

GEORGIA BRENDA BARROS ALVES

**Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães recém-infectados por *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi***

TERESINA/PI

2011

GEORGIA BRENDA BARROS ALVES

**Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães recém-infectados por *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa

TERESINA/PI

2011

GEORGIA BRENDA BARROS ALVES

**Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães recém-infectados por *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi***

Dissertação aprovada em: 21/02/2011

Banca examinadora:

Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa – CCA/UFPI

Orientador

Prof^a. Dra. Mariko Yokoo

Examinadora Externa (Titular)-USP

Prof^a. Dra. Maria das Graças Prianti – CCA/UFPI

Examinadora Interna

DEDICO

Aos meus pais Clobis e Rute, os quais dedicaram grandes esforços para minha formação como profissional e como pessoa.

Aos avós maternos Iraci e José Carlos, e às tias Leila, Kedma e Eliane, que sempre torceram e demonstraram preocupação e afeto.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela saúde a mim concedida.

Aos proprietários dos cães que participaram desta pesquisa, pela confiança e paciência essenciais para a conclusão deste estudo.

Ao orientador prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, por compartilhar seus conhecimentos.

À Prof.^a Dra Ivete Lopes de Mendonça do Laboratório de Sanidade Animal (LASAN), pelo apoio e fornecimento de material, sua participação foi de grande importância na execução deste trabalho.

Ao Professor Macêdo, diretor do Hospital Veterinário Universitário (HVU-UFPI), por possibilitar a conclusão da primeira etapa deste estudo.

Aos funcionários Thiago Saraiva (LASAN), Sr. Manoel (Setor de Patologia Animal), Dayara (HVU) e Marlene (HVU), pela atenção, colaboração e paciência dedicados a mim durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do Setor de Patologia Animal/CCA/UFPI, Karina, Larissa, Aline de Andrade, Joyce, Aline Dourado, Aline Martins, Ana Lys, Nilton, Fernando, Eduardo Braz e Francisco Leite, pela amizade e boa convivência. Agradeço especialmente à amiga Maria das Graças Prianti pela torcida e pela amizade verdadeira.

Aos meus pais Clobis e Rute, pelos bons ensinamentos que recebi, sobre honestidade, perseverança e simplicidade que sempre me foram importantes em qualquer momento de minha vida.

À amiga e colaboradora Lucilene dos Santos Silva, cuja participação foi essencial para a conclusão deste estudo.

Ao amado “colaborador” Érico Luiz dos Santos Araújo, que mesmo pertencendo a outro universo profissional, participou ativamente deste estudo, principalmente na cansativa rotina das coletas de material.

Às irmãs Betiana e Giliena, pelo carinho, preocupação e companheirismo, nas dificuldades desta caminhada.

Às queridas primas Layane, Rafaela e Janaína, pelas quais tenho um imenso carinho e às quais gostaria de agradecer pela amizade e pela motivação.

RESUMO

ALVES, G. B. B. **Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães recém-infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2011. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo *Leishmania (Leishmania) chagasi* a espécie que causa a doença na América Latina. Em cães a LV é caracterizada por uma resposta imune com altos níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania*. Marcadores de infecção têm sido amplamente investigados em cães com LV, sendo a sorologia um dos mais utilizados para esta finalidade. Cães com mais de três sinais clínicos mostram títulos de anticorpos maiores quando comparados com animais sem sinais clínicos, e a severidade da doença é relacionada com maiores títulos de IgG total e altos títulos estão associados com parasitismo ativo. Cães com LV quase sempre apresentam alterações renais. Mas falha renal é evidente somente quando a maioria dos néfrons tornam-se afuncionais. Glomerulonefrite e nefrite túbulo intersticial são achados comuns e a deposição de imunocomplexos nos glomérulos pode ser a causa dessas patologias. No presente estudo dentre 40 cães negativos para LVC acompanhados, 62,5% apresentaram sorologia positiva (soro-conversão) no período de um ano. Dos 25 cães que se tornaram positivos para LV, 60% tornaram-se soro-positivos dentro do período de três meses (2ª coleta); 20% dentro de seis meses (3ª coleta); e 20%, num intervalo de nove meses (4ª coleta). O percentual de animais com manifestações clínicas (72%) foi maior que o de animais sem sinais clínicos. Em nosso estudo, linfadenopatia e lesões de pele foram mais frequentes e a maioria dos cães apresentou títulos entre 1:40 e 1:80, independente da condição clínica. Dentre os soro-positivos, 88% apresentaram hiperproteinemia, 84% apresentaram hiperglobulinemia e 20%, hipoalbuminemia. De um modo em geral, observou-se níveis mais elevados de proteínas totais e globulinas, e níveis mais baixos de albumina nos animais infectados, quando comparados aos animais controles. Cães com sinais clínicos apresentaram níveis mais elevados de proteínas totais (88,8%) e níveis de albumina (83,3%) mais baixos que os controles negativos. Os animais infectados apresentaram níveis de uréia e creatinina mais elevados em relação aos cães negativos. No exame histopatológico foi observado infiltrado inflamatório perivascular mononuclear na região córtico-medular e na região cortical, de localização perivascular e peritubular de intensidade mínima a média; cilindros hialinos; atrofia de túbulos e expansão do mesângio de intensidade média. As alterações glomerulares foram caracterizadas como glomerulonefrite de alterações mínimas, glomerulonefrite mesangioproliferativa, glomérulo-esclerose segmentar focal e glomerulonefrite membranoproliferativa. Baseado nos resultados, concluiu-se que em Teresina a soro-conversão para leishmaniose visceral canina ocorre em pouco tempo. A maioria dos cães recém-infectados apresentam sinais clínicos, mas não apresentam altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*. Cães recém-infectados apresentam alterações estruturais renais que comprometem a função renal. A soro-conversão precoce contribui para a manutenção da endemia em Teresina.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral. soro-conversão. cães. rim.

ABSTRACT

ALVES, G. B. B. **Serum-conversion and evaluation of renal alterations in dogs newly infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2011. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis caused by protozoa of the genus *Leishmania* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* is the causes of the disease in Latin America. In dogs the VL is characterized by an immune response with high levels of IgG antibodies to *Leishmania*. Markers of infection have been extensively investigated in dogs with VL, being the serology used for this purpose. Dogs over three signs show higher antibody titers when compared to animals without clinical signs and disease severity is associated with higher total IgG titers and high titers are associated with active parasitism. VL dogs almost always have renal disorders. But kidney failure is evident only when the majority of nephrons become denied. Glomerulonephritis and interstitial nephritis are common findings and deposition of immune complexes in glomeruli may be the cause of these pathologies. In the present study among 40 dogs that were negative for LVC followed, 62.5% tested positive (seroconversion) during the period of one year. Of the 25 dogs that became positive for VL, 60% became positive within three months (2nd collection), 20% within six months (3rd sampling) and 20% in an interval of nine months (4th collection). The percentage of animals with clinical manifestations (72%) was higher than that of animals without clinical signs. In our study, lymphadenopathy and skin lesions were more common and most dogs had antibodies titers between 1:40 and 1:80, regardless of the clinical status. Among the positive, 88% had hyperproteinemia, 84% had hypergammaglobulinemia, and 20% had hypoalbuminemia. In a general way, we found higher levels of total protein and globulin, and lower levels of albumin in the infected animals when compared to controls. Dogs with clinical signs had higher levels of total protein (88.8%) and albumin levels (83.3%) lower than the negative controls. The infected animals showed levels of urea and creatinine higher compared to negative dogs. On histopathology was observed perivascular mononuclear inflammatory infiltrate in the cortico-medullary region and in the cortical region, perivascular and peritubular location of minimum to mean intensity; hyaline casts, atrophy of tubules and mesangium expansion of medium intensity. The glomerular alterations were characterized as minimal change glomerulonephritis, mesangioproliferative glomerulonephritis, focal segmenta glomerulosclerosis, membranoproliferative glomerulonephritis. Based on these results, we concluded that in Teresina seroconversion for canine visceral leishmaniasis occurs in a short time. The majority of the infected dogs show clinical signs, but do not have high titers of anti-*Leishmania* antibodies. Newly infected dogs have renal structural changes that compromise renal function. Seroconversion early contributes to the maintenance of the disease in Teresina.

Key words: Visceral Leishmaniasis. serum-conversion. dogs. kidney.

SUMÁRIO

RESUMO	05
ABSTRACT	06
1 INTRODUÇÃO	08
2 CAPÍTULO I: Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães recém-infectados por <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	42
ANEXO	52

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses ameaçam cerca de 350 milhões de homens, mulheres e crianças em 88 países. Atualmente, cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas, com 1 a 2 milhões de novos casos estimados a cada ano. Existem três formas de leishmanioses, cuja classificação é baseada no quadro clínico apresentado pelo hospedeiro: leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. A forma cutânea é a mais comum, onde há o aparecimento de úlceras na pele; já na forma mucocutânea, há destruição total ou parcial das mucosas do nariz, boca e tecidos circundantes. A forma visceral é a mais grave, onde uma grande quantidade de órgãos vitais é afetada (WHO, 2010).

Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, da ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae* (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006) pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, que compreende as espécies *Leishmania (Leishmania) donovani*, causadora de LV na Índia e no leste da África; *Leishmania (Leishmania) infantum*, importante na China, Ásia Central e nos países mediterrâneos da Europa e África, e *Leishmania (Leishmania) chagasi* presente na América Latina (LAINSON; SHAW, 1987; LAINSON; SHAW, 1992; BERMAN, 1997).

Atualmente, não está totalmente esclarecido se *L. chagasi* e *L. infantum* são a mesma espécie. Por isso vários estudos vêm sendo realizados com a finalidade de confirmar ou não esta possibilidade. A análise genética com amplificação de DNA polimórfico, análise de sequência de gp63, e hibridização de *L. chagasi* e *L. Infantum*, demonstrou que não existe diferença entre ambas e por essa razão devem ser consideradas como sinônimos (*Leishmania infantum* = *L. Chagasi*) (MAURÍCIO et al., 1999). Assim, sugere-se que para fins didáticos, o nome do agente etiológico deve ser escrito: *L. infantum* (= *L. chagasi*) (DANTAS-TORRES, 2006). Por outro lado, com base em pequenas diferenças fenotípicas e genotípicas, outros autores também acreditam que estes parasitas sejam diferentes e decidiram separá-los em duas subespécies: *Leishmania infantum infantum* e *Leishmania infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005). No Brasil, a LV é causada por protozoários da espécie *Leishmania chagasi*, também denominada por alguns autores como *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (SHAW, 2002; SHAW, 2006).

