ao Laboratório de Anatomopatologia em nome da profa. Ana Lúcia Abreu que me ajudou com a leitura das lâminas de “imuno” e histologia, também, pela infraestrutura necessária para os procedimentos histológicos. Agradeço, também, a Sandra e Ailésio que me auxiliaram nos procedimentos histológicos com direito a ouvir meus lamentos. A Wendel, que também me ajudou, mas sempre me avisa das besteiras que eu fazia depois de feitas. Brincadeiras à parte, os procedimentos histológicos se tornavam um pouco mais divertidos com vocês.

Ao Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia FioCruz Rio de Janeiro pela realização dos testes de ELISA.

Ao LABGEN da UFMA, em nome da profa. Nayara que nos ajudou com o espaço e uso de equipamento para a realização da quantificação da carga parasitária.

Aos meus colegas de turma Elias e Leandro Macedo, verdadeiros ícones da nossa turma de mestrado (melhor turma de todas). Me sinto muito honrada em ter dividido esses dois anos com vocês. Vocês são os melhores.

Por fim, obrigada a todos que contribuíram para a realização desse grandioso estudo e que fizeram parte da minha nesses 2 anos de mestrado.

*“Persistência é o caminho do êxito”.*

*Charles Chaplin*



## RESUMO

O protozoário intracelular obrigatório *Leishmania infantum* podem ter uma ampla distribuição em tecidos de cães, o que pode resultar em manifestações clínicas atípicas, como distúrbios neurológicos, decorrentes do envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC). Essas manifestações costumam ser resultantes de uma resposta inflamatória exacerbada frente à infecção, o que determina a deposição de imunocomplexos nesses órgãos, sugerindo que esses sinais sejam resultantes de um desequilíbrio da resposta imunológica do hospedeiro. Há poucos trabalhos na literatura que demonstram o envolvimento do SNC em cães com leishmaniose visceral, logo, buscou-se caracterizar as alterações imunopatológicas teciduais ocorridas na medula espinhal de cães com LVC naturalmente infectados, determinando e caracterizando as possíveis alterações histopatológicas, dando ênfase nas características imuno-histoquímicas, histopatológicas e moleculares. Para tanto, foram coletados fragmentos da medula espinhal correspondentes às porções cervical, torácica e lombar de 20 cães de ambos os sexos, naturalmente infectados por *L. infantum*, aos quais foram submetidos às técnicas de histologia, imuno-histoquímica e qPCR. Macroscopicamente, não foram observadas lesões na medula espinhal em nenhum dos animais avaliados neste estudo. A análise histopatológica demonstrou alterações em tecidos de medula espinhal de 13 animais, sendo que as lesões observadas foram caracterizadas como discretas e multifocais e, a maioria, de natureza degenerativa, caracterizadas como cromatólise central, satelitose e vacuolização do neurópilo (degeneração Walleriana). Na imuno-histoquímica, foi possível detectar antígenos de *Leishmania* sp. na medula espinhal de 5 cães e, por meio da qPCR, foi detectado o DNA do parasito em, pelo menos, duas porções (cervical, torácica e/ou lombar) da medula espinhal de todos os animais analisados. Este trabalho demonstra que a medula espinhal de cães pode ser acometida durante a infecção por *Leishmania* e que lesões microscópicas são comuns em todas as porções da medula espinhal, não apresentando predileção significativa por nenhuma das regiões desse órgão.

**Palavras chave:** LVC. Patologia. SNC.

## ABSTRACT

The mandatory intracellular protozoan *Leishmania infantum* can have a wide distribution in dog tissues, which can result in atypical clinical manifestations, such as neurological disorders, resulting from the involvement of the Central Nervous System (CNS). These manifestations are usually the result of an exacerbated inflammatory response to infection, which determines the deposition of immune complexes in these organs, suggesting that these signs are the result of an imbalance in the host's immune response. There are few studies in the literature that demonstrate the involvement of the CNS in dogs with visceral leishmaniasis, therefore, we sought to characterize the tissue immunopathological changes that occurred in the spinal cord of dogs with naturally infected CVL, determining and characterizing the possible histopathological changes, emphasizing the possible histopathological changes. immunohistochemical, histopathological and molecular. For this purpose, fragments of the spinal cord corresponding to the cervical, thoracic and lumbar portions of 20 dogs of both sexes, naturally infected with *L. infantum*, were collected and submitted to the techniques of histology, immunohistochemistry and qPCR. Macroscopically, no spinal cord injuries were observed in any of the animals evaluated in this study. Histopathological analysis showed alterations in spinal cord tissues of 13 animals, with the lesions observed being characterized as discrete and multifocal and, most of them, of a degenerative nature, characterized as central chromatolysis, satellitosis and vacuolization of the neuropile (Wallerian degeneration). In immunohistochemistry, it was possible to detect antigens from *Leishmania* sp. in the spinal cord of 5 dogs and, using qPCR, the parasite's DNA was detected in at least two portions (cervical, thoracic and / or lumbar) of the spinal cord of all animals analyzed. This study demonstrates that the spinal cord of dogs can be affected during *Leishmania* infection and that microscopic lesions are common in all portions of the spinal cord, with no significant predilection for any of the regions of this organ.

**Keywords:** CVL. Pathology. CNS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 2

Figura 1 - Microscopia de luz, medula espinhal, cão.....	57
Figura 2- Imuno-histoquímica em tecido de medula espinhal de cães naturalmente infectado com LV.....	58
Figura 3 - Carga parasitária entre grupos sintomáticos e assintomáticos de cães com LV.....	58
Figura 4 - Carga parasitária por porção de medula espinhal em cães sintomáticos e assintomáticos para LV.....	58

## LISTA DE SIGLAS

BHE - Barreira Hematoencefálica

BSA - Barreira Sangue – Aracnoide

BSLCR - Barreira Sangue - Líquido Cefalorraquidiano

CEEA - Comitê de Ética e Experimentação Animal

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

DAB - Diaminobenzidina

DNA - Do inglês *Desoxyribonucleic acid*, traduzido como ácido desoxirribonucleico

ELISA - Do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*, traduzido como Ensaio Imunoenzimático

HE - Hematoxilina e Eosina

IFN- $\gamma$  - Interferon Gama

IgG - Imunoglobulina G

IHQ - Imuno-histoquímica

IL – Interleucina

iNOS ou NOS2 - Enzima óxido nítrico sintase induzível

kDNA - DNA do cinetoplasto

LC - Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MS - Ministério da Saúde

NK – Do inglês *natural killer*

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PAMPs - Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PAHO - Do inglês *Pan American Health Organization*, traduzido como Organização Pan-Americana da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR - PCR em Tempo Real

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

SN - Sistema Nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa

UEMA - Universidade Estadual do Maranhão

WHO - Do inglês *World Health Organization*, traduzido como Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS .....	18
2.1. GERAL .....	18
2.2. ESPECÍFICOS .....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	18
3.1 Dados epidemiológicos mundiais sobre Leishmaniose .....	18
3.2 Aspectos gerais sobre a Leishmaniose Visceral Canina.....	19
3.3 Aspectos imunológicos do hospedeiro.....	23
3.4 Leishmania spp. no Sistema Nervoso Central.....	25
REFERÊNCIAS .....	29
CAPÍTULO 2 .....	38
ABSTRACT .....	39
RESUMO .....	40
Introduction .....	40
Material and Methods.....	41
Ethical issues.....	41
Animals and inclusion criteria.....	41
Sample collection .....	42
Histopathology and Immunohistochemistry .....	42
DNA extraction and parasite burden quantification by qPCR .....	42
Statistical analysis .....	43
Results .....	43
Histopathological analysis.....	43
Labeling of Leishmania antigens on the spinal cord.....	44
DNA detection and quantification of the parasitic burden of L. infantum in the spinal cord .....	44
Discussion.....	45
Conclusions .....	49
REFERÊNCIAS .....	49



**CAPÍTULO 1**  
**CONSIDERAÇÕES SOBRE LESIÃO MANÍFESTA**

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias disseminadas no Velho e Novo Mundo com grande diversidade epidemiológica, sendo uma enfermidade comum nas regiões do Mediterrâneo, China, Oriente Médio, África do Sul e na América Latina (VAN GRIENSVEN & DIRO, 2019). A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e cerca de 53 espécies foram descritas até o momento, destas, 31 são parasitas de mamíferos e 20 são consideradas patogênicas para os humanos (ARANSAY et al., 2000; KAUFER et al., 2017).

Dentre as leishmanioses, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC), causada pela *Leishmania infantum*, é uma doença grave, muitas vezes fatal, de caráter sistêmico crônico, que representa um grave problema de saúde pública, considerada uma zoonose de importância mundial (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Esse agente etiológico é um protozoário intracelular obrigatório, que afeta células do sistema mononuclear fagocítico de mamíferos, se apresentando na forma amastigota (PITTA et al., 2009); e, nos vetores biológicos (flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, do qual cerca de 90% das espécies ocorrem nas regiões tropicais) são encontrados nas formas promastigotas (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Dessa forma, a doença apresenta ciclo heteróximo e as interações entre o parasito, vetores e os hospedeiros vertebrados estão relacionadas ao mecanismo de transmissão da doença, o qual ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos, infectadas após repasto sanguíneo (DANTAS-TORRES et al., 2012; SHAW, 2003).

Os reservatórios vertebrados incluem uma variedade de animais silvestres, animais domésticos e ser humano. Dentre os animais silvestres estão roedores, marsupiais, primatas e canídeos e, quanto aos animais domésticos podemos citar cães e gatos (DANTAS-TORRES, 2007).

Devido ao processo de urbanização, a transmissão das leishmanioses, dos animais sinantrópicos aos domésticos ocorreu, fato que promoveu o processo zoonótico de transmissão, tornando os cães os principais reservatórios do agente causador (OPAS, 2009; OLIVEIRA et al., 2017).

Clinicamente, a LVC pode apresentar-se tanto de forma assintomática quanto de forma sintomática, na qual ocorre o envolvimento de órgãos como linfonodos, baço, fígado, pele e, até mesmo de olhos, levando a um amplo espectro de sinais clínicos, que incluem linfadenomegalia superficial generalizada, hepatoesplenomegalia, oftalmopatias, dermatopatias caracterizadas por onicogrifose, alopecia, descamação, úlceras cutâneas, principalmente no focinho e orelha, e hiperqueratose (DIAS et al., 2008). Contudo, é preciso

ênfazer que, tanto animais sintomáticos quanto assintomáticos infectados por *L. infantum* são importantes fontes de infecção para os flebotômíneos e funcionam como reservatórios do parasito, logo, animais assintomáticos também participam do ciclo de transmissão da doença (MOHAMMADIHA et al., 2012).

Adicionalmente, formas amastigotas de *L. infantum* podem se distribuir amplamente no organismo do hospedeiro, resultando em manifestações clínicas atípicas (TAFURI et al., 2004), tais como nefropatias (COSTA et al., 2003), cardiopatias e pneumopatias (TORRENT et al., 2005), envolvimento do sistema genital (AMARA et al., 2009) e, também, desordens neurológicas (BLAVIER et al., 2001). Essas manifestações, geralmente, resultam de uma resposta imune exacerbada frente à infecção, que determina a deposição de imunocomplexos nesses órgãos causando nefrites, glomerulonefrites, insuficiência renal, hepatite crônica e insuficiência renal dentre outros sintomas (FERRER, 1992; NOLI, 1999). Portanto, manifestações atípicas observadas no curso da infecção por *L. infantum* são resultantes de um desequilíbrio da resposta imunológica do hospedeiro (BANETH et al., 2008; PACIELLO et al., 2009; NARANJO et al., 2010).

Logo, a variação de sinais clínicos possui relação com o tipo de resposta imunológica que o hospedeiro apresenta durante a infecção. Essa resposta pode variar da diminuição da carga parasitaria ou eliminação do parasito, até a propagação do parasito e apresentação das manifestações clínicas variadas da doença (ALBUQUERQUE, 2013; BRUNO et al., 2019).

Apesar dos hospedeiros sintomáticos, foi relatado que, mesmo na ausência de sintomas neurológicos, alterações histopatológicas no sistema nervoso de cães acometidos pela doença já foram descritas (SCHWARDT et al., 2012). Dentre elas, cita-se a ocorrência de leptomeningite, coroidite, congestão vascular, infiltrado de células inflamatórias, gliose, satelitose, neuronofagia e degeneração neuronal (GARCÍA-ALONSO et al., 1996; NIETO et al., 1996). Nesse mesmo contexto, já foram demonstradas formas amastigotas de *Leishmania* sp. em células endimárias, linfócitos e macrófagos do plexo coroide e em histiócitos nas meninges de cães acometidos pela doença, sendo estas lesões sempre relacionadas a respostas ou mecanismos de ação do sistema imunológico (NIETO et al., 1996; MÁRQUEZ et al., 2013).