No Velho Mundo, Leishmaniose Visceral é transmitida por flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, enquanto que no Novo Mundo, vetores do gênero *Lutzomyia* assumem importância no ciclo (HERWALDT, 1999; WHO, 2010), sendo transmitida principalmente por insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (CARRERA, 1991; MARCONDES, 2001), mas há relatos de que

Lutzomyia cruzi também tenha participação na cadeia de transmissão no Brasil, sendo encontrada na área de Corumbá e Ladário, no estado de Mato Grosso do Sul (SANTOS et al, 1998), além de ocorrerem em 71% dos municípios do estado de Mato Grosso (MISSAWA; LIMA, 2006) e também em outras regiões onde *Lutzomyia longipalpis* está presente, como é o caso das regiões Nordeste e Sudeste (BRASIL; GOMES, 2003).

Flebotomíneos podem infectar mamíferos tanto em meio silvestre quanto em meio urbano. Em ambiente silvestre, raposas e marsupiais são tidos como principais reservatórios; já em meio urbano, cães domésticos assumem importância na cadeia epidemiológica da LV humana (DEANE; DEANE, 1954; MOLINA et al, 1994;. GIUNCHETTI et al, 2006).

Os vetores estão presentes principalmente em regiões tropicais e são mais ativos nos meses mais quentes, tendo atividade durante todo o ano na América do Sul. Sua atuação é crepuscular e noturna, entre 15 e 28 °C e sempre associada à alta humidade e ausência de chuvas ou ventos (KILLICK-KENDRICK,1999; SHARMA; SINGH, 2008). Assim, LV ocorre principalmente em áreas com clima seco e precipitação pluviométrica anual inferior a 800 mm (BRASIL, 2006)

Os registros de LV no mundo indicam que 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2010). Nas Américas a LV foi notificada pela primeira vez em 1913 como uma doença tipicamente rural (ALENCAR, 1959), mas na atualidade existe também nas áreas urbanas, principalmente na periferia dos grandes centros (COSTA et al, 1990; BRASIL, 1999; BRASIL, 2006; COSTA, 2008; QUEIROZ et al, 2009). Na América Latina, atualmente *Lutzomyia longipalpis* está bem adaptada ao ambiente peridomiciliar, onde participa do ciclo urbano (ZELEDON; MURILLO; GUTIERREZ, 1984; CARRASCO; MORRISON; PONCE, 1998; MORRISON et al, 1995; LAINSON; RANGEL, 2005; SALOMON; ORELLANO, 2005)

No Brasil a partir de 1980, mudanças epidemiológicas ocorreram: a transmissão da doença em áreas urbanizadas nas grandes cidades; a sua rápida difusão no Nordeste e em várias cidades da região Norte, Centro-Oeste e Sudeste (JERONIMO et al., 1994; COSTA et al, 1995; SILVA et al, 2001). Além da urbanização e difusão rápida da doença, houve uma grande proporção de casos urbanos e rurais, bem como o surgimento de grandes epidemias urbanas com ciclos de dez anos (SHERLOCK, 1996). Estas características na distribuição da Leishmaniose Visceral demonstram a existência de uma nova grande escala epidemiológica, uma vez que a urbanização mudou as características eco-epidemiológicas da doença (COSTA, 2008). Em áreas

endêmicas, a prevalência de leishmaniose visceral canina (LVC) é alta e geralmente precede a ocorrência de casos humanos (BRASIL, 1999).

Em 2007 no estado do Piauí, foram registrados 252 casos humanos e no Nordeste 1.726 casos foram notificados. Em Teresina no ano de 2009, foram registrados 72 casos de LV humana e 3.332 casos de Leishmaniose Visceral Canina (PIAUI, 2009; TERESINA, 2009). Estes casos ocorreram na periferia urbana da cidade, em áreas limítrofes de floresta verde e áreas de pastagens (WERNECK et al., 2002). Também foi observado que em habitações com maior número de moradores, localizadas em áreas com maior incidência da doença, há risco aumentado para a transmissão (COSTA et al., 2005). Embora o tipo de habitação e fornecimento de água não tenham sido relacionados a como fatores de risco, a falta de esgotos ou de coleta de lixo regular foram associados a uma maior incidência da doença. Além desses fatores, uma análise mostrou que nível socioeconômico (pobreza) e grandes áreas de vegetação, foram associados com maior incidência em humanos, como também amplificou a associação com a infecção canina antes e durante a epidemia humana (WERNECK et al., 2007). A associação com áreas verdes periurbanas indica que os ciclos de transmissão urbanos dependem de uma relação com o ambiente silvestre, existindo duas razões para essa dependência: (1) um aumento no grau de contato entre as fontes de infecção e indivíduos suscetíveis, mediada pelo aumento da exposição ao vetor na periferia, (2) e a existência de um ciclo de transmissão silvestre ligado às periferias urbanas por meio de mamíferos selvagens, ou seja, os reservatórios de *L. (L.) chagasi* que habitam as imediações das áreas urbanas, como a raposa e o gambá. Em raposas provenientes da periferia de Teresina foi observada a presença de níveis elevados de anticorpos contra a saliva do vetor; uma evidência de infecção natural (GOMES et al., 2007).

Teresina atualmente é uma área endêmica sendo dividida em áreas de intensa e moderada transmissão para leishmaniose visceral, baseado no número de casos humanos por ano, onde são implantadas medidas de controle mais enérgicas. Bairros com uma média de casos maior que 4,4, são considerados de intensa transmissão e aqueles que possuem média entre 2,4 e 4,4, são considerados como área de transmissão moderada. O bairro de Santa Maria da Codipi (Zona Norte) é considerado de transmissão intensa, pois possui uma média de 5 casos/ano. Já os Bairros Pedra Mole (Zona Norte), Santo Antônio, Angelim e Esplanada (Zona Sul) e Satélite (Zona Sudeste), são classificados como áreas de moderada transmissibilidade (TERESINA, 2010).

O ciclo biológico da *Lutzomyia longipalpis* se processa no ambiente terrestre e compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto, decorrendo um período

de aproximadamente 30 a 40 dias da fase de ovo até o estágio adulto. As fêmeas possuem longevidade de 20 dias e são hematófagas obrigatórias, alimentando-se em várias espécies de animais vertebrados (BRASIL, 2006). Ao fazerem o repasto sanguíneo em cães ou mamíferos silvestres infectados, passam a albergar o protozoário e uma vez infectadas, ao se alimentarem novamente, inoculam na pele dos hospedeiros formas infectantes do parasito (KILLICK-KENDRICK, 1999; BRASIL, 2006).

A *Leishmania* é um parasito difásico que completa seu ciclo vital em dois hospedeiros: no inseto vetor, onde se encontra na forma promastigota do protozoário, flagelada e extracelular; e no hospedeiro mamífero, que alberga a forma amastigota intracelular (KILLICK-KENDRICK, 1999). A infecção do inseto ocorre quando a fêmea alimenta-se no vertebrado, onde juntamente com o sangue, ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas. Durante o trajeto pelo trato digestivo anterior ou ao chegarem ao estômago do inseto, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas. Estas sofrem uma divisão binária e transformam-se rapidamente em promastigotas, que também por processos sucessivos de divisão, multiplicam-se ainda no sangue ingerido. As formas promastigotas das espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania*, multiplicam-se livremente ou aderidas às paredes do estômago do vetor, migrando em seguida para a região anterior, onde transformam-se em paramastigotas colonizando o esôfago e a faringe. Nestes locais, diferenciam-se novamente em promastigotas metacíclicas, as formas infectantes. O tempo necessário para que o ciclo se complete varia entre três e cinco dias para diferentes espécies animais (NEVES et al., 2005).

Em cães, *Lutzomyia longipalpis* alimenta-se principalmente na pele da orelha, do focinho e áreas inguinais e perianais. Estes, quando infectados podem ou não apresentar sinais, variando seu *status* clínico de leve ou ausente até doença severa, o que depende de sua resposta imune (ALVAR et al., 2004). Ao serem inoculadas na pele de cães, as leishmânias são fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro e dentro do vacúolo, são liberados óxido nítrico e hidrolases lipossomais na tentativa de eliminar o parasito. No entanto, mecanismos de evasão desenvolvidos pela *Leishmania* podem permitir sua fuga das defesas do hospedeiro, possibilitando sua sobrevivência e multiplicação nos macrófagos (ALVAR et al., 2004).

A resistência à LVC tem sido associada com a ativação de células T helper 1 (Th1), produtoras das citocinas Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina-2 (IL-2) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al., 1995), envolvidas na ativação de macrófagos para eliminar amastigotas intracelulares por atuação do óxido nítrico, mecanismo este que é tido como o principal efetor da resposta imunológica protetora nos cães infectados com *L. (L)*

infantum (VOULDOUKIS, 1996; PANARO et al., 2001). O papel da IL-12 na indução e manutenção de uma resposta do tipo Th1 tem sido pouco estudado na LVC. A expressão simultânea de mRNA de IL-12p40, de IL-2 e IFN- γ , foi observada em um curto período de tempo em cães experimentalmente infectados com *L. (L.) infantum* indicando que estas citocinas podem estar envolvidas num atraso do estabelecimento da doença nesses animais (SANTOS-GOMES et al, 2000). Além disso, foi observado que IL-12 aumentou a produção de IFN- γ por células mononucleares de cães com mais de 3 sinais clínicos, experimentalmente ou naturalmente infectados, o que indica a possibilidade de terapia com citocinas em cães (STRAUSS-AYALI et al, 2005). IL-12 também foi detectada em células de linfonodos de cães vacinados contra *L. (L.) infantum* (RAMIRO et al, 2003); resultados semelhantes também tem sido observados com IL-18 (CHAMIZO; MORENO; ALVAR, 2005).

Poucos estudos têm demonstrado o envolvimento de células T CD8+ na resistência a LVC. Estas células foram detectadas em cães sem sinais clínicos experimentalmente infectados com *L. (L.) infantum*, mas não foram detectados em cães com mais de 3 sinais clínicos, sugerindo que a lise direta dos macrófagos infectados pelos linfócitos T citotóxicos representam um mecanismo efetor adicional na resistência a LV (PINELLI et al, 1995).

Já na resposta T helper 2 (Th2), o papel das citocinas envolvidas na susceptibilidade à LV ainda não foi definido (BARBIERE, 2006). IL-4 tem sido citada como uma das citocinas relacionadas com a progressão da doença (PINELLI et al., 1999; QUINNELL et al., 2001; PINHEIRO et al., 2005), já IL-10, que em humanos infectados tem relação com a progressão da patologia (GHALIB et al., 1993), no cão, dados sobre a sua participação ainda são controversos. (BARBIERI, 2006). Evidências de uma resposta mista Th1/Th2 tem sido reportada em estudos com células mononucleares do sangue periférico (CMSP) antígeno-estimuladas de cães infectados sem sinais clínicos, onde observou-se transcrição de mRNA de IL-2 e IFN- γ (relacionadas com a infecção assintomática) e IL-10 (relacionada a infecção severa em humanos), porém neste estudo IL-10, não pôde ser relacionada a infecção sintomática em cães (SANTOS-GOMES et al, 2000). Mas, outros estudos com CMSP de cães com mais de 3 sinais clínicos infectados com *L.(L.) chagasi* demonstraram altos níveis de IL-10 detectados através de ELISA. Em contrapartida, baixos ou indetectáveis concentrações desta citocina foram encontrados em sobrenadantes de CMSP de cães com poucos sinais clínicos e cães sem sinais clínicos respectivamente (PINHEIRO et al, 2005).

Embora IL-10, secretada por células T reguladoras CD25⁺CD4⁺ tenham sido relatadas na Leishmaniose murina e humana, o envolvimento destas células em cães não tem sido explorado. Quanto a IL-4, expressão de mRNA não foi detectada em CMSP de cães sem sinais clínicos estimuladas por antígenos de *Leishmania* solúveis (CHAMIZO; MORENO; ALVAR, 2005). Em outros estudos, expressão de mRNA de IL-4 foi detectada em CMSP de cães com mais de 3 sinais clínicos (PINELLI et al, 1999) e em aspirados de medula óssea de cães com os mais severos sinais clínicos (QUINELL et al, 2001). Além disso, detecção de IL-4 por ELISA no sobrenadante de CMSP de cães estimulados com cisteína proteinase recombinante de *L. (L.) chagasi* mostraram níveis significantes desta citocina no sobrenadante de cães com mais de 3 sinais clínicos, ao passo que esta citocina não foi detectada em sobrenadantes de animais com poucos ou com nenhum sinal clínico (PINHEIRO et al, 2005), dados estes que remetem a participação desta IL-4 na progressão da LVC.

Além disso, a participação de células T reguladoras, relatadas como tendo função imunossupressora na leishmaniose murina e humana, ainda não tem sido muito explorada na LVC (BARBIERI, 2006). A resposta imune em LVC, também, é caracterizada por um aumento da regulação policlonal de células B e uma resposta clonal de imunoglobulinas específicas (QUINELL et al., 2003). Assim, cães infectados podem apresentar resposta imune ativa, com altos níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* mas que não conferem proteção ao animal (GRADONI, 2002). É estimado que o tempo entre a infecção e a soro-conversão varie de 3 meses a 7 anos (BANETH, 2006).

Possíveis marcadores de infecção têm sido amplamente investigados em cães com leishmaniose visceral, sendo a sorologia um dos mais utilizados para esta finalidade (ASHFORD et al., 1995; REIS et al., 2006a; DOS-SANTOS et al., 2008). A descoberta das subclasses de IgG tem levantado muitas questões entre pesquisadores (BARBIERI, 2006), pois tem sido proposto que IgG1 e IgG2 possam ser utilizadas como indicadores do *status* clínico do cão (QUINELL et al, 2003; DE AMORIM et al., 2010); densidade parasitária (REIS et al., 2006b); infectividade para *Lutzomyia longipalpis* (DA COSTA-VAL et al., 2007) e resposta ao tratamento (SOLANO-GALEGO et al., 2001).

Uma correlação direta entre a indução de altos níveis de anticorpos IgG1 anti-*Leishmania* e o aparecimento de sinais clínicos, foi demonstrada em cães infectados com *L.(L.) infantum*, enquanto que anticorpos IgG2 foram associados com infecção sem sinais clínicos (NIETO et al.,

1999), semelhante ao que ocorre em humanos infectados (ANAM et al., 1999). Dados mais recentes também mostraram uma alta expressão de IgE, além de IgG1, em cães com mais de 3 manifestações clínicas de diferentes áreas endêmicas, abrindo perspectivas para seu uso potencial como marcadores de doença ativa (ALMEIDA et al., 2005; INIESTA et al., 2005).

Pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), foi observado que cães com mais de três sinais clínicos mostraram títulos de anticorpos mais elevados quando comparados com animais sem sinais clínicos e a severidade da doença foi correlacionada com maiores títulos de IgG total (GIUNGETTI et al., 2008). Sorologia positiva com altos títulos foi associada com parasitismo ativo e a presença de sinais clínicos da doença em cães infectados com *L. (L.) chagasi*, e por isso foi associada à susceptibilidade a infecção (DOS SANTOS et al., 2008), havendo alta chance de detecção do parasito pelos exames parasitológicos (DYE; VIDOR; DEREUFE, 1993; PINELLI et al., 1994; QUINELL et al., 2003). Assim, sugere-se que a sorologia pode ser usada como um marcador de susceptibilidade ou resistência em LVC (DOS SANTOS et al., 2008).

Alguns cães com sorologia negativa podem albergar leishmânias, possivelmente indicando um estado inicial da doença e nessa fase, cães infectados com *L. chagasi* podem desenvolver linfadenomegalia e dermatite sem outros sinais de LV (ABRANCHES et al., 1991), vindo a apresentar quadro clínico mais severo com o passar do tempo de infecção, com perda de apetite, febre, perda de peso, alopecia, ulcerações de pele, onicogribose, uveítes, sangramentos, diarreia, poliartrites, e insuficiência renal (ALENCAR, 1959; BETTINI; GRADONI, 1986; ABRANCHES et al., 1991; MOLINA et al., 1994). Os títulos de anticorpos em cães variam de 1:40 a 1:40.960, denotando que os animais encontram-se em fases de infecção diferentes, o que também pode explicar o teste parasitológico negativo em alguns animais (MADEIRA et al., 2009).

Grande número de animais com teste parasitológico positivo são observados com títulos mais altos na sorologia, ao passo que animais com teste parasitológico negativo apresentam títulos de IgG menores. Uma grande variação da carga parasitária em cães soropositivos tem sido observada, o que pode estar relacionado, também, ao tipo de diagnóstico, a área investigada ou mesmo ao curso da doença no animal (DYE; VIDOR; DEREUFE, 1993; DOS SANTOS et al., 2008). A positividade ao teste parasitológico é diretamente associada com o crescimento dos títulos de IgG detectados por Imunofluorescência Indireta (IFI) (MADEIRA et al., 2009). Além disso, um crescimento exponencial de parasitos no baço é associado com o crescimento dos níveis de anticorpos, uma vez que a quantidade de parasitas pode determinar a intensidade da

resposta de anticorpos (REIS et al .2006a). Mas, apesar do esforço para identificar esses marcadores, baseado no perfil de resposta imune anti-parasitária em combinação com a clínica e dados parasitológicos, nenhum dos parâmetros relatados é ainda definitivo. O entendimento da distribuição desses parâmetros na infecção por *L.(L.) chagasi*, pode ajudar a contribuir para avaliação de novas terapias e vacinas (DOS SANTOS et al, 2008).

A LV atinge com maior intensidade órgãos do sistema fagocítico mononuclear (SFM) como fígado, baço, medula óssea e linfonodos, mas outros órgãos como rins, trato gastrointestinal e pele, também, são acometidos (COUTINHO et al., 2005). Após os protozoários serem inoculados pelo vetor, a pele é o primeiro ponto de contato do protozoário com o hospedeiro. Estudos descreveram vários aspectos macroscópicos de lesões de pele (descamação, alopecia, dermatite pustular, dermatose nodular ulcerativa) que podem estar associadas com a resposta imune (ADLER; THEODOR, 1932; CUNHA, 1938; TORRES, 1941; FERRER et al., 1988). Histopatologicamente, na pele de cães infectados por *Leishmania*, as células inflamatórias predominantes são macrófagos. Linfócitos e plasmócitos são o segundo tipo de células mais frequentes. Contudo, infiltrado inflamatório é um achado comum na pele de cães, independentemente da presença de parasitas ou evidência de infecção por *Leishmania*. No entanto, o parasitismo na pele sempre está associada à inflamação (DOS-SANTOS et al., 2004; VERÇOSA et al 2008). Cães com manifestações clínicas apresentam intenso infiltrado inflamatório dérmico difuso, com uma elevada carga parasitária (GIUNCHETTI et al., 2006), sendo que macrófagos infiltrados (GIUNCHETTI et al., 2006) ou macrófagos e neutrófilos (VERÇOSA et al., 2008), são mais frequentemente associados à presença de leishmânias.

No fígado, a avaliação imunopatológica associada com parasitismo e os achados bioquímicos têm sido utilizados para melhor entender a gênese da hepatomegalia na LVC (GIUNCHETTI et al., 2008a). Intensa reação das células de Kupffer, inflamação da cápsula e do espaço porta, com presença de granuloma intralobular é observado nos diferentes grupos clínicos. Os animais com manifestações clínicas apresentam maior frequência de parasitismo em relação aos sem manifestações clínicas; as alterações inflamatórias são mais intensas nos cães com manifestação clínica e são associadas ao parasitismo. Estes resultados indicam uma associação entre alterações hepáticas (infiltração de células inflamatórias da cápsula hepática, inflamação do espaço porta, hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer) e alterações bioquímicas (hiperglobulinemia), de acordo com a progressão clínica de LVC (REIS et al., 2009)

O baço aumenta de volume, devido à hipertrofia e hiperplasia das células do SFM, com alto grau de parasitismo e com grande diferenciação plasmocitária (MARZOCHI et al., 1981).

As alterações apresentam graus variados de intensidade e o aspecto macroscópico das lesões está relacionado com a evolução da doença, como fibrose da cápsula, acompanhada por periesplenite e hiperplasia da polpa branca, que normalmente ocorre nos casos com manifestações clínicas de evolução crônica, nos quais o baço apresenta uma consistência firme, cápsula espessa e rugosa e parênquima granular grosseiro. Em outros casos o órgão apresenta cápsula tensa, deixando transparecer a hiperplasia da polpa branca (KRAUSPENHAR et al., 2007). Essas alterações são mais intensas nos cães com manifestações clínicas do que naqueles sem manifestações (REIS et al., 2009). Observa-se, também, hipertrofia e hiperplasia da polpa vermelha em todos os grupos infectados, devido a infiltrado mononuclear de células, principalmente plasmócitos, e na polpa branca há substituição de macrófagos por linfócitos em decorrência de hipertrofia e hiperplasia desta região (REIS et al., 2009).