Visto isso, os estudos realizados, ainda não são suficientes para explicar o aparecimento de sinais neurológicos como resultantes da infecção por *L. infantum*. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as alterações ocorridas na medula espinhal de cães com LVC naturalmente infectados, através de histopatologia, imuno-histoquímica e qPCR.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

- Caracterizar as alterações imunopatológicas ocorridas na medula espinhal de cães com LVC.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Determinar as lesões na medula espinhal de cães com leishmaniose visceral, naturalmente infectados;
- Caracterizar os tipos celulares encontrados nos tecidos de medula espinhal de cães com LV naturalmente infectados;
- Identificar antígenos *in situ* de *Leishmania* na medula espinhal de cães naturalmente infectados;
- Detectar e quantificar o DNA do cinetoplasto da *L. infantum* na medula espinhal.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Dados epidemiológicos mundiais sobre Leishmaniose

A leishmaniose consiste em uma doença parasitária sistêmica de caráter crônico causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, considerado o patógeno mais comum do mundo (WILHELM, 2019), os quais são transmitidos através da picada de insetos vetores do gênero *Lutzomyia* no Brasil e no Novo Mundo e do gênero *Phlebotomus* na Europa e Velho Mundo (CARVALHO et al., 2019).

A leishmaniose visceral é endêmica em mais de 60 países ao redor do mundo. Consiste em uma doença tropical negligenciada e representa um grave problema de saúde pública, podendo ser encontrada em todos os continentes, exceto a Oceania. Sua ocorrência está vinculada, diretamente, à imunossupressão, pobreza, deslocamentos populacionais, falta de saneamento básico e escassez de recursos para controle e tratamento (WHO, 2018; WILHELM, 2019).

Estima-se que, aproximadamente, 1 milhão de novos casos humanos ocorram por ano, dos quais 300.000 são viscerais e 1 milhão são cutâneos ou mucocutâneos, causando cerca de 30.000 mortes por ano em todo o mundo (ALMEIDA-SOUZA et al., 2016; SOUZA et al., 2019).

Recentemente, a Organização Pan-Americana de Saúde (*Pan American Health Organization* – PAHO, 2018) publicou uma estimativa que afirma que cerca de 90% dos casos

de leishmaniose visceral documentados ocorrem em seis países, sendo eles o Brasil, Etiópia, Índia, Bangladesh, Sudão e Sudão do Sul. Em 2016, o número de casos confirmados de LV em humanos no Brasil girou em torno de 3.200 (SUNDAR & SINGH, 2018).

Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2017, foram registrados, no Brasil, 4.103 casos confirmados de LV, sendo 1.824 na região nordeste e, desse total, 714 no estado do Maranhão que, no ano anterior, havia registrado 645 casos da doença em humanos (BRASIL, 2018).

Como visto, dos Estados brasileiros, o Maranhão se destaca como endêmico para a enfermidade e, no ranking de mortalidade da doença, ocupa a segunda posição, precedido apenas pelo estado do Tocantins. Esse índice equivale à quantidade representada pelos anos de vida perdidos em decorrência de morte prematura devido à leishmaniose visceral (BEZERRA et al., 2018).

Com relação aos cães, a prevalência da LVC no Brasil, em média, varia de 1,9 a 35% em áreas endêmicas (PIMENTEL et al., 2015; FUJIMORI et al., 2016; LOPES et al., 2017). Localidades como Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Araçatuba, Santarém, Corumbá, Teresina, Natal, São Luís, Fortaleza, Camaçari, Três Lagoas, Campo Grande e Palmas, destacam-se pela ocorrência de surtos da doença (BRASIL, 2014; LOPES et al., 2010).

A LVC apresentava-se como uma doença eminentemente rural, no entanto, nos últimos tempos, expandiu-se para áreas urbanas (BRASIL, 2014). Acredita-se que a adaptação das espécies vetoriais ao meio urbano ocorreu devido à ocupação antrópica desordenada do espaço geográfico, contribuindo, assim, para a distribuição da Leishmaniose em diversas regiões do Brasil e do mundo (CARVALHO et al., 2019).

### **3.2 Aspectos gerais sobre a Leishmaniose Visceral Canina**

A leishmaniose visceral canina é considerada um problema de saúde pública por não ser curável e, à sua morbidade nos hospedeiros, principalmente, em cães e humanos (FREITAS, 2010).

#### **3.2.1 CARACTERIZAÇÃO DO PARASITA**

Os protozoários do gênero *Leishmania* são eucariotos unicelulares flagelados pertencentes ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (CAVALIER-SMITH, 2016; MASLOV et al., 2013; FONSECA et al., 2014). Caracterizam-se por apresentar cinetoplasto (kDNA), localizado na região mitocondrial

constituída por moléculas circulares de DNA, encontradas na base do flagelo, contendo DNA mitocondrial (SIMPSON, 1987; STUART & FEAGIN, 1992).

As espécies de *Leishmania* estão distribuídas no Velho e Novo Mundo. Na América Latina se dividem em dois grupos: o do subgênero *Viannia*, cujas espécies são *L. (V) brasiliensis*, *L. (V) panamensis* e *L. (V) guyanensis* - responsáveis por infecções cutâneas e mucocutâneas – e, o do subgênero *Leishmania* constituído pelas espécies *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonenses* responsáveis pelas lesões cutâneas difusas (LOPES et al. 2017).

Já a Leishmaniose Visceral é causada por espécies do “complexo donovani”, atualmente formado por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (MAURÍCIO et al., 2000; LUKES et al., 2007; KUHLS et al., 2011). Essas espécies encontram-se distribuídas nas regiões da Índia, Bangladesh, Nepal, Paquistão, Mediterrâneo, compreendendo Europa e África e países das Américas (WILHELM, 2019).

Nas últimas décadas, estudos reanalisaram a taxonomia da espécie causadora de leishmaniose visceral nas Américas, sugerindo, portanto, o uso da nomenclatura *L. (L.) infantum chagasi*, visto que, com base nas técnicas de biologia celular e molecular, não foi possível apontar distinções entre *L. infantum* e *L. chagasi* (MAURÍCIO et al., 1999; MAURÍCIO et al., 2000; KUHLS et al., 2005; QUISPE-TINTAYA et al., 2005; KAUFER et al., 2017).

O parasito se apresenta nos hospedeiros de duas formas: promastigotas que são células alongadas, flageladas e móveis encontradas no intestino do hospedeiro invertebrado e, as formas amastigotas que são células ovóides, imóveis e sem flagelo, encontradas em células fagocitárias de mamíferos e responsáveis pela patologia da doença (FREITAS, 2010).

### 3.2.2 VETOR

Dípteros pertencentes ao gênero *Lutzomyia* são os vetores responsáveis pela transmissão da doença no Novo Mundo (CARVALHO et al., 2019). Acredita-se que 90% das espécies de *Lutzomyia* veiculam agentes patogênicos e são encontradas nas regiões tropicais (AKHOUNDI et al., 2016).

No Brasil, *Lutzomyia* possui ampla distribuição geográfica podendo ser encontrada em todas as regiões. Esses insetos medem cerca de 1 a 3 mm de comprimento, tendo o corpo revestido por pelos e de coloração clara (castanho claro ou cor de palha). As espécies encontradas são *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia migonei* essa última, foi relatada com uma alta densidade em locais com ausência de *L. longipalpis* e *L. cruzi* e com registro de casos autóctones da doença (BRASIL, 2016).



A espécie mais comum e considerada principal na transmissão do agente da leishmaniose é o *L. longipalpis*, possuindo fácil adaptação ao peridomicílio e variações de temperatura, podendo ser encontrada também no intradomicílio e abrigos de animais domésticos por conta das fontes de alimento. É possível que o período de maior transmissão da LV seja após a estação chuvosa, devido ao aumento da densidade populacional do inseto (BRASIL, 2016).

O ciclo biológico da *L. longipalpis* ocorre no ambiente terrestre e possui quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. As fêmeas põem seus ovos em substrato úmido e rico em matéria orgânica, garantindo a alimentação das larvas (BRASIL, 2014). A eclosão ocorre de 7 a 10 dias após a postura. O desenvolvimento das larvas ocorrem entre 20 a 30 dias em condições favoráveis. Em condições adversas, as larvas podem entrar em estado de diapausa, momento de pausa no metabolismo até que o ambiente esteja favorável novamente para continuação do desenvolvimento. Após, as larvas transformam-se em pupas, estágio mais resistente à variações ambientais e que dura cerca de uma ou duas semanas, tornando-se então insetos adultos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

De forma geral, a alimentação dos insetos adultos é crepuscular e noturna e, durante o dia, fica em repouso em lugares sombreados e úmidos protegidos do vento, calor elevado e de predadores. As fêmeas são obrigatoriamente hematófagas já que o sangue é um recurso necessário para o desenvolvimento dos ovos, devido a isso, elas são responsáveis pelo repasto sanguíneo e, conseqüentemente, pela transmissão do agente da leishmaniose para várias espécies de animais vertebrados (AKHOUNDI et al., 2016; BRASIL, 2016; TORRES-GURRERO et al., 2017).

### 3.2.3 HOSPEDEIROS

Há, aproximadamente, 70 espécies de mamíferos, incluindo os seres humanos considerados hospedeiros de diferentes espécies de *Leishmania* pelo mundo. Nesse grupo incluem-se animais que podem ser encontrados tanto no meio silvestre quanto no meio urbano (FRANÇA & SILVA et al., 2005).

Dentre os reservatórios silvestres, podem se destacar roedores, edentatos, primatas e alguns carnívoros, como exemplos podem ser citados são tamanduás, preguiças, raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) (SHAW, 2003; ROQUE –JANSEN, 2014).

Por conta do crescente processo de urbanização, o ciclo zoonótico de transmissão das leishmanioses ocorreu com maior proporção, pois além dos animais sinantrópicos, os

domésticos assumiram um papel importante como reservatórios de infecção, sendo eles o cão, felinos domésticos e humano (SHAW, 2003; BRASIL, 2014; DANTAS-TORRES, 2007).

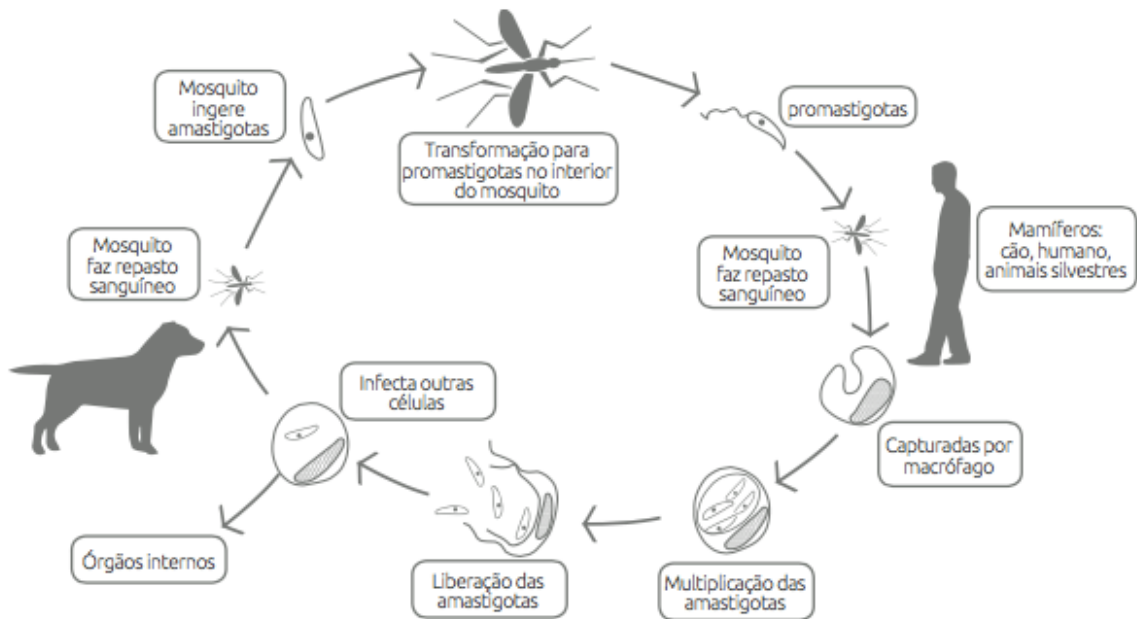
O cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório, já que a infecção desses animais, normalmente, precede a ocorrência de casos em humanos (CAMPINO, 2003; FRANÇA-SILVA, 2005). Esse hospedeiro possui uma maior susceptibilidade à infecção por *L. infantum* por apresentarem uma redução de células T dos seus órgão linfoides, enquanto as células B se proliferam, apresentando, assim, um intenso parasitismo. A transmissão ao homem, se deve ao convívio no mesmo ambiente (DANTAS-TORRES et al., 2007).

### 3.2.4 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico da Leishmaniose Visceral se inicia quando os flebotomíneos fêmeas, ao picarem o animal infectado, ingerem as formas amastigotas do sangue do reservatório e, em seu intestino, o parasito inicia um processo de transformação, no qual as amastigotas mudam para promastigotas pró-cíclicas e, depois, para promastigotas metacíclicas, formas infectantes aos hospedeiros vertebrados (VERA-IZAGUIRRE et al., 2006).