Na medula óssea, os histiócitos parasitados vão gradativamente substituindo o tecido hematopoiético (REY, 2001). No linfonodo, apesar de ser um dos tecidos linfóides mais envolvidos na interação parasita-hospedeiro durante a infecção por *L. (L.) chagasi*, a base celular e molecular da resposta imune nesse órgão, bem como as alterações estruturais microscópicas, não estão completamente estabelecidas. Há poucos estudos focados no linfonodo no curso da LVC (KEENAN et al., 1984; MARTINEZ-MORENO et al., 1993; TAFURI et al., 2001.; LIMA et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2008b). Uma detalhada análise histopatológica do linfonodo demonstra hipertrofia e hiperplasia das zonas cortical e medular nos animais sem manifestações clínicas, enquanto que atrofia da zona cortical é a característica predominante em cães com manifestações clínicas (REIS et al., 2009). Tem sido demonstrado que todos os linfonodos nos cães infectados com *L. chagasi* exibem uma linfadenite crônica, com hipertrofia e hiperplasia das zonas cortical e medular (LIMA et al., 2004). No entanto, o *status* clínico ou a carga parasitária tecidual, não pode ser diretamente relacionada à intensidade das lesões, uma vez que animais sem manifestações clínicas apresentam maior parasitismo que aqueles com manifestações clínicas (GIUNCHETTI et al., 2008a), muito embora esta questão mereça maiores investigações.

Cães com Leishmaniose Visceral quase sempre apresentam alterações renais (COSTA et al., 2003; ZATELLI et al., 2003). Apesar da alta prevalência de patologia renal, azotemia, típica de falha renal, é um achado laboratorial incomum, sendo evidente somente quando a maioria dos néfrons tornam-se afuncionais, o que ocorre numa fase mais tardia da doença, quando 2/3 ou 3/4 do tecido renal funcional de ambos os rins, estão comprometidos (GRAUER, 2005; COOK e COWGILL, 1996; LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). Glomerulonefrite e nefrite túbulo intersticial são os achados patológicos mais comuns, enquanto que amiloidose é mais rara

(COSTA et al., 2003; ZATELLI et al., 2003). Glomerulonefrite é frequentemente associada com deposição de imunocomplexos e, quando presente, é principalmente membranoproliferativa ou mesangioproliferativa (PLEVRAKI et al., 2006). Outros tipos de doença glomerular (doença glomerular de alterações mínimas, glomeruloesclerose segmentar focal, glomerulonefrite membranosa e glomerulonefrite crônica) tem sido também descritas (COSTA et al., 2003; ZATELLI et al., 2003; PLEVRAKI et al., 2006), sendo que a glomerulonefrite membranoproliferativa é a mais frequentemente associada com falha renal crônica. Em cães sem evidência clínico-patológica de doença renal, a avaliação histopatológica geralmente revela lesões mesangioproliferativas e glomerulonefrite de alterações mínimas (PLEVRAKI et al., 2006).

A deposição de imunocomplexos nos glomérulos pode ser a causa de glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial, com comprometimento da função renal (LOPEZ et al., 1996). Além disso, a nefropatia pode ser causada, também pelo infiltrado de células T CD4+ detectadas na região glomerular e intersticial dos rins de cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* (COSTA et al., 2000; COSTA et al., 2010). A doença renal pode ser a única manifestação em cães com LV, podendo progredir de leve proteinúria a síndrome nefrótica, até o estágio de falha renal, a principal causa de morte entre os cães com LV (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Por isso, é essencial a avaliação da função renal em cães com LV, sendo o diagnóstico precoce de doença renal benéfico ao cão e pode prolongar a sua vida (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). A evolução clínica de LV em cães naturalmente infectados promove alterações sorológicas, parasitológicas e dos parâmetros bioquímicos, os quais são diretamente correlacionados com o *status* clínico do animal e a investigação destes parâmetros laboratoriais, juntamente com o aspecto clínico, é extremamente importante a ser considerado na rotina clínica (REIS et al., 2006a).

Cães infectados podem desenvolver manifestações clínicas, enquanto que outros permanecem sem manifestações, ou desenvolvem poucas manifestações (até três sinais clínicos), sendo classificados como oligossintomáticos. O quadro clínico da LV em cães inclui linfadenopatia, anemia, diarreia, alopecia, dermatite, onicogrifose, perda de peso, caquexia, problemas de locomoção, conjuntivite e epistaxe (CIARAMELA et al., 1997). Outros autores relataram que sinais clínicos como aumento de tamanho de linfonodos, dermatite na região periorbital e nasal ou em outras regiões do corpo, são observados inicialmente; opacidade de pêlos e edema de membros também podem aparecer juntamente com outros sinais como febre, apatia, hemorragia intestinal, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hiperqueratose, ulceração

cutânea, em particular nas orelhas, e ceratoconjuntivite, embora não necessariamente presentes em todos os animais (GENARO et al., 1988;. DIAS et al., 1999).

Em áreas endêmicas, baseado em estudos com LV natural ou experimental, com utilização de diversas técnicas sorológicas e moleculares, cães apresentam perfis diversos: cães saudáveis não-infectados, não apresentam nenhuma resposta celular e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é negativa; cães infectados, porém, resistentes, apresentam sorologia variável (de negativa a níveis médios); cães com presença de resposta celular e PCR positiva ou não; ou cães com doença clínica: altamente soropositivos, com baixa imunidade celular e PCR positiva (SOLANO-GALEGO et al., 2009).

Tanto os cães naturalmente e experimentalmente infectados, apresentam alterações bioquímicas, como aumento dos níveis séricos de proteínas totais. Tal fato parece estar associado a uma resposta imune humoral policlonal, o que leva a níveis de proteínas aumentados no soro (MARZOCHI et al., 1985). Também é observado hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, com decréscimo da razão albumina/globulina (CARDOSO; CABRAL, 1998; STRAUSS-AYALI; BANETH, 2001).

O diagnóstico clínico de LVC é complexo devido à grande variedade dos sinais clínicos que são inespecíficos e às altas proporções de animais sem manifestações clínicas. É observado que animais com altos níveis de anticorpos e parasitismo nos tecidos são mais efetivos para infectar o vetor (ABRANCHES et al., 1991; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001; COURTENAY et al., 2002). Para diagnosticar a infecção, testes parasitológicos, sorológicos e moleculares são utilizados. Em animais com sinais clínicos e ou anormalidades clínico-patológicas compatíveis com Leishmaniose, o método diagnóstico indicado é a detecção de amastigotas em esfregaços de lesões cutâneas, linfonodos, medula óssea e baço (ALVAR et al., 2004). A demonstração de leishmânias na cultura de células confirma a infecção, mas a sorologia é o diagnóstico padrão em áreas endêmicas, pelo baixo custo e pela considerável sensibilidade (REITHINGER; DAVIS, 1999).

O diagnóstico sorológico de leishmaniose canina é geralmente realizado por Imunofluorescência Indireta (IFI) e Ensaio imunoenzimático (ELISA), associado aos dados clínicos e epidemiológicos (SOLANO-GALEGO et al., 2009). Tanto IFI quanto ELISA são técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soro prevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, sendo que o ELISA é recomendado para a triagem de cães sorologicamente negativos e a IFI para a confirmação dos cães soro-reagentes ao teste ELISA (BRASIL, 2006).

A IFI tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias. No diagnóstico de LV, o cão é considerado soro-reagente quando o título de anticorpos é igual ou superior ao ponto de corte (1:40); já a positividade de ELISA é vista pela leitura da densidade óptica (DO) por meio de espectrofotômetro. Em IFI geralmente é utilizado antígeno de promastigotas de *Leishmania*, o que torna a técnica altamente sensível e específica para detectar LV clínica, mas pode ter baixa sensibilidade para detectar cães infectados clinicamente saudáveis (METTLER et al., 2005). A sensibilidade e especificidade de ELISA depende muito dos antígenos, estes incluem extrato de promastigotas solúveis e proteínas recombinantes purificadas (MIRÓ et al., 2008).

Em Teresina, apesar das medidas empregadas, há alta prevalência e incidência de leishmaniose visceral (DRUMMOND; COSTA, 2011), tal fato reforça a necessidade de novas avaliações e medidas de controle. Novos estudos são necessários para avaliar o programa de controle da LV e determinar que fatores possam estar contribuindo para os altos índices da doença, inclusive determinar a importância epidemiológica do cão para a manutenção da enfermidade em áreas endêmicas, especialmente em Teresina.

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: uma introdução geral com revisão de literatura e objetivos, capítulo I contendo o artigo, intitulado “**Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães recém-infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi***” a ser encaminhado para publicação na Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science estruturados de acordo com as normas técnicas da revista.

2 CAPÍTULO I

Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães recém-infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Serum-conversion and evaluation of renal alterations in dogs newly infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Georgia Brenda Barros ALVES¹, Lucilene dos Santos SILVA¹, Joilson Ferreira BATISTA², Ivete Lopes de MENDONÇA², Francisco Assis Lima COSTA¹

1 – Setor de Patologia Animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI

2 – Laboratório de Sanidade Animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI

Correspondência para:

FRANCISCO ASSIS LIMA COSTA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Campus Agrícola da Socopo
Universidade Federal do Piauí

Bairro Ininga, s/n

64049-550 – Teresina – Piauí

fassisle@gmail.com

Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*.² Na América Latina, *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a principal espécie causadora da doença^{7,27,28}, também denominada por alguns autores como *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.^{51,52} No Novo Mundo, o flebotômio *Lutzomyia longipalpis* é a espécie mais importante na transmissão da enfermidade.^{10,34} Porém, *Lutzomyia cruzi* também tem participação na cadeia de transmissão no Brasil, particularmente no estado de Mato Grosso do Sul⁵⁰ e Mato Grosso.³⁸

No Brasil, a doença está presente principalmente na Região Nordeste. Em Teresina, no ano de 2009, foram registrados 72 casos de LV humana⁴⁴ e 3.332 casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC).⁵⁷

Cães infectados podem apresentar marcada resposta imune humoral, caracterizada por altos níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* que não conferem proteção ao animal.²³ É estimado que o tempo entre a infecção e a soro-conversão varia de 3 meses a 7 anos.⁵

Possíveis marcadores de leishmaniose visceral canina (LVC) estão sendo amplamente investigados, sendo a sorologia um dos mais utilizados para esta finalidade.^{20,48,4} Pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), cães com mais de 3 sinais clínicos mostram títulos de anticorpos mais elevados comparado com aqueles sem manifestações clínicas, e a severidade da doença é correlacionada com maiores títulos de IgG total.²² Altos títulos de anticorpos estão associados ao parasitismo ativo e à presença de sinais clínicos,²⁰ com alta chance de detecção do protozoário pelos exames parasitológicos.^{45,21,47} Dessa forma, tem sido sugerido que sorologia pode ser usada como um marcador de susceptibilidade ou resistência em LVC.²⁰

Na LV órgãos do sistema fagocítico mononuclear são afetados com maior intensidade, mas outros órgãos como os rins, também são acometidos.¹⁷ Cães com LV quase sempre apresentam alterações renais,^{14,62} mas, apesar da alta prevalência de patologia renal, azotemia, típica de falha renal, é um achado laboratorial incomum, sendo evidente somente quando 2/3 ou 3/4 do tecido renal funcional de ambos os rins, estão comprometidos.³⁰ Glomerulonefrite e nefrite túbulo intersticial são os achados patológicos mais comuns.^{14,62} Glomerulonefrite é frequentemente associada com deposição de imunocomplexos,⁴⁶ mas outros mecanismos, envolvendo células T, também, são considerados.^{15,16}