No momento dos repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita as promastigotas metacíclicas presentes em sua saliva na pele do hospedeiro (NEVES, 2016). O protozoário é fagocitado pelos macrófagos e, dentro do fagossoma, se transforma em amastigota, forma intracelular do parasito nos vertebrados. As amastigotas então, se multiplicam por divisão binária até que a célula se rompa e libere-as, para a infecção de novos macrófagos bem como outras células fagocíticas ou não fagocíticas (NADERER & MCCONVILLE, 2008; OLIVEIRA, 2016).

**Figura 1.** Ciclo da Leishmaniose Visceral



Fonte: Vetsmart, 2016.

A partir desse evento, há um aumento significativo da população de amastigotas de *L. infantum*, que pode alcançar vários órgãos do organismo hospedeiro, no entanto, o fator determinante para diminuição ou propagação da infecção é o tipo de resposta imune que será desencadeada pelo indivíduo, sendo Th1 ou Th2, e estas dependem também de fatores de natureza desconhecida como fatores genéticos, resposta efetiva de células *natural killer*, produção de citocinas, entre outros (CARLI, 2007).

### 3.3 Aspectos imunológicos do hospedeiro

Os parasitos e as lesões por eles causadas podem ser encontrados em todo o organismo do hospedeiro, sendo consideradas resultantes de reações inflamatórias proliferativas, causando um desequilíbrio imunológico. Nesse sentido, acredita-se que uma resposta humoral exacerbada e leva à deposição de complexos imunes provavelmente são os fatores responsáveis pela patogênese. Assim, a geração de resposta imunológica torna-se crucial para a eliminação ou propagação do parasito, visto que há variações relacionadas a presença de manifestações clínicas, baixa resposta imune celular e elevada resposta imune humoral que determinarão elevados níveis de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes, fatos relacionados à susceptibilidade da LV entre os indivíduos acometidos (PARANHOS-SILVA et al. 1996; BANETH et al., 2008; ALBUQUERQUE, 2013). Dessa forma, a diversidade de evidências clínicas e experimentais mostram o papel fundamental das células tipo Th1, que desenvolvem uma função protetora em relação às do tipo Th2.

É importante destacar que há dois tipos de respostas imune que podem ser demonstradas pelo organismo de um hospedeiro no momento de uma infecção, a saber: a imunidade inata, que consiste em uma resposta inespecífica para distinguir antígenos, e os mecanismos ativados são as barreiras químicas e físicas naturais que o hospedeiro possui, como mucosas e substâncias antimicrobianas existentes nela, bem como células fagocíticas do sistema imunológico, como macrófagos, neutrófilos e as *natural killer* – determinadas como “matadoras profissionais”; e a imunidade adaptativa, que consiste em uma resposta específica, na qual pode-se apresentar de duas formas no hospedeiro: Th1 e Th2, reconhecidas, usualmente como respostas celular e humoral (LARANGEIRA, 2008; ALMEIDA-SOUZA, 2018).

Com relação à imunopatologia da LV, após a ocorrência de coestímulos, inicia-se a produção de IL-12 por células dendríticas, que fagocitam os parasitos no sítio de inoculação e orientam a diferenciação de linfócitos T naíves em Th1, que induzirá a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 e TNF- $\alpha$  (BIRON e GAZZINELLI, 1995; SCHARTON-KERSTEN et al., 1995; ALEXANDER e BRYSSON, 2005). Essas citocinas recrutam macrófagos para eliminarem amastigotas intracelulares, pois ativam a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que induz a produção de óxido nítrico (FREITAS et al., 2010). Respostas do tipo Th1 ocorrem a partir do contato inicial com o antígeno, podendo ser por exposição natural ou vacinação. Esse mecanismo aumenta o processo de fagocitose e induz à morte os microrganismos presentes nos fagolisossomas, culminando com a produção de anticorpos IgG, que opsonizam os microrganismos para a fagocitose (MESQUITA JUNIOR et al., 2010). Baneth et al. (2008) apontam que animais que apresentam padrão de resposta do tipo Th1 conseguem controlar a infecção, reduzir a carga parasitária e não manifestar sinais clínicos característicos da doença.

Respostas do tipo Th2 estão associadas à produção de anticorpos IgE, que atuam contra parasitos, e seu aumento está relacionado a problemas alérgicos. Estas imunoglobulinas recrutam eosinófilos e mastócitos para combater os agentes causadores desses problemas (CAMARA, 2013). Brachelente et al. (2005) evidenciaram em seu estudo que a elevada produção de citocinas do tipo Th2 como IL-4, IL-10, IL13 e TGF- $\beta$ , influenciam na susceptibilidade da infecção por *Leishmania* sp., por desativar os macrófagos e, dessa forma, contribuir para a gênese desse tipo de resposta que promove o desenvolvimento da doença e apresentação de sinais clínicos graves. Taxas elevadas de IL-4 e IL-13 culminam na promoção da doença, pois há uma maior propagação do parasito no organismo do hospedeiro e baixa resposta a tratamentos, refletindo em sinais clínicos variados (NOBEN-TRAUTH, 2003; ALBUQUERQUE, 2013).

Além da resposta imune resultante dos processos de resposta Th2, existem, também, fatores relacionados à própria *Leishmania*, pois, apresentam Proteínas Moleculares Associadas ao Patógeno (PAMPs) que são produzidas pelos próprios microrganismos. Essas proteínas podem ser expressas tanto na forma amastigota (proteínas A2) quanto promastigota (LMPK) e estão relacionadas à sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado (WIESE e GORCKE, 2001).

A estrutura celular do protozoário apresenta proteínas com grande número de aminoácidos sendo consideradas isoformas por serem produzidas por diversos genes e, dessa forma, proporcionam a adaptabilidade do parasito favorecendo a infecção e a geração de sintomas no hospedeiro (KUBAR e FRAGAKI, 2006; FREITAS, 2010).

Outras moléculas presentes na membrana do parasito são o glicofosfoglicano ou LPG, LACK (Receptor de *Leishmania* homólogo à Quinase C Ativada) e metalproteínase gp63. Elas facilitam a introdução do parasito nas células do sistema imune do hospedeiro de forma que elas não sejam destruídas (FREITAS, 2010).

O LPG inibe a fusão do lisossomo ao fagossoma, evitando que enzimas proteolíticas e o pH ácido destruam as promastigotas, facilitando a transformação para a forma amastigota (BOGDAN E ROLLINGHOFF, 2000).

A LACK liga-se a receptores presentes nas células TCD4<sup>+</sup>, ativando a IL-4 favorecendo a susceptibilidade do hospedeiro ao parasito (SCHILLING e GLAICHENHAUS, 2001), enquanto a gp63 é capaz de acelerar a conversão da proteína de complemento C3b para C3bi que é um fator de opsonização da *Leishmania*, facilitando o englobamento pelo macrófago sem ativar substâncias microbidas (BRITINGHAM et al., 1995).

Observa-se, então, que diversos fatores contribuem para o a infecção e desencadeamentos de reações no organismo hospedeiro durante a infecção por *Leishmania*.

### **3.4 *Leishmania* spp. no Sistema Nervoso Central**

O Sistema Nervoso (SN) divide-se em dois tipos: o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Nervoso Periférico (SNP). O SNC é composto por órgãos como o cérebro e a medula espinhal. Essas estruturas estão protegidas pela caixa craniana e canal vertebral e são envolvidas por membranas de tecido conjuntivo chamadas meninges (FARIA, 2012).

O SNC tem como função principal processar as informações enviadas pelos órgãos dos sentidos e elaborar respostas que resultam em ações do organismo, como contração muscular, secreção de glândulas, sensações, pensamentos, dentre outras. Esse sistema é composto por uma variedade de células que são responsáveis por realizar essas funções, tais

como neurônios e células da glia, que incluem astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células endimárias (ROJAS, 2011).

Os neurônios no SNC se comunicam por meio de sinais químicos e elétricos e regulam o microambiente iônico local através de sinapses e axônios que auxiliam na sinalização neural. As camadas de barreira existentes no SNC desempenham um papel importante nesse sistema (ABBOTT, 2006). Há duas camadas de barreiras que limitam e regulam a troca molecular nas interfaces entre o sangue e o tecido neural: a barreira hematoencefálica (BHE), formada por células endoteliais cerebrovasculares; e a barreira sangue - líquido cefalorraquidiano (BSLCR), constituída pelo plexo coroide, a membrana aracnoide com os vasos sanguíneos e o líquido cefalorraquidiano expelido pelo epitélio do plexo coroide nos ventrículos (ABBOTT et al., 2010; ROJAS et al., 2011).

Indivíduos com um SNC desenvolvido possuem uma BHE bem desenvolvida (ABBOTT, 2005). No cérebro e medula espinhal de mamíferos, a BHE é originada de células endoteliais que formam as paredes dos capilares e constituem uma interface importante para a troca de nutrientes no sentido sangue-cérebro. No entanto, é válido salientar que a permeabilidade nessa região é altamente seletiva, impedindo a passagem de substâncias nocivas ao tecido nervoso, como agentes químicos, toxinas, antibióticos e até agentes infecciosos (NAG e BEGLEY, 2005; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2006).

A regulação na BHE fornece um ambiente estável para a função neural e auxilia na combinação de canais e transporte de íons específicos, mantendo a composição iônica ideal para a função de sinalização sináptica (BRADBURY et al., 1963). Logo, torna-se um meio eficiente de combinar as atividades da BHE aos requisitos do cérebro, seja para proteção contra agentes circulantes, ajuste do suprimento de nutrientes ou modificação para facilitar o reparo local, a fim de manter a saúde e auxiliar na recuperação de lesões ou infecções (ABBOTT et al., 2006).

Apesar dos mecanismos de regulação, podem ocorrer disfunções da BHE devido à abertura ligeira das junções oclusivas até a ruptura crônica da barreira (FÖRSTER, 2008), bem como do mau funcionamento dos mecanismos enzimáticos e de transporte. Esses problemas podem ser sinalizados pelo aumento de células da glia nos tecidos, presença de neutrófilos e leucócitos mononucleares circulantes, além de monócitos e macrófagos que atuam em uma resposta imune coordenada (BECHMANN et al., 2001; PERSIDSKY et al., 2006; KONSMAN et al., 2007). Portanto, a falha da BHE é um evento de caráter crítico, visto que o seu desenvolvimento pode progredir para a concessão de várias doenças cerebrais, incluindo



acidente vascular cerebral, trauma, epilepsia, doenças neurodegenerativas, tumores e infecções (FÖRSTER, 2008).

A BSLCR consiste no plexo coroide, que também é formado por células endoteliais e tem como função secretar o Líquido Cefaloraquidiano (LCR). A secreção ocorre do plexo coroide para o sistema ventricular cerebral (BROWN et al., 2004). O plexo coroide é composto por uma camada de células epiteliais altamente vascularizadas conectadas por junções oclusivas. Macrófagos e leucócitos também podem ser encontrados no plexo coroide, sugerindo seu papel como porta de entrada para o tráfego de células imunológicas em resposta a doenças e traumas (PRAGER et al., 2017).

Em todas as barreiras, a função resulta em uma combinação de barreira física (junções entre células reduzindo o fluxo através da via intercelular ou paracelular), barreira de transporte (mecanismos de transporte específicos mediadores do fluxo de soluto) e barreira metabólica (enzimas metabolizando moléculas em trânsito). Entretanto, a função de barreira não é fixa, mas pode ser modulada e regulada, tanto em fisiologia como em patologia (ABBOTT et al., 2006).

Durante muito tempo, acreditava-se que o SNC não estava dentro da rota da infecção por *Leishmania*, em virtude de várias peculiaridades desse sistema e da existência de barreiras que promovem maior proteção aos órgãos que o compõem. Entretanto, Prasad e Sen (1996) descreveram pela primeira vez o envolvimento do SNC, com o desenvolvimento de meningite e a detecção de formas amastigotas de *Leishmania donovani* no LCR em um paciente humano com LV. A partir de então, o SNC passou a ser alvo de muitos estudos, a fim de comprovar a capacidade das espécies de *Leishmania* em atravessar a BHE, causando alterações patológicas e o desenvolvimento de sinais clínicos neurológicos.

No mesmo ano, Garcia-Alonso et al. (1996) detectaram, pela primeira vez, anticorpos anti-*Leishmania* no LCR de cães positivos para LV. Nesse mesmo período, foi relatado um cão com leishmaniose apresentando coroidite caracterizada por infiltrado inflamatório de linfócitos e polimorfonucleares, além da detecção de formas amastigotas de *Leishmania* dentro de macrófagos revelados após impressão do plexo coroide em lâmina (NIETO et al., 1996). Nos últimos anos, estudos demonstraram alterações em tecidos do Sistema Nervoso Central de cães, nos quais foram descritas nodulações, massas ou granulomas associados à presença do parasito em medula espinhal de cães (FONT et al., 2004; CAUDURU et al., 2011; MÁRQUEZ et al., 2013; JOSÉ-LÓPEZ et al., 2014).

Em alguns relatos de casos, as alterações histopatológicas observadas no SNC de cães com LV foram caracterizadas principalmente por um infiltrado inflamatório composto de

linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos, em várias regiões do SN, como plexo coroide, meninges e parênquima cerebral, sem obrigatoriamente a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* no tecido nervoso e manifestação de sintomas neurológicos (IKEDA et al., 2007; MELO & MACHADO, 2009; MELO et al., 2009; MELO & MACHADO, 2011; MARQUEZ et al., 2012; MELO et al., 2013). Mesmo na ausência do parasito, lesões inflamatórias são comumente observadas, como leptomeningite e coroidite, com acúmulo de células mononucleares (VIÑUELAS et al., 2001; IKEDA et al., 2007). Especificamente em relação ao cérebro, Melo et al. (2015) observaram importantes alterações inflamatórias, com diferentes intensidades, variando de discretas a intensas, em cães portadores de LVC, os quais não apresentavam sintomatologia neurológica.

Alguns sinais neurológicos em uma cadela foram relatados por Font et al. (2004), que apontaram a presença de paraplegia aguda associada a vasculite, com extensa área de hemorragia no cordão espinhal, associada a presença de trombo e um infiltrado misto de células inflamatórias. Ikeda et al. (2007) observaram em um estudo minucioso com 21 cães acometidos por Leishmaniose visceral alguns sinais neurológicos como convulsões, cegueira, sinais de envolvimento vestibular e cerebelar (cabeça inclinada, nistagmo, incoordenação motora, queda, tremor), paraparesia, tetraparesia, tetraplegia e mioclonias.

Bargui et al. (2017), em pesquisa envolvendo a medula espinhal de camundongos experimentalmente infectados com *L. amazonenses*, demonstram a participação de moléculas relacionadas à inflamação, como TNF- $\alpha$  e fatores de transcrição gênica durante curso da doença no Sistema Nervoso Central. Esse perfil de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  também já foram relatados pontualmente no cérebro de cães positivos para a leishmaniose (MELO et al., 2013). Oliveira et al. (2017), em um estudo feito com 48 cães infectados com LV, detectaram o agente *L. infantum* por meio de cultura parasitológica em 25% dos animais para amostras de LCR, medula espinhal e cérebro.

Contudo, já foi provado na literatura que o protozoário *L. infantum* pode atravessar a BHE e expandir-se através do LCR, causando infecções no cérebro e medula espinhal de cães naturalmente infectados, adicionalmente, pode causar encefalomielite granulomatosa não supurativa, uma condição que pode levar a sinais clínicos neurológicos com progressão da doença. Portanto, a medula espinhal é um importante local de infecção por *L. infantum* no SNC e deve ser investigada em casos de cães com e sem sinais clínicos neurológicos de áreas endêmicas para a doença (OLIVEIRA et al., 2017).

Diante disso, apesar de já ser relatado o envolvimento do SNC na infecção por *Leishmania*, estas informações ainda não são suficientemente esclarecedoras para a

compreensão dos mecanismos de ação do agente nesse sistema e nos órgãos que o compõem, principalmente na medula espinhal, sendo portanto necessários mais estudos para melhorar a compreensão da infecção nesse sistema em seus aspectos parasitários e moleculares.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. **Neurochemistry International**, v. 45, p. 545–552, 2005.

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 41–53, 2006.

ABBOTT, N. J.; ADJANIE, A. K.; PATABENDIGE, D. E. M.; DOLMAN, S. R. Y.; DAVID, J. B. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurology of Disease**. Elsevier, 37, 13–25, 2010.

AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

ALBUQUERQUE, T. D. R. **Correlação entre a resposta imunológica e as manifestações clínicas na Leishmaniose Visceral Canina**. Dissertação (Mestrado) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology letters**, v.99, n.1, p.17-23, 2005.

ALMEIDA-SOUZA, F.; TANIWAKI, N. N., AMARAL, A. C. F.; DE SOUZA, C. S. F S.; CALABRESE, K. S.; ABREU-SILVA, A. L. Ultrastructural changes and death of *Leishmania infantum* promastigotes induced by *Morinda citrifolia* Linn. fruit (Noni) juice treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

ALMEIDA-SOUZA, F. **Imunologia Básica**. Instituto Oswaldo Cruz. 2018.

AMARA, A.; MRAD, I.; MELKI, M. K.; M RAD, M.B.; REJEB, A. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 160, n. 1, p. 54-60, 2009.

ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 1933–1938, 2000.

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

BECHMANN, I.; PRILLER, J.; KOVAC, A.; BÖNTERT, M.; WEHNER, T.; KLETT, F. F.; BOHSUNG, J.; STUSCHKE, M.; DIRNAGL, U.; NITSCH, R. Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 1651-1658, 2001.

- BEZERRA, J. M. T.; DE ARAÚJO, V. E. M.; BARBOSA, D. S.; MARTINS-MELO, F. R.; WERNECK, G. L.; CARNEIRO, M. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 9, 2018.
- BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J. L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.
- BIRON, C. A.; GAZZINELLI, R. T. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. **Current opinion in immunology**, v.7, n.4, p.485-496, 1995.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr Opin Immunol**, 12, 64-76, 2000.
- BRACHELENTE, C.; MÜLLER, N.; DOHERR, M. G.; SATTLER, U.; WELLE, M. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Vet Pathol**, v. 42, n. 2, p. 166-75, Mar 2005.
- BRADBURY, M. W.; STUBBS, J.; HUGHES, I. E.; PARKER, P. The distribution of potassium, sodium, chloride and urea between lumbar cerebrospinal fluid and blood serum in human subjects. **Clin. Sci.** 25, 97–105, 1963.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**: [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2017**. 2018. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniosevisceral/11334situacao-epidemiologica-dados> >. Acesso: 08 dez 2018.
- BROWN, P. D.; DAVIES, S. L.; SPEAKE, T.; MILLAR, I. D. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. **Neuroscience**, v.129, p. 957–970, 2004.
- BRUNO, B.; ROMANO, A.; ZANATTA, R.; SPINA, S.; MIGNONE, W.; INGRAVALLE, F.; BARZANTI, P.; CECCARELLI, L.; GORIA, M. Serum indirect immunofluorescence assay and real-time PCR results in dogs affected by *Leishmania infantum*: evaluation before and after treatment at different clinical stages. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 31, n. 2, p. 222-227, 2019.
- CAMARA, B. **Linfócitos T CD4: Th1 e Th2**. Biomedicina Padrão. 2013. Disponível em: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2010/10/linfocitos-th1-e-th2.html>. Data de acesso: 08/09/2019.
- CAMPINO, L. M. In: FARREL J., ed., World Class Parasites: *Leishmania*, v.4, **Kluwer Academic Publishers**. Boston, Dordrecht, London, 2003.
- CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. Editora Atheneus, São Paulo: 2007.

- CARVALHO, A. G.; LUZ, J. G. G.; RODRIGUES, L. D.; DIAS, J. V. L.; FONTES, C. J. F. Factors associated with *Leishmania* spp. infection in domestic dogs from an emerging area of high endemicity for visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil. **Research in Veterinary Science**, 2019.
- CAVALIER-SMITH, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. **European Journal of Protistology**, 56:250–276, 2016.
- CAUDURU, A.; FAVOLE, P.; LORENZO, V.; SIMONETTO, L.; BARDA, B.; CANTILE, C.; ASPERIO, R. M. Paraparesis caused by vertebral canal leishmaniotic granuloma in a dog. **J. Vet Intern Med**, v. 25, p. 398–399, 2011.
- COSTA, L. B.; BERTÚLIO, M. A.; RODRIGUES, H.; MACIEL, G. B.; FILHO, V. C.; RAMOS, S. R.; SOUZA, C. O.; SILVA, A. M.; BARROS, I. M. Ocorrência de Flebotomíneos Vetores da Leishmaniose Visceral nos Municípios do Estado de Mato Grosso. Congresso de Saúde Coletiva, Brasília, Distrito Federal. **Revista Abrasco** 8 (supl 2): 639, 2003.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **VetParasitol** 149: 139–146, 2007.
- DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; CAVALCANTI, M. P.; OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.
- DIAS, E. L.; BATISTA, Z. S.; NOGUEIRA, R. M. S.; CALABRESE, K. S.; LIMA, T. B.; ABREU-SILVA, A. L. Canine Visceral Leishmaniasis (CVL): Seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 740-745, jul./set. 2008.
- FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina: grandes avances tecnológicos y baja aplicación práctica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.
- FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XI**. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 266-270, 1992.
- FONSECA, A.M.; FARIA, A.R.; RODRIGUES, F.T.G.; NAGEM, R.A.P.; MAGALHÃES, RDM, CUNHA, J.L.; BARTHOLOMEU, D.C.; ANDRADE, H.M. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, 137, 25-30p., 2014.
- FÖRSTER, C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, p. 55–70, 2008.
- FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; COSTA, R. T.; MONTEIRO, E. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VIEIRA, E. P.; FORTES-DIAS, C. L. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 131(3-4):213-220, 2005.

FREITAS, J. C. C.; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências veterinárias**, v. 109, n. 55, p. 11-20, 2010.

FONT, A.; MASCORT, J.; ALTIMIRA, J.; CLOSA, J. M.; VILAFRANCA, M. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. **Jornal of Small Animal Practic**, 45, 199-201, 2004.

FUJIMORI, M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; DIAS, A. F. L. R.; RODRIGUES, J. Y.; NAKAZATO, L.; MADEIRA, M. F.; SOUSA, V. R. F. Prevalence and associated factors of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Maro Grosso, Brazil. **Acta Sci Vet**, v. 44, n. 1424, dez. 2016.

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

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

JOSÉ-LÓPEZ, R.; DE LA FUENTE, C.; PUMAROLA, M.; ANOR, S. Intramedullary spinal cord mass presumptively associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 2, p. 200-204, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 155 – 171, 2006.

KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D.; BARRAT, J.. The Evolution of Trypanosomatid Taxonomy. **Parasites & Vectors**. 10: 287, 1-17, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2204-7.

KONSMAN, J. P.; DRUKARCH, B.; VAN DAM, A. M. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. **Clinical Science**, v. 112, p. 1-25, 2007.

KUBAR, J.; FRAGAKI, K. *Leishmania* proteins derived from recombinant DNA: current status and next steps. **Trends Parasitol**, 22, 111-116, 2006.

KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes Infect**. 7: 1224 – 1234, 2005.

KUHLS K., ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E. M. F.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. **PLoS Negl Trop Dis**. 5: e1155, 2011.

LARANGEIRA, D. F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor**. 2008. 94 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós- Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Patologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

- LOPES, E. G. P.; MAGALHÃES, D. F.; SILVA, J. A.; HADDAD, J. P. A.; MOREIRA, E.C. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte – MG, 1993 a 2007. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1062- 1071, 2010.
- LOPES, J. V.; MICHALSKY, E. M.; SILVA, F. O. L.; LIMA, A. C. V. M. R.; AVELAR, D. M. COSTA, A., A. J.; FRANÇA-SILVA, J. C.; REGINA-SILVA, S.; FORTE-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Seroprevalence and molecular characterization of *Leishmania* in dogs from na endemic área of zoonotic leishmaniasis in Brazil. **Inter J Vet Med Sci**, v. 5, n. 1, p. 70-74, jun. 2017.
- LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci USA**. 104(22): 9375-80, 2007.
- MÁRQUEZ, M.; PEDREGOSA, J. R.; LÓPEZ, J.; MARCO-SALAZAR, P.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, p. 142–146, 2013.
- MASLOV, D. A.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V. LUKEŠ, J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends Parasitol**. 29 (1):43–52, 2013.
- MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, 16:188-98, 2000;
- MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, 119 ( Pt 3):237-246, 1999.
- MELO, G. D.; MACHADO, G. F. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral Leishmaniasis: a histopathological investigation. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 2, p. 69 – 74, 2009.
- MELO, G. D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R. O.; MACHADO, G. F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 162, p. 248–256, 2009.
- MELO, G. D.; MACHADO, G. F. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres. **Cell Tissue Res**, v. 346, p. 293–304, 2011.
- MELO, G. D.; SERAGUCI, T. F.; SCHWEIGERT, A.; SILVA, J. E. S.; GRANO, F. G.; PEIRÓ, J. R.; LIMA, V. M. F.; MACHADO, G. F. Pro-inflammatory cytokines pre-dominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis. A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 57–66, 2013.
- MELO, G. D.; SILVA, J. E. S.; GRANO, F. G.; SOUZA, M. S. B.; MACHADO, G. F. *Leishmania* infection and neuroinflammation: specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally-infected dogs. **Journal of Neuroimmunology**, v. 289, p. 21-29, 2015.
- MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; DE SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema imunitário-parte II:

fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**, 2006.

MOHAMMADIHA, A.; HAGHIGHI, A.; MOHEBALI, M.; MAHDIAN, R.; ABADIE, A. R.; ZAREIB, Z.; YEGANEHF, F.; KAZEMIA, B.; TAGHIPOURA, G. N.; AKHOUNDIB, B.; BARATIB, M.; MAHMOUDIA, M. R. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, 2012.

NADERER T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiol**, 10 (2):301-8, 2008.

NAG, S.; BEGLEY, D. J. Pathology and Genetics. **Cerebrovascular Diseases**. 2005.