Em Leishmaniose Visceral Canina, a doença renal pode progredir de leve proteinúria a síndrome nefrótica, até o estágio de falha renal, a principal causa de morte entre os cães com LV,⁵⁵ e por isso é essencial a avaliação da função renal, pois diagnóstico precoce de doença renal é benéfico ao animal e pode prolongar a sua

vida.⁵⁵ Portanto, a evolução clínica da LV em cães naturalmente infectados promove alterações sorológicas, parasitológicas e dos parâmetros bioquímicos, os quais são diretamente correlacionadas com o *status* clínico do animal. A investigação destes parâmetros laboratoriais, juntamente com o aspecto clínico, é extremamente importante a ser considerado na rotina clínica.⁴⁸

Desse modo, o presente estudo objetiva conhecer a distribuição de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* em zonas urbanas de Teresina; o período de tempo em que um cão se torna positivo para leishmaniose visceral na área endêmica de Teresina e o comprometimento estrutural e funcional dos rins no período recente após a infecção

Material e Métodos

Oitenta e oito cães com idades variando entre 8 meses a 9 anos, machos e fêmeas de raças indefinidas, oriundos do Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), de uma população estimada em 5.799 cães atendidos no ano de 2010, foram utilizados neste estudo. Foi firmado com os proprietários dos cães, um termo de compromisso com a finalidade de garantir sua participação até o final do estudo (em anexo). Os animais foram avaliados clinicamente e submetidos à coleta de sangue, punção de medula óssea e linfonodo poplíteo, para diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC). Animais com sorologia e parasitológico negativos constituíram o grupo de estudo.

Os soros dos cães foram armazenados em *ependorfs* de 1000 µl; congelados a -20 °C e destinados a sorologia pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), nas diluições de 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320. A IFI foi realizada no Laboratório de Sanidade Animal (LASAN-UFPI), com o Kit IFI Fiocruz Biomanguinhos, enquanto que o exame parasitológico foi realizado no Setor de Patologia Animal (UFPI), em esfregaços de aspirado de linfonodo poplíteo e medula óssea, corados com Giemsa e examinados em microscópio de luz convencional. Após a confirmação do diagnóstico sorológico e parasitológico negativos, o monitoramento dos cães foi realizado em domicílio por um período máximo de 1 ano, onde a cada 3 meses, foram visitados para coleta de material (**Fig. 1** e **Fig. 2**) e avaliação clínica, levando em consideração sinais como linfadenopatia, alterações de pele, onicogribose, apatia, palidez de mucosas, edema, conjuntivite, e emagrecimento (ficha clínica anexa). Este procedimento foi repetido até o momento da soro-conversão, quando os cães foram separados em 3 grupos: cães sem sinais clínicos de LV; cães com até três sinais, e cães com mais de três sinais clínicos.

Para o exame bioquímico, amostras de soros foram submetidas à dosagem de uréia (Kit Labtest nº 104-4), creatinina (kit Labtest nº 35), proteínas totais (Kit Labtest nº 99) e albumina (Kit Labtest nº 19 através), por meio do método semi-automatizado SB 190.

Foram monitorados 40 cães negativos para LVC, distribuídos em diversos bairros da cidade de Teresina-PI, inclusive em Bairros de moderada transmissão (Santo Antônio, Angelin, Satélite).⁵⁸ No total, 27 bairros da cidade de Teresina foram visitados para a coleta de material, distribuídos em 5 zonas urbanas: Centro, Norte, Leste, Sul e Sudeste.⁵⁹

Teresina está a 72 metros acima do nível do mar, numa latitude 05 ° 05' Sul e longitude 42 ° 48' oeste. O clima é tropical, com temperatura média de 27 ° C e precipitação total anual de 1300 mm. A vegetação predominante é constituída por gramíneas, arbustos esparsos, mangueiras e palmeiras.⁶¹ A variação de temperatura é pequena quando são comparados meses mais frios e mais quentes, às vezes ultrapassando 40 °C. A menor temperatura é raramente inferior a 20 °C. A chuva tem uma influência considerável na temperatura da cidade, os meses mais frios (dezembro-abril) são também os mais chuvosos. Em abril chove durante quase todo o mês cerca de 287 milímetros. Os meses mais secos (junho-setembro) têm as mais altas temperaturas, sendo que agosto é o mês mais seco, com uma precipitação muito baixa (cerca de 13 mm).⁴⁴

Cães com sorologia ou parasitológico positivo foram recolhidos mediante assinatura de termo de autorização (em anexo) pelos proprietários, os quais foram informados sobre todos os procedimentos a serem realizados no animal. Após a liberação, os cães foram levados ao setor de Patologia Animal da UFPI, onde foram anestesiados com Tiopental sódico 25 mg/kg i.v.^{36,19} eutanasiados e submetidos à necropsia para a coleta de fragmentos de rim da região cortical e medular. Os fragmentos foram conservados em formol tamponado com fosfato 0,01M pH 7,4 (formol tamponado) e posteriormente foram processados e corados com H-E, PAS e Massom.³¹

Na avaliação histopatológica ao microscópio de luz, foram analisadas as alterações utilizando-se as diferentes colorações histoquímicas. As alterações renais foram classificadas de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde para a classificação dos padrões morfológicos de glomerulonefrites.¹¹ A localização, distribuição e intensidade das lesões foram classificadas semi-quantitativamente, em tecido renal com espessura de 3 a 4 µm, numa escala de 0 a 5, onde 0 = normal, 1 = mínima ou duvidosa; 2 = média; 3 = moderada; 4 = moderadamente severa e 5 = severa.⁶⁰ Os dados obtidos foram tabulados e representados em gráficos e analisados por meio de estatística não-paramétrica (Teste U de Mann-Whitney).

Resultados e Discussão

De uma população de 88 cães atendidas no HVU, 57 (64,7%) cães negativos para LVC, de ambos os sexos, idades variadas e raças indefinidas, constituiu o grupo apto a ser incluído no estudo de soro-conversão. Deste total, apenas 40 cães (70,1%) foram acompanhados em domicílio a cada 3 meses, devido a ocorrência de óbito de alguns animais; viagens longas dos proprietários que impossibilitaram a coleta de material em domicílio; mudança dos proprietários para outras cidades e, mesmo, desistência dos proprietários em continuar no trabalho. Este fato constituiu-se numa dificuldade no acompanhamento de todos os animais e parece ser um entrave neste tipo de trabalho, tendo sido vivenciado, também, em outros estudos.⁵³

Entre os 40 cães negativos para LVC acompanhados, 25 (62,5%) apresentaram teste sorológico positivo no período de um ano, mas apenas 1 animal apresentou exame parasitológico positivo, possivelmente, devido serem animais recentemente infectados.³² Um estudo semelhante baseado, também, na soro-conversão pela IFI, na área endêmica do Rio de Janeiro, apresentou resultado semelhante; de 60 cães acompanhados, apenas 50% se tornaram soropositivos no período de 1 ano.⁵³ De um modo em geral, os estudos sobre o momento em que um cão se torna positivo para LV se baseiam apenas no teste sorológico pela IFI, pois a medida de controle da LVC é baseada, também, apenas por meio deste teste. Dos 25 cães que apresentaram soro-conversão, 15 (60%) se tornaram soro-positivos dentro do período de três meses (*2ª coleta*); cinco (20%) tornaram-se soro-positivos dentro de seis meses (*3ª coleta*); e cinco (20%) se tornaram soro-positivos num intervalo de nove meses (*4ª coleta*). Tais resultados demonstraram que a maioria dos cães na área endêmica de Teresina tornam-se infectados dentro de um curto período de tempo. Resultados semelhantes foram encontrados num estudo com 23 cães, de uma área endêmica para Leishmaniose Visceral na Itália, no qual 19 cães foram PCR ou IFI positivos com 8 meses e 4 foram positivos 12 meses após a infecção.⁴³ Os resultados sobre a soro-conversão deste estudo constituem um parâmetro epidemiológico singular para a área endêmica de Teresina, podendo contribuir para o aprimoramento do serviço de controle da LVC pela orientação da frequência de coletas para análise, identificação mais rápida de animais positivos e, conseqüentemente, a retirada desses animais da área foco de transmissão. Apesar de existirem alguns trabalhos semelhantes em outras regiões,^{1,6,35,40,41,42,53} os resultados encontrados em uma área endêmica ou região, apresentam peculiaridades próprias, pois cada área tem suas características específicas, relacionadas à população canina, condições sócio-econômicas da população humana, condições sanitárias, de saneamento básico e densidade de população de vetores diferentes.

Em 12 meses de acompanhamento dos cães que se tornaram soro-positivos, 11 (44%) desenvolveram mais que três sinais clínicos; 7 (28%) apresentaram até três sinais clínicos, e 7 (28%) não desenvolveram sinais clínicos. Estudo com 12 cães infectados experimentalmente com *Leishmania infantum*, acompanhados por um período de 6 meses, mostrou que todos os cães se tornaram soro-positivos 4 meses após a infecção, apresentando sinais clínicos como linfadenomegalia e lesões de pele, mas 4 cães não mostraram sinais clínicos, tendo sido constatado que a maioria dos animais desenvolveram sintomatologia clínica de LV em um curto período pós-infecção,³³ o que guardou similaridade com o presente estudo, pois dos 25 cães, 15 (60%) se tornaram positivos para LVC dentro de 3 meses após o início do acompanhamento.

Cabe ressaltar, também, que o percentual de animais que se tornaram positivos para LV, sem manifestações clínicas, foi menor (28%) do que o de animais com manifestações clínicas (72%), o que está de acordo com resultados de outro estudo realizado em Teresina, em que o percentual de animais infectados sem manifestação clínica foi de 10%, menor, também, do que o percentual de cães com manifestações clínicas,²⁹ mas diferiu de estudos realizados em outras áreas endêmicas, onde alta prevalência de animais infectados sem manifestações clínicas (60 a 80%) foram observadas.^{8,9,42,56} Essa diferença provavelmente seja devido às condições higiênico-sanitárias, ambientais e sócio-econômicas dos proprietários onde vivem essas populações de animais. Na Europa, onde existe um maior percentual de cães infectados sem manifestações clínicas, as condições de alimentação, exposição a diversas enfermidades e o perfil imunológico dos animais é bem diferente dos que vivem no Brasil e, particularmente em Teresina. Em nosso estudo, sinais clínicos como linfadenopatia e lesões de pele foram os mais frequentes (**Fig. 3 e Fig. 4**), semelhante a outro estudo, também, realizado em Teresina.⁵⁴

Apesar de ainda não estar bem definido o papel de cães sem manifestações clínicas na transmissão da LV, cães com manifestações clínicas são, seguramente, fontes de infecção para o vetor e de transmissão da LV para o homem e outros animais.^{37,39} Em nosso estudo, dos 18 cães com manifestações clínicas de LV (11 com mais de três manifestações clínicas e sete com até três manifestações), 10 tornaram-se positivos num intervalo de três meses (sete com mais de três sinais clínicos e 3 com até três sinais clínicos); e no grupo dos cães sem manifestações clínicas, cinco tornaram-se positivos, também, num intervalo de três meses. Assim, nossos resultados sugerem que, mesmo com pouco tempo de infecção e considerando, que a presença de manifestações clínicas está mais relacionada com a transmissão de LV, como tem sido demonstrado em vários estudos,^{37,49,54} cães em Teresina tornam-se infectados num curto espaço de tempo o que pode contribuir fortemente para a

intensificação do ciclo infeccioso da doença. Este fato necessita de maiores investigações, contudo os resultados deste trabalho contribuem para o entendimento da alta incidência de LVC em Teresina.