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

NEVES, David Pereira. MELO, Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marcos; VITOR, Ricardo W. Almeida. **Parasitologia Humana**. Editora Atheneu Rio, 2016.

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

NOBEN-TRAUTH, N.; LIRA, R.; NAGASE, H.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. **Journal of immunology**, v. 170, n.10, p. 5152-5158, 2003.

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

OLIVEIRA, V. C. **Ocorrência de *Leishmania infantum* em sistema nervoso central de cães naturalmente infectados: lesões associadas e isolamento parasitológico de tecidos e líquido**.

82 f. Mestrado (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas)-Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2016.

<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25391>

OLIVEIRA, V.; BOECHAT, V.; MENDES JUNIOR, A.; MADEIRA, M.; FERREIRA, L. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **Plos One**, v. 12, n. 4, 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **Encuentro sobre vigilancia, prevención y control de leishmaniasis visceral (LV) en el Cono Sur de Sudamérica**. Foz do Iguaçu, Brasil. 2009. Disponível em: <[http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=16961&Itemid=](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16961&Itemid=)>. Acesso em: 28 jan. 2017.



PACIELLO, O.; OLIVA, G.; GRADONI, L.; MANNA, L.; MANZILLO, V. F.; WOJCIK, S.; TRAPANI, F.; PAPPARELLA, S. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, n. 2, p. 124-130, 2009.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas**. Leishmaniasis Report, n. 6, 2018. Disponível em: <[http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34856/LeishReport6\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34856/LeishReport6_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 21 out 2018.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI Jr, G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; & OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 55(1), 39-44, 1996.

PERSIDSKY, Y., RAMIREZ, S.H., HAORAH, J., KANMOGNE, G.D. Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. **Journal of NeuroImmune Pharmacology**, v. 1, p. 223–236, 2006.

PIMENTEL, D. S.; RAMOS, R. A. N.; SANTANA, M. A.; MAIA, C. S.; CARVALHO, G. A.; SILVA, H. P.; ALVES, L. C. Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in endemic area of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 4, p. 491-493, jul-ago. 2015.

PITTA, M. G.; ROMANO, A.; CABANTOUS, S.; HENRI, S.; HAMMAD, A. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n.8, p. 2379-87, 2009.

PRAGER, O.; FRIEDMAN, A.; NEBENZAHL, Y. M. Role of neural barriers in the pathogenesis and outcome of *Streptococcus pneumoniae* meningitis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 13, n. 3, p. 799-809, 2017.

PRASAD, Lala SN; SEN, Sandeep. Migration of *Leishmania donovani* amastigotes in the cerebrospinal fluid. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 6, p. 652-654, 1996.

QUISPE-TINTAYA, K. W.; LAURENT, T.; DECUYPERE, S.; HIDE, M.; BAÑULS, A. L.; DE DONCKER, S.; RIJAL, S.; CAÑAVATE, C.; CAMPINO, L.; DUJARDIN, J. C. Fluorogenic Assay for Molecular Typing of the *Leishmania donovani* Complex: taxonomic and clinical applications. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], Oxford University Press (OUP). v. 192, n. 4, p. 685-692, 15 ago. 2005. <http://dx.doi.org/10.1086/432077>.

ROJAS, H.; RITTER, C.; DAL PIZZOL, F. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 222-227, 2011.

ROQUE, A.L.R.; JASEN, A.M. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: GALVÃO, C., org. **Vetores da doença de chagas no Brasil [online]**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, pp. 75-87. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203- 09-6, 2014.

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is a required for natural killer cell activation and subseqente T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **Journal of immunology**, v. 154, n.10, p. 5320-5330, 1995.

SCHILLING, S.; GLAICHENHAUS, N.. T Cells That React to the Immunodominant *Leishmania major* LACK Antigen Prevent Early Dissemination of the Parasite in Susceptible BALB/c Mice. **Infection and immunity**, 69.2: 1212-1214, 2001.

SCHWARDT, T. F.; VIDES, J. P.; PACHECO, A. D.; LANGONI, H.; GENEROSO, D.; MACHADO, G. F.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M. Estudo da imunopatogenia das lesões no sistema nervoso central de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 442-451, 2012.

SHAW, J. J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. In: FARREL J., ed., *World Class Parasites: Leishmania*, v.4, **Kluwer Academic Publishers**. Boston, Dordrecht, London, 2003.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. **Rev Microbiol** (online). 29;41:363–62, 1987. Available from: [http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab\\_publications/Scanned/The\\_mitochondrial\\_Genome\\_of.pdf](http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab_publications/Scanned/The_mitochondrial_Genome_of.pdf)

SOUZA, C. S. F.; SILVA, V. L.; LABARTHE, N. Evaluation of DPP® and SNAP® Rapid Tests for diagnosis of *Leishmania infantum* canine infections. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

STUART, K.; FEAGIN, J. E. Mitochondrial DNA of Kinetoplastids. **International Review Of Cytology**, [S.L.], Elsevier, p. 65-88, 1992. [http://dx.doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62063-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62063-x).

SUNDAR, S.; SINGH, O. P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis & Therapy**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 443-457, 19 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40291-018-0343-y>.

TAFURI, W. L.; DE LIMA SANTOS, R.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. 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.

TORRENT, E., LEIVA, M., SEGALÉ, J. Myocarditis and generalized vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, 46, 549 – 552, 2005.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review [version 1; referees: 2 approved]. **F1000 Research**, v.6, n. 750, 2017.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. **Infectious Disease Clinics**, 33.1: 79-99, 2019.

VERA-IZAGUIRRE, D. S.; VEGA-MEMIJE, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; ARENAS, R. Leishmaniasis revisión. **Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica**, v. 4, n. 4, p. 252–260, 2006.

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

WIESE, M.; GORCKE, I. Homologues of LMPK, a mitogen-activated protein kinase from *Leishmania mexicana*, in different *Leishmania* species. **Med Microbiol Immunol**, 190, 19-22, 2001.

WILHELM, T. J. Viszerale Leishmaniose. **Der Chirurg**, p. 1-5, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The leishmaniasis: timeline of facts and the formidable quest for disease control**. 2018. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/news/Leishmaniasis-timeline-of-facts-and-the-quest-disease-control/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/news/Leishmaniasis-timeline-of-facts-and-the-quest-disease-control/en/)>. Acesso em: 21 out 2018.

## **CAPÍTULO 2**

### **DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E MOLECULAR DE LEISHMANIA NA MEDULA ESPINHAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS.**

## IMMUNO-HISTOQUIMICA AND MOLECULAR DETECTION OF LEISHMANIA IN THE SPINAL CORD OF NATURALLY INFECTED DOGS

### DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUIMICA E MOLECULAR DE LEISHMANIA NA MEDULA ESPINHAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS

#### DETECTION OF LEISHMANIA IN THE SPINAL CORD PORTIONS OF NATURALLY INFECTED DOGS

Danielle Jordany Barros Coutinho<sup>1</sup>; Ingrid Caroline Lopes Marques<sup>1</sup>; Ellainy Maria Conceição Silva<sup>1</sup>; Hanna Gabriely Pinto Gonçalves<sup>1</sup>; Larissa dos Santos Sarmento<sup>2</sup>; Fernando Almeida de Souza<sup>1,3</sup>; Alcina Vieira de Carvalho Neta<sup>4\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Patologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, São Luís, MA, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Patologia, Unidade de Estudos em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, São Luís, MA, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, São Luís, MA, Brasil.

#### ABSTRACT

The involvement of the spinal cord by *Leishmania* sp. is evident and studies that demonstrate the interaction of the parasite in the different portions of this organ are scarce, therefore, this work aims to detect the DNA of *Leishmania* sp. and the possible alterations in the portions of the spinal cord of naturally infected dogs. For this purpose, bone marrow fragments were collected from the cervical, thoracic and lumbar portions of 20 dogs seropositive for *Leishmania* sp. The samples were submitted to the qPCR, immunohistochemistry and histopathology techniques. All animals were positive for *Leishmania* sp. and the highest parasite average was 0.83 parasites/ngDNA. The thoracic region showed greater dispersion and the cervical portion had a high average of parasites in symptomatic individuals. Fourteen dogs showed lesions, with a predominance of degenerative lesions. Five animals, four symptomatic and one asymptomatic, presented immunostaining of *Leishmania* sp. Therefore, symptomatic individuals have a greater dispersion of parasites between the spinal cord portions; the lesions can be found in the different portions of the spinal cord regardless of clinical symptoms, in addition, the antigens found suggest transport through the circulatory pathways. However, *Leishmania* sp. can infect all portions of the spinal cord, with predominantly microscopic lesions in both symptomatic and asymptomatic dogs.

**Keywords:** Canine Visceral Leishmaniasis, Pathology, Central Nervous System

## RESUMO

O acometimento da medula espinhal por *Leishmania* sp. é evidente e estudos que demonstrem a interação do parasito nas diferentes porções desse órgão são escassos, logo, esse trabalho tem por objetivo detectar o DNA de *Leishmania* sp. e as possíveis alterações nas porções da medula espinhal de cães naturalmente infectados. Para tanto, foram coletados fragmentos da medula nas porções cervical, torácica e lombar de 20 cães soropositivos para *Leishmania* sp. As amostras foram submetidas às técnicas qPCR, imuno-histoquímica e histopatologia. Todos os animais foram positivos para *Leishmania* sp. e a média de parasitos mais elevada foi de 0,83 parasitos/ngDNA. A região torácica apresentou maior dispersão e a porção cervical uma média elevada de parasitos em indivíduos sintomáticos. Quatorze cães apresentaram lesões, com predominância de lesões degenerativas. Cinco animais quatro sintomáticos e um assintomático, apresentaram imuno-marcação de antígenos de *Leishmania* sp. Portanto, indivíduos sintomáticos possuem maior dispersão de parasitos entre as porções de medula espinhal; as lesões podem ser encontradas nas diferentes porções da medula independentemente da sintomatologia clínica, adicionalmente, os antígenos encontrados sugerem transporte pelas vias circulatórias. Contudo, *Leishmania* sp. pode infectar todas as porções da medula espinhal, apresentando lesões predominantemente, microscópicas tanto em cães sintomáticos, quanto assintomáticos.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose Visceral Canina, Patologia, Sistema Nervoso Central

## Introduction

Visceral Leishmaniasis (VL) is a zoonosis caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania*, which can infect different species of mammals, with domestic dogs being the main reservoirs of this disease (Torres-Guerrero et al., 2017). According to the World Health Organization (WHO), leishmaniasis is one of the seven most important and neglected tropical diseases, and represents a serious global health problem, and can be found on all continents except Oceania (WHO, 2018). In the Americas of the total reported cases, about 84% are registered in Brazil, followed by Colombia and Peru (PAHO, 2018).

VL is a chronic systemic disease and its clinical signs are variable (Ciaramella et al., 2007; Silva et al., 2017). Research carried out in recent decades has shown involvement of the Central Nervous System in dogs and addressed the appearance of neurological changes as a result of infection by *L. infantum* (Abreu-Silva et al. 2003; Cauduro et al. 2011; Grano et al., 2014; Macau et al., 2017).

These changes have been described as the occurrence of leptomeningitis, choroiditis, vascular congestion, infiltration of inflammatory cells, gliosis, satellitosis, neuronophagia and neuronal degeneration (García-Alonso et al., 1996; Nieto et al., 1996; Schwardt et al., 2012). In this same context, amastigote forms of *Leishmania* sp. were found in ependymal cells, lymphocytes and macrophages of the choroid plexus and in histiocytes in the meninges of dogs affected by the disease and these lesions are always related to immune system responses or mechanisms of action (Nieto et al., 1996; Márquez et al., 2013).

Despite this, studies that analyze the presence of *L. infantum* in the central nervous system are mostly performed in portions of the brain and in the spinal cord, the cervical portion is the most used or a pool of the three portions is made. According to our knowledge, there are no reports that discuss parasitism in the three portions separately, which assess both histopathological changes and the parasitic burden.

Thus, the aim of this study was to detect the DNA of *L. infantum* and characterize the changes that occurred in the different portions of the spinal cord of dogs with naturally infected VL, showing the possible differences in parasitism between portions and individuals with different clinical signs.

## **Material and Methods**

### ***Ethical issues***

This study was approved by the Animal Ethics and Experimentation Committee / UEMA, CEEA No. 013/2018.

### ***Animals and inclusion criteria***

Twenty dogs from the city of São Luís, an endemic area in the state of Maranhão, were selected from the Hospital Veterinário Universitário (HVU) “Francisco Edilberto Uchôa Lopes” and the Zoonosis Surveillance Unit - UVZ. All animals were serologically positive for *Leishmania* sp. in the techniques of immunochromatography (DPP®), RIFI or ELISA, acquired from January 2018 to May 2019.

The dogs were aged 7 months to 12 years, thirteen were males and seven were females. Fourteen (14) of these dogs were crossbred, two (2) Poodle, one (1) Pinscher, one (1) Shih Tzu, one (1) German Shepherd and one (1) Pit Bull.

Criteria considered for the classification of the groups were: positive dogs for leishmaniasis that presented at least three classic clinical signs of VL and dogs positive for leishmaniasis without presenting classic symptoms of the disease. Thus, ten dogs were classified as symptomatic and another ten asymptomatic.

### ***Sample collection***

Blood samples were stored in vacuum tubes with EDTA to obtain whole blood and without EDTA to obtain serum. After these procedures, the dogs were euthanized in accordance with Resolution N° 1000 of the Federal Council of Veterinary Medicine. The tutors authorized the donation of the corpse, by signing the consent form.

During necropsy, the spinal cord was assessed macroscopically and fragments of the cervical, thoracic and lumbar portions were collected. Those destined for the qPCR technique for the analysis of parasitic load were immediately stored in sterile microtubes free of nucleases and stored at -20°C until the technique was performed. While the fragments destined for histopathology and immunohistochemistry were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours and kept in 70% alcohol.

Additional tests were again carried out such as RIFI (Oliveira et al., 2008), ELISA (EIE, Biomanguinhos) and conventional PCR (Lachaud et al., 2002) in blood/serum samples both for confirming the diagnosis and for the differential diagnosis for *Toxoplasma gondii* (Homan et al., 2000).

### ***Histopathology and Immunohistochemistry***

After fixation, the fragments were processed by the histological technique described by Luna (1968), and then the paraffinized blocks were sectioned at a thickness of 5µm and the histological slides were stained with hematoxylin and eosin (HE) technique. The immunohistochemistry technique for the detection of *Leishmania* sp. was performed according to Tafuri et al. (2004) with changes. The reaction was revealed by diaminobenzidine (DAB) and, the slides, counterstained with Mayer's hematoxylin. Negative controls consisted of tissues known to be free from amastigotes and with replacement of the primary antibody by PBS

### ***DNA extraction and parasite burden quantification by qPCR***

For the DNA extraction process, the commercial kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) was used, according to the manufacturer's instructions. The concentration and quality of the extracted DNA were determined by reading on a spectrophotometer and visualizing on 1.5% agarose gel.

The procedures for quantifying the parasitic load and diagnosing VL in the spinal cord fragments were performed using the quantitative real-time PCR technique, in which duplicates of 20 µL reactions were used with samples at a concentration of 5 ng/µL of DNA and amplified in a 7500 Real-Time PCR System thermocycler (Applied Biosystems), using primers KDNA3 F (sense: 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGC-3 ') and KDNA3 R (antisense: 3'-



TACACCAACCCCCAGTTTGC-5'), previously described by Weirather et al. (2011) and whose target is a conserved region of the parasite kinetoplast, and the GAPDH FW (sense: 5'-TTCCACGGCACAGTCAAG -3 ') and GAPDH REV (antisense: 3'-ACTCAGCACCAGCATCAC-5 ') (GenBank n° AB038240.1), used as endogenous control of the reaction.

The standard curve was constructed from serial dilutions to one tenth of the known concentration of Leishmania DNA, extracted from in vitro culture of *L. infantum* promastigote forms, previously characterized by the National Reference Laboratory for Leishmania typing (CLIOC) at the Oswaldo Cruz Institute. The reactions were prepared with the addition of 1.0 µL of each primer at a concentration of 2.5 pmoles/µL, 10µL of Sybr Green PCR master mix (Applied Biosystems), 4 µL of DNA at a concentration of 5 ng, and 4.0 µL of DPEC water to complete the final reaction volume of 20 µL. The amplification occurred under the following conditions: an initial denaturation at 95 °C for 10 minutes; followed by 40 cycles of 95 °C for 15 seconds and 60 °C for 1 minute.

The results were analyzed using the 7500 Real-Time PCR program (Applied Biosystems), in which the dissociation curve formed and the quantification of the number of DNA copies were evaluated according to the standard curve.

### ***Statistical analysis***

The parasitic load data were submitted to non-parametric statistical analysis using the Mann Whitney test (Graphpad Prism 8.0, USA). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

### **Results**

The twenty dogs used were positive for Canine Visceral Leishmaniasis, confirmed by the diagnostic tests RIFI, ELISA and conventional PCR. According to the presentation of clinical signs, ten (50%) were classified as symptomatic, with symptoms compatible for CVL. The frequency of the main signs observed is shown in table 1. Additionally, one of the animals in the study presented paralysis of the pelvic limbs, without associated orthopedic changes. Another ten (50%) animals did not show any symptoms related to the disease.

### ***Histopathological analysis***

No macroscopic lesions were observed in the dogs' spinal cord. Regarding microscopic analysis, 14 (70%) animals showed lesions in at least a portion of the spinal cord evaluated, of these, eight, are part of the symptomatic group. Mainly, degenerative changes were observed,

such as gliosis, mild satellitosis, chromatolysis, neuropilic vacuolization, astrocytosis, neuron retraction, and necrosis (figures 1a, 1b and 1c). In addition, in two symptomatic animals it was possible to detect inflammatory lesions, such as localized lymphocytic perivascular cuff, cerebrospinal canal necrosis and discrete and focal areas of hemorrhage in the gray matter (figures 1d, 1e and 1f). Histopathological changes were not observed in the three portions of the dog's spinal cord that presented paralysis of the pelvic limbs, which makes it impossible for us to state that the paralysis had any relationship with the LVC.

As for the location of the lesions, the frequencies of involvement of the spinal cord portions were eight animals (40%) for the cervical portion, ten animals (50%) for the thoracic portion and nine animals (45%) for the lumbar portion. Table 2 summarizes the distribution of lesions according to the classification of symptoms.

#### ***Labeling of Leishmania antigens on the spinal cord***

There was positive labeling for specific antigens of *Leishmania* sp. (Figure 2) in the spinal cord of five different animals, among the three portions studied. Three of the five animals positive in this technique showed changes in histopathological analysis. Only one of the five animals positive for IHC belongs to the asymptomatic group. Therefore, the highest index of positivity in the labeling of anti-*Leishmania* antigens was in the symptomatic group. The frequency of immunostaining by portions and by symptomatology is summarized in table 3.

#### ***DNA detection and quantification of the parasitic burden of L. infantum in the spinal cord***

Seventeen (85%) of the twenty animals were positive for *L. infantum* in all portions of the spinal cord (cervical, thoracic and lumbar) and only three (15%) were positive in two portions.

Analyzing the groups of this study separately, it can be observed that in the asymptomatic group there was little dispersion between the average values in the portions, however, one (1) animal manifested with a high average parasitic load in the lumbar portion (approximately 0, 83). In the symptomatic group, the dispersion was greater (figure 3). One animal had a high load in the cervical portion (approximately 0.07) and, about five animals, in the thoracic and lumbar portions were slightly above average. When comparing the quantification in general for both groups, it is observed that there was little dispersion in the cervical and lumbar portions, however, the thoracic portion presented a high average in relation to the others. The thoracic portion stands out with the greatest dispersion among the others. Despite this, the observed differences were not statistically significant for both groups.

According to these results, it can be inferred that the presence of the parasite can be detected in any portion of the spinal cord, since the differences were not statistically relevant as to the amount of parasites found in the animals in both groups.

Regarding the spinal cord portions, it was noticed that there is a slight variation in the quantification of the parasitic load between the portions for both groups. The thoracic and lumbar portions do not differ from each other in both symptomatic and asymptomatic individuals, however, the cervical region has a certain tendency to the presence of parasites, since it presented a value of  $p = 0.0535$ , close to the estimated value for a statistically significant difference. (Figure 4).

## **Discussion**

A wide variety of clinical signs were observed in the animals in this study, especially dermatological signs, which was similar to that described by Saridomichelakis et al. (2009) and Contreras et al. (2018) when defining canine visceral leishmaniasis as a disease characterized by a wide and variable spectrum of clinical signs, with dermatological alterations being the most frequent lesions in dogs.

Likewise, the distribution of lesions in this random sampling of dogs was similar to the research by *L. infantum* on the central nervous system of 48 naturally infected dogs carried out by Oliveira et al. (2017) and, in studies by Macau et al. (2017) that accounted in percentages for the main clinical signs related to CVL, such as furfuraceous desquamation of the skin, by opaque skin, regional and generalized lymphadenomegaly, skin ulcers, splenomegaly, hepatomegaly and ophthalmic changes.

These clinical variations occur due to pathological mechanisms involved in the disease process such as the triggering of immunological processes resulting in inflammatory reactions resulting from the destruction of cells and tissues by the presence of the parasite and/or the formation of immune complexes (Baneth et al., 2008; Bruno et al., 2019).

On the other hand, the absence of symptoms in serologically positive animals, as occurred in part of the experimental group in this study, is also described in the literature as a possibility, based on the dichotomy and/or different immunological responses that dogs can develop against infection. In this sense, the asymptomatic animals included in this study confirm the hypothesis already well established by Baneth et al. (2008) who describe the presentation of clinical signs during CVL, directly related to the type of immune response manifested by the host.

Regarding histopathological changes, the percentages of lesion distribution per spinal cord portion were not discrepant, so any portion of the spinal cord is predisposed to have lesions and can be chosen to perform histopathological analyzes. The alterations frequently observed in the animals' spinal cord were mild degenerative alterations, without the presence of structures suggestive of *Leishmania* sp., or severe inflammatory lesions, suggesting that this portion of the Central Nervous System is less affected.

The degenerative lesions in this study are similar to histopathological findings in studies carried out by other authors (Ikeda et al., 2007; Macau et al., 2017) that show that degenerative lesions are common during infection by *L. infantum*. Most of the degenerative lesions were marked by the presence of glial cells, which play an important role in the destruction of pathogens, support and nutrition to neurons, therefore, it is frequently found in brain changes and, in an active stage in canine visceral leishmaniasis (Grano, 2016).

Few inflammatory changes were found in this study. Similar to reported by Oliveira (2016), evaluating 50 dogs with VL, only one (7%) animal had a lymphocytic perivascular cuff. These types of lesions are associated with reactions by lymphocyte cells that are frequent in diseases that affect the neurological system, as well as cells that appear in the subacute inflammatory phase of infections, thus, they can appear in chronic cytological conditions (Giannuzzi et al., 2017). In addition, inflammatory lesions can be triggered when peripheral stimuli, such as DNA, parasitic antigens or inflammatory mediators, reach the CNS and activate the inflammatory process (Oliveira et al., 2017).

However, Lianza (2001) points out that, even slight injuries, can progress to severe stages and result in permanent disabilities, since most cells of the central nervous system do not regenerate, they can weaken the hosts. Problems can evolve to focal or systemic changes resulting in biomechanical and pathological changes, resulting in functional deterioration and impaired structural integrity of the spinal cord. Although in our study we cannot determine how animals were affected clinically, since there were no animals with nervous symptoms. However, it is known that changes in the spinal cord can affect different parts of the body, considering that each portion has nerves associated with the development of certain body functions (Giacomini, 2007).

Amastigotes were absent in the tissue samples analyzed, which can refer to the chronicity of the disease, as the presence of the parasite forms is associated with early infection in dogs (Ikeda et al., 2007; Melo & Machado, 2009). This may also be associated with the distribution of the parasite through the tissues, which does not occur homogeneously in the body due to the tropism of the parasite and the stage of the disease (Faria et al., 2012; Moreira

et al., 2007). This predilection is greater for organs of the hematopoietic system and dermal regions, and is associated with a considerable number of leukocytes in these organs, a characteristic that the organs of the nervous system do not have (Braga, 2007; Kumar, 2010).

Although not a site of classic *Leishmania* tropism, previous studies have reported the presence of amastigote forms in the central nervous system associated mainly with inflammatory changes (Viñuelas et al., 2001; Márquez et al., 2013; Oliveira et al., 2017). In this study it was not possible to identify tissue forms of the parasite by histopathological analysis, however, the marking by immunohistochemistry was efficient to identifying of *leishmania* antigens. This technique is much more sensitive and is able to mark parasitic antigens and or even inflammatory mediators present in the tissues due to deposition of immune complexes transported through the bloodstream to the CNS (Borges, 2008).

Similar evidence was found in the studies by Oliveira et al. (2017), which associated the immunostaining of *Leishmania* sp. the presence of parasitic DNA or antigens, as well as inflammatory mediators that reach the CNS and activate the inflammatory process; Ikeda et al. (2007) and Barros and Magalhães (2011) suggested that the obtained mark was associated with antigens circulating through the tissue. Studies indicate that this situation can occur due to lesions in the Blood-Brain Barrier (BBB) that allow antigens or even antibodies against the parasite to have access to cerebrospinal fluid and the CNS. This process seems to be associated with the host's immune response since the pathogen's passage becomes facilitated due to the fragility of the defense system (Lima et al., 2003; Saridomichelakis, 2009; Rocha, 2012; Oliveira et al., 2017).

Infected individuals become more vulnerable and, depending on the host's susceptibility, the mechanisms used by the parasite to camouflage and evade the immune system can make even the protective barriers present in the CNS, previously considered "armored" susceptible and functioning as a gateway for the entry of these agents and antigens.

Regarding the quantification of the parasitic burden, the values obtained were compared between the groups and the portions of the spinal cord. We observed that any portion of the spinal cord can be used in a study with symptomatic and asymptomatic groups naturally infected by *Leishmania* sp. as demonstrating by our results since there was no statistical difference between the portions.