O maior número de cães que se tornaram positivos para LV no período de estudo, foram aqueles de bairros localizados nas zonas urbanas Norte (24%) e Sul (24%), seguido por bairros do Centro da cidade (20%) e da zona Leste (16%) e Sudeste (16%) (**Fig. 5**). Atualmente, medidas de controle mais intensas (controle de vetores através da borrifação com inseticidas) tem sido empregadas em seis bairros da zona urbana Teresina, dois localizados na zona urbana Norte (bairros Santa Maria da Codipi e Pedra Mole), três na zona urbana Sul (bairros Santo Antônio, Angelim e Esplanada) e um na zona Sudeste (bairro Satélite). Nesses bairros há notificação de uma média de três a cinco casos/ano de leishmaniose visceral humana,⁵⁸ confirmando a sua alta transmissibilidade. Os fatores relacionados à alta incidência da doença nessas zonas urbanas foram relacionados com o deficiente sistema de saneamento básico, cabendo destacar que dos 169.771 domicílios de Teresina, apenas 22.108 (13,06%) apresentam rede geral de esgoto ou pluvial.⁴⁴ Nessas áreas são registrados também, altos níveis de pobreza, traduzidos por baixo poder aquisitivo, moradias em casebres, ruas sem pavimentação, sistema de lagoas fluviais, como observado na região Norte, envoltas por favelas, com pouquíssima infraestrutura, contribuindo para a alta transmissibilidade de LV registrada.⁵⁸

Áreas com condições sócio-econômicas precárias como existentes em Teresina, foram associadas tanto com a abundância do vetor,¹³ quanto com a incidência de LV humana e canina.⁶¹ Foi observado, que pessoas que viviam em casas com inadequado sistema de esgotos e sem coleta regular de lixo, apresentaram risco significativamente elevado (risco de quatro e seis vezes, respectivamente) de desenvolverem leishmaniose visceral.¹³ Além disso, essas áreas apresentaram um efeito amplificador entre a infecção canina e a incidência de LV humana.⁶¹

Para avaliar os principais indicadores de comprometimento da saúde destes animais que contribuem para a progressão da doença, foram realizados exame sorológico, análises fisiopatológicas, prova de função renal e exame histopatológico de tecido renal. De um modo em geral, é observado que os animais que tornam-se positivos para LV e são mais susceptíveis para a doença, apresentam altos títulos de anticorpos IgG anti-*Leishmania*.²³ Em nosso estudo, a maioria apresentou títulos entre 1:40 e 1:80, independente da condição clínica (infectados com e sem manifestações da doença). Sobre a resposta de anticorpos anti-*Leishmania*, há citações da existência de dois perfis sorológicos para cães: um perfil em que os animais apresentam baixos títulos de anticorpos e permanecem assim por longo tempo; e outro perfil, onde os cães iniciam com baixos títulos de anticorpos, tendendo a aumentarem com o tempo de infecção.⁵³ Nosso estudo aponta nessa direção, pois a

maioria dos cães apresentou títulos baixos quando se tornaram positivos para LV. O fato da maioria dos cães não terem apresentado exame parasitológico positivo, pode ser justificado pelos baixos níveis de anticorpos observados, pois a positividade do teste parasitológico está diretamente relacionado com o aumento dos títulos sorológicos de anticorpos.^{32,45,47} Essa questão ainda carece de maior aprofundamento, pois é observado que cães sem manifestações clínicas, também, apresentaram altos títulos de anticorpos, mas nenhum apresentou positividade parasitológica na cultura com aspirado de linfonodo poplíteo.⁵³

Os resultados das dosagens bioquímicas de animais infectados e controles, assim como os valores padrões estão apresentados na **Tabela 1**. Dos 25 cães soro-positivos, 88% apresentaram hiperproteinemia, devido a hiperglobulinemia, observada em 84% (21/25) dos cães e hipoalbuminemia foi observada em 20% (5/25) dos cães infectados. Dos 11 cães controles, oito, também, apresentaram hiperproteinemia, devido à hiperglobulinemia em cinco cães, contudo, em níveis mais baixos do que nos animais infectados. Em apenas um animal controle foi observado hipoalbuminemia. De um modo em geral, observou-se níveis mais elevados de proteínas totais e globulinas, e níveis mais baixos de albumina, nos animais infectados, quando comparados aos animais controles (**Fig. 6**). A hiperproteinemia nos animais controles pode ser devido a outros fatores como desidratação ou diarreia, comuns em animais de rua.³⁰ Estes resultados mostram, que mesmo cães recém-infectados, já apresentam alterações dos níveis de proteínas, confirmando a importância da hiperproteinemia e, especialmente, da hiperglobulinemia como um marcador a ser considerado no diagnóstico da LVC, como tem sido observado por outros autores.^{18,22,48}

Os cães com sinais clínicos apresentaram níveis mais elevados de proteínas totais (16/18, 88,8%), representados principalmente por hiperglobulinemia, e níveis de albumina (15/18, 83,3%) mais baixos que os controles. Dos cães sem sinais clínicos, 57,1% (4/7) apresentaram níveis de proteínas totais, representada, principalmente, por hiperglobulinemia, mais elevados, e níveis de albumina (5/7, 71,4%), mais baixos do que os cães controles. Estudos mostraram que os sinais clínicos foram significativamente relacionados com o título de anticorpos e alterações nas proteínas séricas. Cães sem manifestações clínicas apresentaram menores títulos de anticorpos, menores níveis de proteínas totais, menores valores de globulina e maior razão albumina-globulina.³ De um modo em geral, os nossos resultados são coincidentes com os estudos realizados, exceto no que diz respeito aos títulos de anticorpos, em que não foi observado predominância de valores maiores ou menores entre cães com e sem manifestações clínicas de LV, muito embora os animais se apresentavam em uma fase de infecção recente.

A prova de função renal não revelou diferença estatística significativa entre cães infectados com e sem manifestações clínicas em relação aos controles. Contudo, dos 25 cães positivos, dois (8%) apresentaram níveis de uréia e creatinina acima dos valores normais. De um modo em geral, animais infectados apresentaram níveis de uréia e creatinina mais elevados em relação aos cães negativos (**Fig. 7**). Em termos médios, 13 cães (52%) apresentaram níveis de uréia e 14 (56%) mostraram níveis de creatinina maiores que os observados nos cães negativos, muito embora estivessem dentro da variação normal. Animais com manifestações clínicas apresentaram níveis de uréia (7/18, 38,8%) e creatinina (12/18, 66,6%) aumentados em relação aos controles. Entre os cães sem manifestações clínicas, seis (85,7%) tiveram níveis de uréia maiores e 2 (28,6%) apresentaram níveis de creatinina maiores do que os controles negativos. Estes resultados refletem fortemente uma tendência de cães com LV apresentarem alterações na função renal, já a partir da infecção recente, sendo esta considerada uma importante causa de óbito nos animais com a progressão da doença.⁵⁵ Estudos realizados em cães com infecção crônica da área endêmica de São José de Ribamar-MA, revelaram taxas elevadas de uréia, mas não houve alterações nos valores de creatinina.¹⁸ Os níveis mais elevados de uréia em um maior número de animais, pode ser decorrente de uma patologia hepática,³⁰ o que não podemos descartar nos animais deste estudo. Amusategui et al.³ afirmaram que, num estágio avançado de LVC, os valores médios de uréia e creatinina são altos, ao passo que os animais na fase inicial apresentaram menores níveis de anticorpos e os valores de uréia e creatinina não diferiram dos encontrados nos animais controles, o que se assemelha aos resultados do presente trabalho. A avaliação de parâmetros bioquímicos no soro de cães com LV deve ser levado em consideração para o diagnóstico e avaliação da progressão da infecção como tem sido sugerido.^{18,26}

Seis animais soro-positivos, recém-infectados foram eutanasiados para a realização de exame histopatológico com a finalidade de avaliar as lesões renais. Todos os cães apresentavam dois ou mais sinais clínicos de leishmaniose visceral, tais como emagrecimento, queratinização no focinho, conjuntivite, lesões de pele, seborréia, linfonodos aumentados, onicogribose e alopecia. O baixo número de animais eutanasiados foi justificado por algumas dificuldades, também, relatadas por Silva et al.⁵³, que, como nós, constataram que a eliminação de animais aparentemente saudáveis é difícil, uma vez que os proprietários frequentemente os escondem, prevenindo que sejam testados e examinados, evitando seu recolhimento. Além disso, observamos que muitos proprietários de animais doentes, preferiam alguma forma de tratamento ao invés de aceitar a eutanásia dos seus cães.

Pela coloração de H-E observou-se infiltrado inflamatório perivascular mononuclear na região córtico-medular e na cortical, de localização perivascular e peritubular de intensidade mínima a média (**Fig. 8A**).