The highest average obtained in the parasite quantification in this study was 0.833 parasites/ngDNA, a value similar to that found by Oliveira et al. (2017) in a study on the occurrence of *Leishmania* sp. in the CNS of naturally infected dogs, detected the DNA of the parasite in spinal cord samples by means of quantitative PCR in real time, with a parasitic load

in this tissue superior to that found in the brain, presenting average of 0.823 and -2.302 respectively.

The highest average and greatest dispersion of parasites in this study was presented in the group of symptomatic individuals, an expected and common fact, since high amounts of parasites are associated with the type of immune response. According to Noben-Trauth, (2003) and Albuquerque (2013) the humoral response is caused by Th2-type cells that influence the susceptibility of the infection and culminate in the promotion of the disease due to the spread of the parasite in the host organism and the low response to treatments, reflecting on varied clinical signs.

This is a pioneering work in quantifying the parasitic load in the different portions of the spinal cord, since, to date, no studies have been found in the literature that have done this type of study, which report differences in the parasitic load between the portions of the spinal cord in dogs positive for *Leishmania* sp. and compared to the type of symptoms. The existing reports pooled the portions (cervical, thoracic and lumbar) or used only the cervical portion of the spinal cord (Oliveira, 2016; Oliveira et al., 2017). Since the nerves are attached to the spinal cord and performs communication between the brain and the body. Each portion is associated with a type of tissue or organ. So, studying the interaction of the parasite in the spinal cord is important, as injuries can also result in symptoms such as weakness, sensory loss or loss of tissue or organ function and even paralysis (Giacomini, 2007).

The absence of neurological signs in the dogs in this study may be related to the evolution of *Leishmania* sp. Infection, since the appearance of these signs may take longer to occur, due to the action of immune cells, inflammatory mediators, components of the parasite and, necessarily, by the protozoan itself (Grano et al., 2014).

In this context, the only animal that presented paralysis of the pelvic limbs and that was considered symptomatic for leishmaniasis, would not have this clinical manifestation related to parasitosis, because the parasitic load of this dog was very low, when related to that of the other animals of the symptomatic group. the highest averages were 0.07, 0.05 and 0.03 parasites/ngDNA, even lower than for some asymptomatic individuals, with the highest average being 0.83 parasites/ngDNA and the lowest 0, 0001 parasites/ngDNA. A differential diagnosis was made for *Toxoplasma gondii*, ruling out the possibility of co-infection by this agent, possibly, the lesion found in this dog may have been acquired mechanically or even because of its age, since it was an elderly animal.

## Conclusions

The results allow us to infer that the diagnostic tests applied were efficient in the detection of *Leishmania* sp. infection in the spinal cord tissues of naturally infected dogs evaluated in this research and that, regardless of the clinical signs presented or not by the animals, the DNA of *Leishmania* sp. could be detected in the spinal cord.

Degenerative lesions can be found in the three portions of the spinal cord of dogs naturally infected with *Leishmania* sp. Additionally, parasite antigens, through immunohistochemistry, can be detected, associated or not with inflammatory processes in the spinal cord of naturally infected dogs.

Finally, the detection of *Leishmania* sp. in the spinal cord confirms studies that report the parasite's ability to overcome the BBB, and reach the Central Nervous System of dogs, showing, therefore, that the pathogenic mechanisms used by the parasite to overcome the immune barriers work, and that additional studies are needed to fully understand the pathogenesis of infection in the CNS, as well as infection control, especially in the prophylactic context for the protection of both dogs and humans.

## Acknowledgments

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – PPGCA.

## REFERÊNCIAS

Albuquerque TDR. *Correlação entre a resposta imunológica e as manifestações clínicas na Leishmaniose Visceral Canina* [Dissertação]. Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2013. <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/19725>

Baneth G, Koutinas A, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 2008; 24 (7): 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>

Barros RM. *Caracterização histopatológica da Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal*. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, 2011. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/8587>

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(1): 64-76. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)00052-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)00052-7)

Borges, GLFN. Leishmaniose visceral canina no município de Uberlândia, Minas Gerais, outubro de 2007/ fevereiro de 2008 [Dissertação]. Uberlândia: Faculdade de Medicina Veterinária, 2008. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12948>

Braga ASC. *Fatores associados à evolução clínica da leishmaniose visceral em crianças hospitalizadas em centro de referência de Belo Horizonte, 2001 a 2005*. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/ECJS-7KLPUI>

Bruno B, Romano A, Zanatta R, Spina S, Mignone W, Ingravalle F, et al. Serum indirect immunofluorescence assay and real-time PCR results in dogs affected by *Leishmania infantum*: evaluation before and after treatment at different clinical stages. *J Vet Diagn Investig* 2019; 31 (2): 222-227. <https://doi.org/10.1177/1040638718824140>

Contreras IK, Machado MA, Rocha COJM, Oliveira GR, Carvalho FCG. Sinais clínicos apresentados por cães positivos para leishmaniose visceral no município de Vassouras, Rio de Janeiro. *Pubvet* 2019; 13 (4): 1-6. Doi: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a302.1-6>

Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina: grandes avances tecnológicos y baja aplicación práctica. *Rev Pan-Amaz Saude* 2012; 3 (2): 47-57. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232012000200007>

García-Alonso M, Nieto AG, Blanco A, Requena JM, Alonso C, Navarrete I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol* 1996; 18 (11): 539-546. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-28.x>

Giacomini MCC. *Trabalho Resistido Adaptado Visando a Independência de Pessoas com Paraplegia nas suas Atividades de Vida Diária*: 2007. 172f. Dissertação Mestrado em Educação Física – Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007. [http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/275166/1/Giacomini\\_MarciaCristinaCarriel\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/275166/1/Giacomini_MarciaCristinaCarriel_M.pdf)



Giannuzzi AP, Ricciardi M, De Simone A, Gernone F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. *Journal of small animal practice* 2017; 58 (3): 125-138. <https://doi.org/10.1111/jsap.12650>

Grano FG, Melo GD, Belinchón-Lorenzo S, Gomez-Nieto LC, Machado GF. First detection of *Leishmania infantum* DNA within the brain of naturally infected dogs. *Vet parasitol* 2014; 204 (3-4): 376-380. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.015>

Grano FG, Silva JEDS, Melo, GD, Perosso J, Lima VMF, Machado GFT lymphocyte immunophenotypes in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2016; 232: 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.006>

Homan W, Vercammen M, Braekeleer JD, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 2000; 30 (1): 69-75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00170-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00170-8).

Ikeda FA, Laurenti MD, Corbett CE, Feitosa MM, Machado GF, Perry SHV. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Braz J Vet Res An Sci* 2007; 44 (1): 5–11. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26653>

Kumar, V. Robbins & Cotran-Patologia bases patológicas das doenças. 8ª edição. Elsevier Brasil; 2010.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (1): 210-215. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.210-215.2002>

Lianza S. Medicina de reabilitação. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Lima VM, Gonçalves ME, Ikeda FA, Luvizotto MC, Feitosa MM. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36 (4): 485–489. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000400010>

Luna LG. Manual of histologic stains. Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Co., New York; 1968.

Macau WL, De Sá JC, Da Silva APDC, Rocha AL, Mondêgo-Oliveira R, De Andrade FHE, Abreu-Silva AL. Main lesions in the central nervous system of dogs due to *Leishmania infantum* infection. *BMC Vet Res* 2017; 13 (1): 255. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1174-5>

Márquez M, Pedregosa JR, López J, Marco-Salazar P, Fondevila D, Pumarola M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2003; 25: 142–146. <https://doi.org/10.1177%2F1040638712466728>

Masocha W, Kristensson K. Passage of parasites across the blood–brain barrier. *Virulence* 2012; 3: 202–212. <https://doi.org/10.4161/viru.19178>

Melo, G. D.; Machado, G. F. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral Leishmaniasis: a histopathological investigation. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 2, p. 69 – 74, 2009. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-683700>

Moreira M, Luvizotto M, Garcia J, Corbett C, Laurenti M. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology* 2007; 145: 245-52. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.012>

Naranjo C, Fondevilla D, Leiva M, Roura X, Peña T. Detection of *Leishmania* spp. and associated inflammation in ocular-associated smooth and striated muscles in dogs with patent leishmaniasis. *Veterinary Ophthalmology* 2010; 13 (3): 139-143. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2010.00768.x>

Noben-Trauth N, Lira R, Nagase H, Paul WE, Sacks DL. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *The Journal of Immunology* 2003; 170 (10): 5152-5158. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.10.5152>

Nieto CG, Viñuelas J, Blanco A, Garcia-Alonso M, Verdugo SG, Navarrete I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. *Veterinary Record* 1996; 139: 346–347. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.139.14.346>

Oliveira TMFS, Furuta PI, Carvalho D, Machado RZ. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Revista Brasileira*

*Parasitologia Veterinária* 2008, 17 (1): 7-11. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612008000100002>

Oliveira VC. *Ocorrência de Leishmania infantum em sistema nervoso central de cães naturalmente infectados: lesões associadas e isolamento parasitológico de tecidos e líquido*. 2016. 82 f. Mestrado (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas)-Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25391>

Oliveira V, Boechat V, Mendes Júnior A, Madeira M, Ferreira L. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. *Plos One* 2017; 12(4): 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175588>

Paciello O, Oliva G, Gradoni L, Manna L, Manzillo VF, Wojcik S, Trapani F, Papparella S. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. *Neuromuscular Disorders* 2009; 19(2): 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.10.013>

Petersen CA, Greenlee MHW. Neurological manifestations of *Leishmania* spp. infection. *J Neuroparasitology* 2011; 2: N110401; PMID: PMC3110707. PMID: [21666756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21666756/). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3110707/>

Rocha, AG. *Leishmaniose Visceral Canina no Rio Grande do Sul*: revisão bibliográfica. 2012. 47 f. Monografia (Especialização) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/69816>

Saridommichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology* 2009; 20: 471-489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00823.x>

Schwardt TF, Vides JP, Pacheco AD, Langoni H, Generoso D, Machado GF, Laurenti MD, Marcondes M. Estudo da imunopatogenia das lesões no sistema nervoso central de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2012; 442-451. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/74028>

Schilling S, Glaichenhaus N. T Cells That React to the Immunodominant *Leishmania major* LACK Antigen Prevent Early Dissemination of the Parasite in Susceptible BALB/c Mice. *Infection and immunity* 2001; 69 (2): 1212-1214. Doi: 10.1128/IAI.69.2.1212-1214.2001

Tafuri, WL, De Lima Santos R, Arantes RME, Gonçalves R, De Melo M. N, Michalick MM, Tafuri WL. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of immunological methods* 2004; 292(1-2): 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.05.009>

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000 Res* 2017; 6: 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

Viñuelas J, Garcia-Alonso M, Fernando L, Navarrete I, Molano I, Mirón C, Carcelén J, Alonso C, Nieto CG. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 2001; 101: 23–27. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00413-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00413-7)

Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *Journal Clinical Microbiology* 2011,49, 3892-3904, 2011. **Doi:** 10.1128/JCM.r00764-11

**Table 1.** Frequency of clinical signs observed in symptomatic dogs positive for Visceral Leishmaniasis. <sup>1</sup>Includes changes such as blepharitis, corneal ulcers, periocular alopecia and eye discharge; <sup>2</sup>Includes changes such as onicogrifosis, alopecia, ulcerative lesions and epithelial peeling.

**Table 2.** Frequency of lesions in the spinal cord portions of dogs with VL and according to the classification of symptoms.

**Table 3.** Frequency of immunostaining in portions of the spinal cord of dogs with VL and according to the classification of symptoms.

**Figure 1.** Light microscopy, spinal cord, dog. **A**, cervical portion of the spinal cord showing slight gliosis (arrowhead). **B**, chromatolysis of neuron cell body in gray matter (arrow) and satellite (arrowhead) HE, 40x. **C**, neuron retraction (arrow). **D**, Necrosis in the ependymal canal (arrow). And, focal hemorrhage in the gray matter (arrows). **F**, focal and discrete lymphocytic

perivascular cuff in the thoracic portion of the spinal cord (arrow). HE, Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . Objective **40x**.

**Figure 2.** Immunohistochemistry in spinal cord tissue of dogs naturally infected with LV. In **A**, Marking of *Leishmania* sp. by immunohistochemical reaction (arrows), located in the gray matter. Scale bar 50 $\mu\text{m}$ . Objective **40x** (**B**) Positive marking of *Leishmania* sp. in the ependymal channel (arrows). Scale bar 20 $\mu\text{m}$ . Objective **100x**.

**Figure 3.** Parasitic burden between symptomatic and asymptomatic groups of dogs with VL. **A**, mean values of parasites per portion of the spinal cord in the asymptomatic group, mean of the high lumbar portion, without showing dispersion between the portions. **B**, mean values of parasites per portion of the bone marrow in the symptomatic group, with greater dispersion in the thoracic and animal portions with a high parasitic load in the cervical portion. **C**, values from both groups for all portions of the spinal cord, greater dispersion in the thoracic portion and high mean in the lumbar portion.