Cilindros hialinos foram observados em dois cães que apresentaram níveis normais de uréia e creatinina (**Fig. 8B**), demonstrando, que proteinúria pode ocorrer mesmo sem alterações funcionais dos rins como é o caso de glomerulonefrite de alterações mínimas e glomerulosclerose segmentar focal diagnosticadas neste estudo. Pela coloração de PAS, observou-se atrofia de túbulos de média intensidade, com distribuição focal, em um cão. Expansão do mesângio de intensidade média foi observada pela coloração do Tricrômico de Massom em um cão (**Fig. 8C**). Glomerulonefrites estavam presentes nos seis cães em que foram analisados fragmentos de rim, caracterizadas como glomerulonefrite de alterações mínimas em dois cães, glomerulonefrite mesangioproliferativa em um cão, glomérulo-esclerose segmentar focal em um cão e glomerulonefrite membranoproliferativa (**Fig. 8D**) em dois cães. Estes padrões de lesões glomerulares estão descritos em Costa et al.¹⁴. As lesões glomerulares observadas foram focais e de intensidade média. Estes resultados revelam que as lesões glomerulares estão presentes na fase recente de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, muito embora não possamos descartar completamente a possibilidade dos animais estarem acometidos por outras infecções, mesmo se tratando de animais domiciliados. Estes animais não apresentavam alterações nos níveis de uréia e creatinina, mas apresentavam hiperproteinemia, devido à hiperglobulinemia. Em conjunto, as alterações renais túbulo intersticiais e glomerulares foram de baixa intensidade, ainda não suficientes para provocar alterações da função renal, o que está de acordo com resultados de outras pesquisas realizadas, que enfatizam que muito embora os rins apresentem alterações morfológicas, alterações funcionais somente são observadas quando 2/3 ou 3/4 partes do tecido de ambos os rins são comprometidos.^{12, 24, 30}

Baseado nos resultados deste estudo, constatamos que em Teresina a soro-conversão para leishmaniose visceral canina ocorre em pouco tempo (dentro de 3 meses) de exposição. A maioria dos cães recém-infectados apresentam sinais clínicos de LV, mas não apresentam altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*. Cães recém-infectados já podem participar da cadeia epidemiológica da Leishmaniose Visceral em Teresina, contribuindo para a manutenção da endemia. Apesar de recém-infectados, cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* apresentam alterações nas proteínas séricas, alterações na função e estruturas renais. Os resultados indicam que os levantamentos soro-epidemiológicos da LVC em Teresina, devem ser feitos dentro de um menor espaço de tempo que o atualmente adotado (anual).

Agradecimentos

À FAPEPI (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí) pelo fornecimento de bolsa de Mestrado.

Referências

1. ALMEIDA, A.B.P.F.; FARIA, R.P.; PIMENTEL, M.F.A.; DAHROUG, M. A.A.; TURBINA, N.C.M.R.; SOUSA, V.R.F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42(2), p.156-59, 2009.
2. ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 552–557, 2006.
3. AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M.A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v.18, p.147-156, 2003.
4. ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER, J.R.; BADARÓ, R.; DAVID, J.R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The american society of medicine and Hygiene**, v. 53, p. 251-255, 1995.
5. BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**, 3. ed. St. Louis: Saunders-elsevier, 2006. p. 685-698.
6. BARBOZA, D.C.P.M.; GOMES NETO, C.M.B.; LEAL, D.C.; BITTENCOURT, D. V.V.; CARNEIRO, A.J.B.; SOUZA, B.M.P.S.; OLIVEIRA, L.S.; JULIÃO, F.S.; SOUZA, V.M.M.; FRANKE, C.R. Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n2, p.152-163, 2006.
7. BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic development in the last years. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 24, p. 684-703, 1997.
8. BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; [BERENGER, A.](#); [ESCOFFIER, K.](#); [LAMOUROUX, D.](#); [DUNAN, S.](#) Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 273-77, 1996.
9. CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S.; [SOUSA, J.C.](#); [THOMPSON, H.](#); [ALEXANDER, J.](#) The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v.76, p.173-80, 1998.
10. CARRERA, M. **Insetos de Interesse Médico e Veterinário**. Curitiba: Editora Universidade Federal do Paraná, 1991, 228p.
11. CHURG, J.; BERNSTEIN, J.; GLASSOCK, R. J. **Renal disease: classification and atlas of glomerular disease**. 2. ed. New York: Igaku-Shoin, 1985, 541 p.
12. COOK, A.K.; COWGILL, L.D. Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a review of 137 cases (1985-1992). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.32, p.313-322, 1996.
13. COSTA, C.H.N.; WERNECK, G.L.; RODRIGUES JR, L.; SANTOS, M.V.; ARAÚJO, I.B.; MOURA, L.S.; [MOREIRA, S.](#); [GOMES, R.B.](#); [LIMA, S.S.](#) Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, p. 229-36, 2005.
14. COSTA, F.A.L.; GOTO, H.; SALDANHA, L.C.B.; SILVA, S.M.M.S.; SINHORINI, I.L.; SILVA, T.C.; GUERRA, J.L. Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v.40, p.677, 2003.

15. COSTA, F.A.L.; GUERRA, J.L.; SILVA, S.M.M.S.; KLEIN, R.P.; MENDONÇA, I.L.; GOTO, H. CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1455-1458, 2000.
16. COSTA, F.A.L.; PRIANTI, M.G.; SILVA, T.C.; SILVA, S.M.M.S.; GUERRA, J.L.; GOTO, H. T cells adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 112, 2010.
17. COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO JR, M.M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.
18. DIAS, E.L.; BATISTA, Z.S.; GUERRA, R.M.S.N.C.; CALABRESE, K.S.; LIMA, T.B.; SILVA, A.L.A. 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, p.740-745, 2008.
19. DIAS, M.I.R. Anestesia com indução pelo tiopental de sódio e manutenção pelo halotano no cão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.95, p.71-80, 2000.
20. DOS-SANTOS, W.L.C.; JESUS, E.E.; PARANHOS-SILVA, M.; PEREIRA, A.M.; SANTOS, J.C.; BALEIRO, C.O.; NASCIMENTO, E.G.; MOREIRA, E.D.; OLIVEIRA, G.G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 251–259, 2008.
21. DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, v. 110, p. 647–656, 1993.
22. [GIUNCHETTI, R.C.](#); [MAYRINK, W.](#); [CARNEIRO, C.M.](#); [CORRÊA-OLIVEIRA, R.](#); [MARTINS-FILHO, O.A.](#); [MARQUES, M.J.](#); [TAFURI, W.L.](#); [REIS, A.B.](#) Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 84(2), p.269-77, 2008.
23. GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. **Proceedings...**Sevilha, 2002. p. 7-15.
24. GRAUER, G.F. Glomerulonephritis. **Seminars in Veterinary medicine and Surgery**, v.7, p.187-197, 1992.
25. KANEKO, J.J.; HARVEY, D.W.; BRUSS, W.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.
26. KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.35, p.376–383, 1999.
27. LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 94-106, 1992.
28. LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; LILLICK-KENDRICK, R. (Ed). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987, 120p.
29. LOPES, M.C.T.; DRUMOND, K.O.; LIMA, F.L.; ROCHA, F.S.B.; ALVES, V.C., COSTA, F.A.L. Prevalência de cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos para leishmaniose visceral na

- cidade de Teresina (PI). In.: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19., Teresina, 2010. **Anais**. Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2010.
30. LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P. **Manual de patologia clínica veterinária**. 3. ed. Santa Maria: UFSM - Universidade Federal de Santa Maria, 2007.
 31. LUNA, G.L. **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968. 285 p.
 32. [MADEIRA, M.F.](#); [FIGUEIREDO, F.B.](#); [PINTO, A.G.](#); [NASCIMENTO, L.D.](#); [FURTADO, M.](#); [MOUTA-CONFORT, E.](#); [DE PAULA, C.C.](#); [BOGIO, A.](#); [GOMES, M.C.](#); [BESSA, A.M.](#); [PASSOS, S.R.](#) Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**, v. 87(2), p. 260-2, 2009.
 33. MAIA, C.; NUNESA, M.; CRISTÓVÃO, J.; CAMPINO, L. Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. **Acta Tropica**, v.116, p.193–99, 2010.
 34. MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001, 589p.
 35. MATOS, M.M.; FILGUEIRA, K. D.; AMORA, S. S. A.; SUASSUNA, A. C. D.; AHID, S. M. M.; ALVES, N.D. Ocorrência da leishmaniose visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v.16(1), p.51-54, 2006.
 36. MELBY Jr, E.C.; ALTMAN, N.H. **Handbook of laboratory animal science** - Vol. 3. Miami: CRC Press, 1976. 943p.
 37. MICHALSKY, E.M.; ROCHA, M.F.; LIMA, A.C.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; PIRES, M.Q.; OLIVEIRA, F.S.; PACHECO, R.S.; DOS SANTOS, S.L.; BARATA, R.A.; ROMANHA, A.J.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology** , v. 147, p.67–76, 2007.
 38. MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M.. Distribuição Espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 337-340, 2006.
 39. MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p.491–93, 1994.
 40. MOSHFEA, A.; MOHEBALIA, M.; EDRISSIANA, G.; ZAREI, Z.; AKHOUNDIA, B.; KAZEMID, B.; JAMSHIDIE, S.; MAHMOODIF, M. Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. **Acta Tropica**, v.112, p.101–05, 2009.
 41. OLIVEIRA, L.C.P.; ARAÚJO, R.R.; ALVES, C.R.; MOUTA-CONFORT, E.; LÓPEZ, J.A.; MENDONÇA-LIMA, F.W. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43(4), p.400-04, 2010.
 42. OTRANTO, D.; PARADIES, P.; CAPRARIIS DE, D.; STANNECK, D.; TESTINI, G.; GRIMM, F.; DEPLAZES, P.; CAPELLI, G. Toward Diagnosing *Leishmania infantum* Infection in Asymptomatic Dogs in an Area Where Leishmaniasis Is Endemic. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.3, p.337–43, 2009.
 43. PARADIES, P.; SASANELLI, M.; DE CAPRARIIS, D.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; LIA, R.P.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Journal**, v.186, p.370–73, 2010.

44. PIAUÍ. Secretaria Estadual da Saúde do Piauí. Coordenação de Vigilância em Saúde Ambiental. **Programa de Controle das Leishmanioses. Série histórica de 1998 a 2008.** Teresina, PI, 2009.
45. PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, p.229–35, 1994.
46. PLEVRAKI, K.; KOUTINAS, A.F.; KALDRYMIDOU, H.; ROUMPIES, N.; PAPAZOGLU, L.G.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; SAVVAS, I.; LEONRIDES, L. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 228–233, 2006.
47. QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.M.; KAYE, P.M.; SHAW, M.A., DYE, C.; DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, p.161–68, 2003.
48. REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p.68–75 2006.
49. REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.87–95, 2009.
50. SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.U.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315-317, 1998.
51. SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 577-579, 2006.
52. SHAW, J. J. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: FARRELL, J. **World Class Parasites: Leishmania**. Boston: Kluwer Academic Publishers, p. 11-31, 2002.
53. SILVA, A.V.; MACHADO, A.A.P.; PEREIRA, D.P.; BRAZIL, R.P.; CARREIRA, J.C.A. Canine Leishmaniasis in Brazil: serological follow-up of a dog population in an endemic area of American Visceral Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v.2009, p.1-6, 2009.
54. SOARES, M.R.A.; MENDONÇA, I.L.; BONFIM, J.M.; RODRIGUES, J.A.; WERNECK, G.L.; COSTA, C.H.N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica jornal**, v.117, p. 6–9, 2011.
55. SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1–18, 2009.
56. SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; [ALBEROLA, J.](#); [FERRER, L.](#) Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.560-63, 2001.
57. TERESINA. **Gerência de Zoonoses de Teresina**. Teresina, PI, 2009.
58. TERESINA. **Gerência de Zoonoses de Teresina**. Teresina, PI, 2010.