**Figure 4.** Parasitic burden per spinal cord portion in symptomatic and asymptomatic dogs for VL. **A**, cervical portion showing high mean parasite value. **B** and **C**, there was no differentiation between the average amount of parasites.

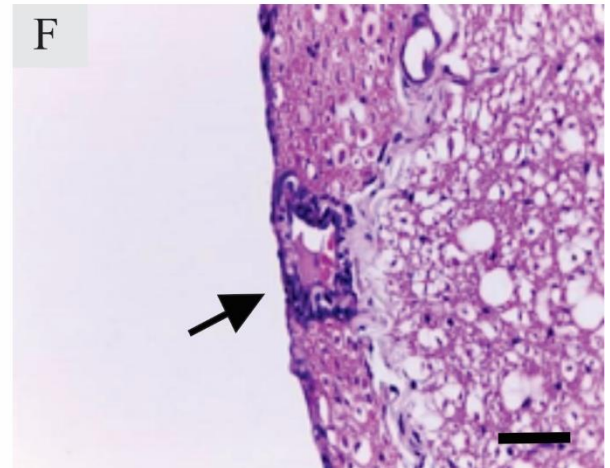
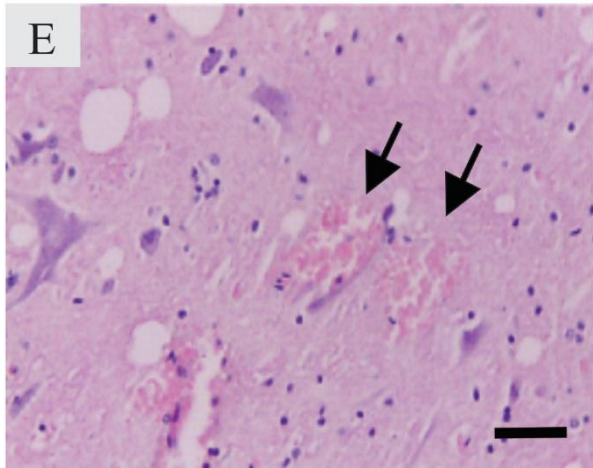
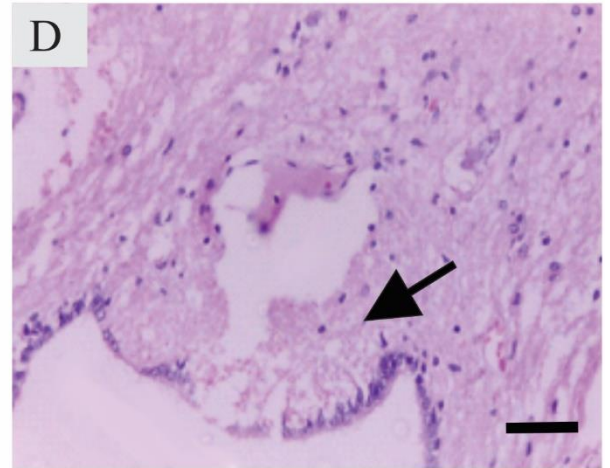
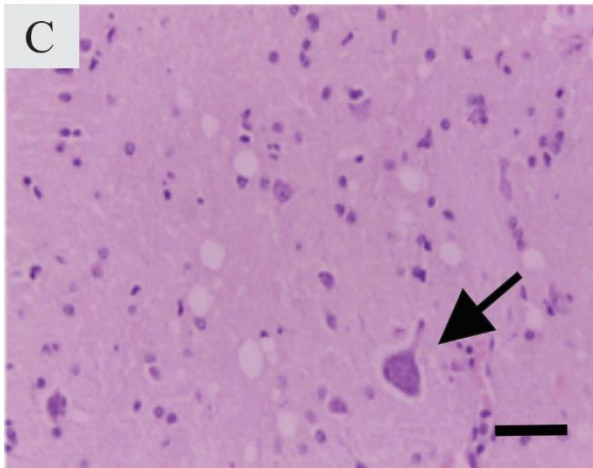
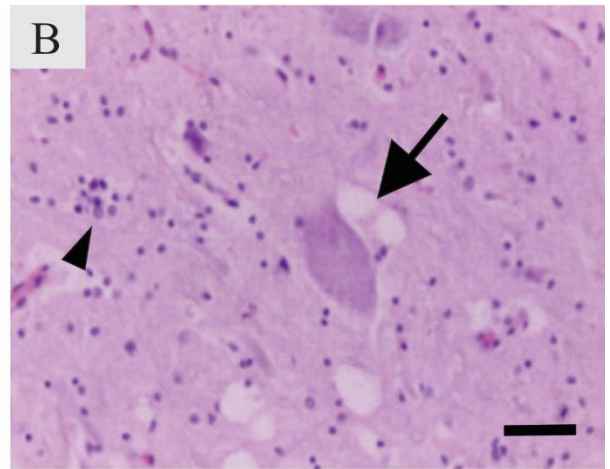
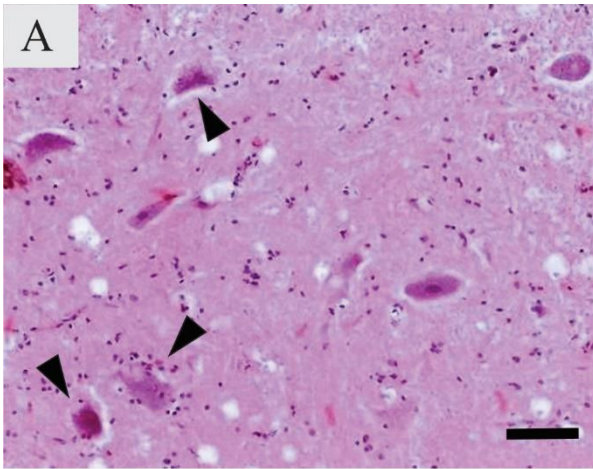
## TABLES

Sinais Clínicos	Frequência	
	N	%
Linfadenomegalia	8	80
Alterações oculares <sup>1</sup>	5	50
Alterações dermatológicas <sup>2</sup>	10	100
Anorexia	7	70
Esplenomegalia	6	60
Hepatomegalia	8	80
Sinais neurológicos	1	10

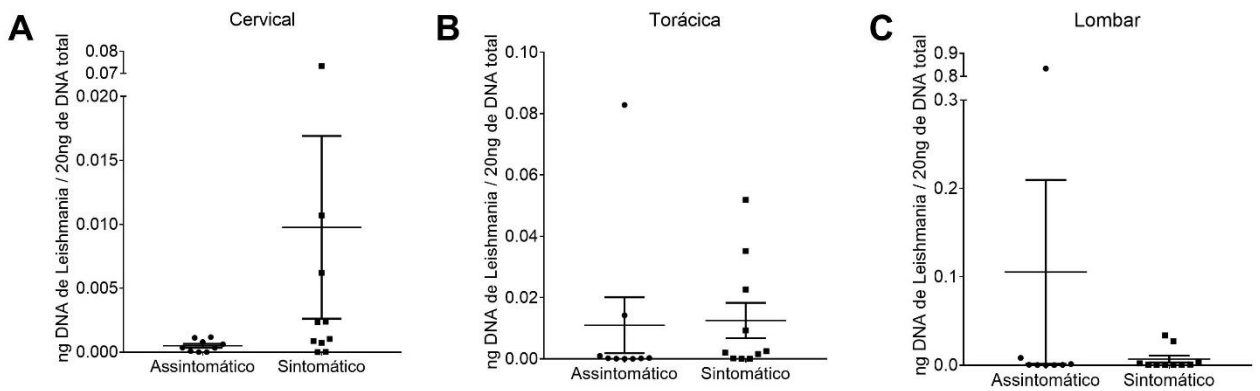
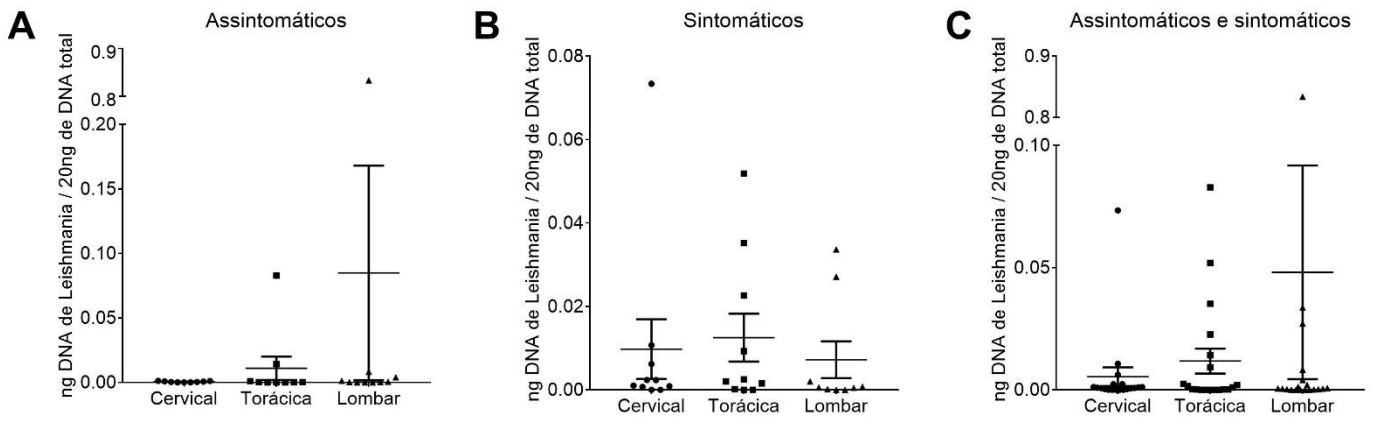
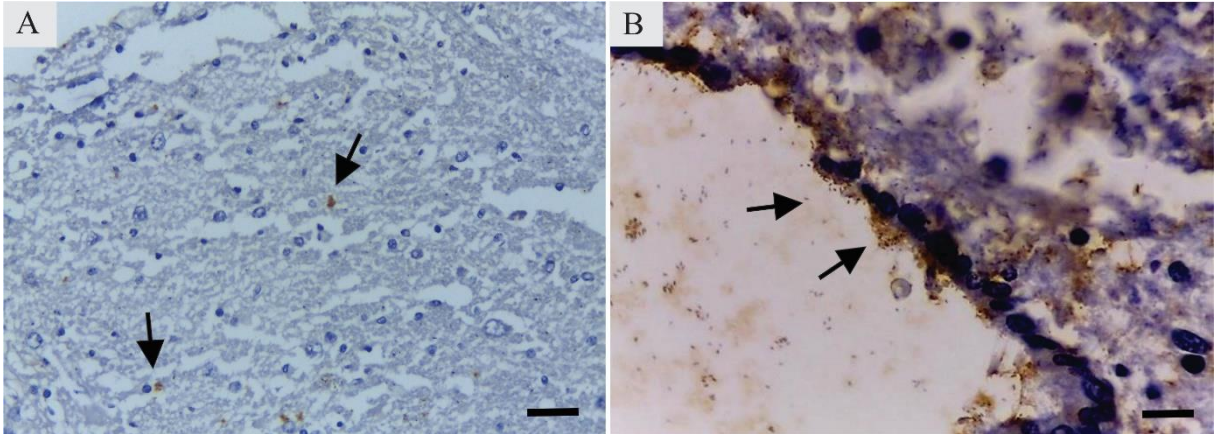
TECIDO	FREQUÊNCIA	SINTOMÁTICOS	ASSINTOMÁTICOS
<b>Cervical</b>	2/20 (10%)	1/2	1/2
<b>Torácica</b>	2/20 (10%)	2/2	---
<b>Lombar</b>	3/20 (15%)	2/3	1/3

TECIDO	FREQUÊNCIA	SINTOMÁTICOS	ASSINTOMÁTICOS
<b>Cervical</b>	<b>8/20 (40%)</b>	<b>4/8</b>	<b>4/8</b>
<b>Torácica</b>	<b>10/20 (50%)</b>	<b>6/10</b>	<b>4/10</b>
<b>Lombar</b>	<b>9/20 (45%)</b>	<b>5/9</b>	<b>4/9</b>

**FIGURES**









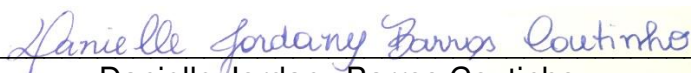
**TERMO DE COMPROMISSO DE DIVULGAÇÃO E PUBLICAÇÃO DOS  
RESULTADOS DO ESTUDO**

**TÍTULO DA PESQUISA: DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E MOLECULAR  
DE LEISHMANIA NA MEDULA DE ESPINHAL DE CAES NATURALMENTE  
INFECTADOS.**

**PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Danielle Jordany Barros Coutinho**

Eu, **Danielle Jordany Barros Coutinho**, responsável pelo projeto, **DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E MOLECULAR DE LEISHMANIA NA MEDULA DE ESPINHAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**, declaro meu compromisso, de divulgar e publicar quaisquer que sejam os resultados encontrados na pesquisa acima citada, em veículos de divulgação científica, resguardando no entanto, os interesses dos sujeitos envolvidos.

São Luís, 21 de Dezembro de 2023.



---

Danielle Jordany Barros Coutinho  
Responsável da pesquisa