59. TERESINA. Secretaria do Planejamento. **Bairros**. Teresina, PI, 2010. Disponível em: <<http://www.teresina.pi.gov.br:8080/semplan/thebairros.asp>>. Acesso em: 20 dez 2010.
60. TISHER, C.C.; BRENNER, B.M. **Renal pathology with clinical and functional correlations**. 2. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1994. 978 p.
61. WERNECK, G.L.; COSTA, C.H.N.; WALKER, A.M.; DAVID, J.R.; WAND, M.; MAGUIRE, J.H. Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v.135, p.195-201, 2007.
62. ZATELLI, A. et al. Glomerular lesions in dogs infected with Leishmania organisms. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 558-561, 2003.

Resumo

Leishmaniose Visceral (LV) é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e o cão doméstico é o principal reservatório da doença. O presente estudo objetivou conhecer o período de tempo em que um cão se torna positivo para LV na área endêmica de Teresina e o comprometimento estrutural e funcional dos rins no período recente após a infecção. Cães negativos para LV canina foram analisados clinicamente a cada 3 meses, submetidos a sorologia, exame parasitológico, e dosagens bioquímicas até o momento da soro-conversão. Fragmentos de rim de cães soro-positivos foram processados e corados com H-E, PAS e Massom. e as lesões foram classificadas com base numa escala variando de normal a severa. Dos 40 cães acompanhados, 64,7% tornaram-se positivos em 1 ano de acompanhamento. Dos 25 cães positivos, 60% tornaram-se positivos nos primeiros 3 meses. A maioria dos cães positivos apresentaram títulos entre 1:40 e 1:80, e 72% apresentaram manifestações clínicas. De um modo em geral, observou-se níveis mais elevados de proteínas totais e globulinas, e níveis mais baixos de albumina nos animais infectados, comparados aos controles. Além disso, apresentaram níveis de uréia e creatinina mais elevados em relação aos cães negativos. Glomerulonefrites com intensidade média estavam presentes nos cães do estudo. Baseado nestes achados sugere-se que em Teresina a soro-conversão para Leishmaniose Visceral Canina ocorre com pouco tempo após a infecção, e apesar de recém-infectados, cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* apresentam alterações nas proteínas séricas, nas provas de função renal e alterações estruturais nos rins.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral. Soro-conversão. Cães. Rim.

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and the domestic dog is the main reservoir of the disease. This study investigated the period in which the dog becomes positive for VL in the

endemic area of Teresina and functional and structural alterations of the kidneys in the recent period post-infection. Dogs negative for canine VL were available clinically every three months for serological and biochemical tests, until the seroconversion. Fragments of kidney from positive dog were processed and stained with HE, PAS and Masson, and lesions were classified based on a scale ranging from normal to severe. From 40 dogs studied, 64.7% became positive within 1 year of follow-up. From 25 positive dogs, 60% became positive in the first three months. Most dogs had positive titers between 1:40 and 1:80, and 72% showed clinical signals. In a general way, we found higher levels of total protein and globulin, and lower levels of albumin in the infected animals when compared to controls. Additionally, showed levels of urea and creatinine higher than negative dogs. Glomerulonephritis with medium intensity were present in dogs in the study. These data suggest that in Teresina seroconversion for Canine Visceral Leishmaniasis occurs soon after infection, and although recently infected, dogs with VL have abnormal serum proteins and function and structural changes in the kidneys.

Key words: Visceral Leishmaniasis. Sero-conversion. Dogs. Kidney.



Fig. 1. Acompanhamento trimestral de cão em domicílio. Coleta de sangue em veia jugular.



Fig. 2. Acompanhamento trimestral de cão em domicílio. Punção de medula óssea.

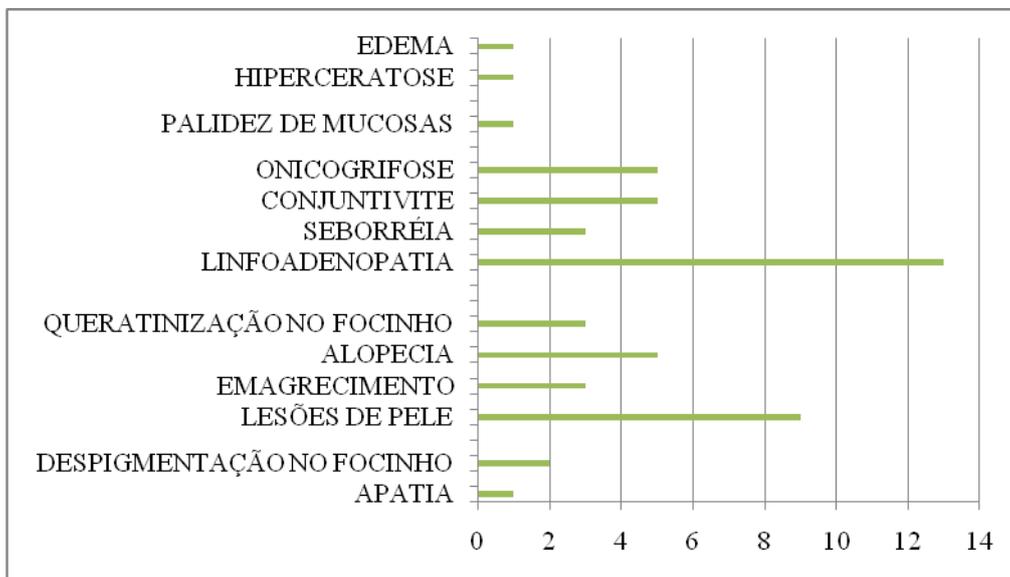


Fig. 3. Sinais clínicos observados em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* num período recente pós-infecção.



Fig. 4. Sinais clínicos observados em cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* num período recente pós-infecção. **Fig. 2A.** Onicogrifose e lesões de pele (região dos dígitos). **Fig. 2B.** Linfonodo poplíteo aumentado de tamanho. **Fig. 2C.** Lesões de pele (orelha). **Fig. 2D.** Lesões de pele (focinho).

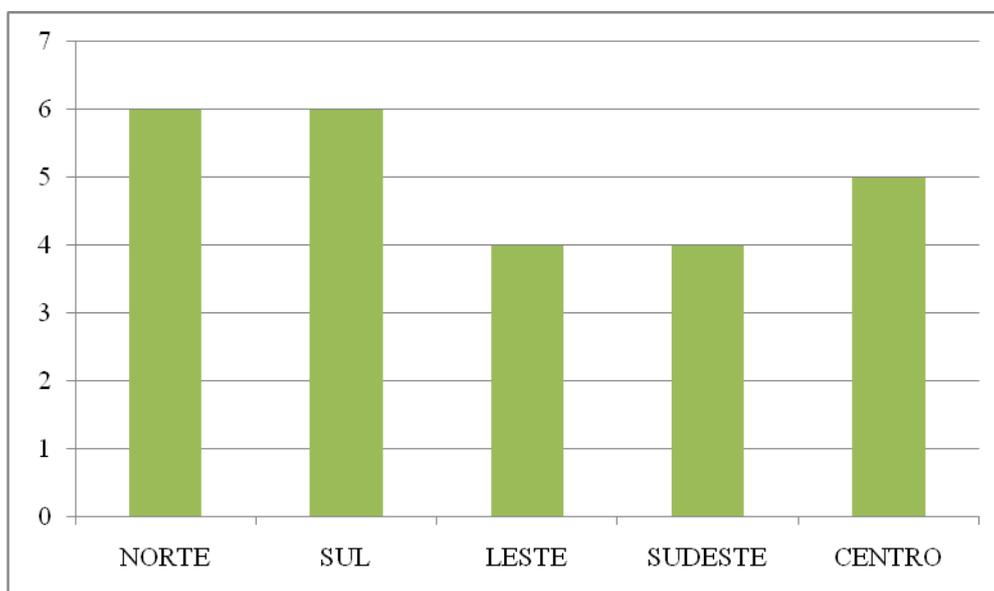


Fig. 5. Distribuição de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* em zonas urbanas de Teresina.

Tabela 1. Resultado de dosagens bioquímicas de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* num período recente pós-infecção, e de animais não infectados.

Animais	Valores Padrões*	Uréia	Creatinina	Proteínas Totais	Albumina	Globulina
		mg/dl 21 - 60	mg/dl 0,5 - 1,5	g/dl 5,4 - 7,1	g/dl 2,6 - 3,3	g/dl 2,7- 4,4
Animais com mais de 3 sinais clínicos	1	23,5	0,7	7,7	2,90	4,80
	2	43,4	16,2	15,2	2,70	12,50
	3	8,0	0,9	10,3	1,73	8,57
	4	21,0	1,0	9,4	2,82	6,58
	5	15,0	1,5	8,6	3,12	5,48
	6	58,0	0,9	9,3	3,16	6,14
	7	27,0	1,4	8,9	2,91	5,99
	8	21,0	0,8	9,7	2,94	6,76
	9	13,0	1,0	9,5	3,18	6,32
	10	54,0	1,6	9,8	2,38	7,42
	11	26,0	1,2	9,0	2,73	5,25
Animais com até 3 sinais clínicos	12	57,0	1,1	9,1	3,39	5,71
	13	42,1	1,4	8,2	2,10	6,10
	14	28,0	1,2	10,7	3,42	7,28
	15	55,0	1,3	8,2	3,49	4,71
	16	15,0	1,1	8,8	3,16	5,64
	17	8,0	1,2	8,4	2,80	5,60
	18	56,0	1,1	7,2	2,87	4,33
Animais sem sinais clínicos	19	38,4	1,0	10,8	2,87	7,95
	20	92,0	0,9	10,2	4,63	5,57
	21	44,1	1,2	6,5	2,90	3,60
	22	30,2	1,0	8,4	2,30	6,10
	23	69,0	1,0	6,0	3,21	2,79
	24	48,0	1,3	6,9	2,26	4,64
	25	38,0	1,0	8,4	4,50	3,84
Animais controles (média de 3 coletas)	1	28,3	1,3	9,6	2,90	6,73
	2	47,3	1,0	7,0	3,93	3,07
	3	42,6	0,9	9,6	3,36	6,27
	4	32,3	1,0	6,6	3,81	2,79
	5	41,3	1,0	7,8	3,51	4,35
	6	54,6	1,3	7,7	3,85	3,91
	7	31,6	0,9	8,2	2,70	5,56
	8	14,6	1,1	9,0	1,97	7,05
	9	26,0	1,0	9,5	3,03	6,47
	10	20,6	1,1	7,7	3,36	4,40
	11	43,0	1,2	6,7	3,40	3,29

*KANEKO et al, 1997

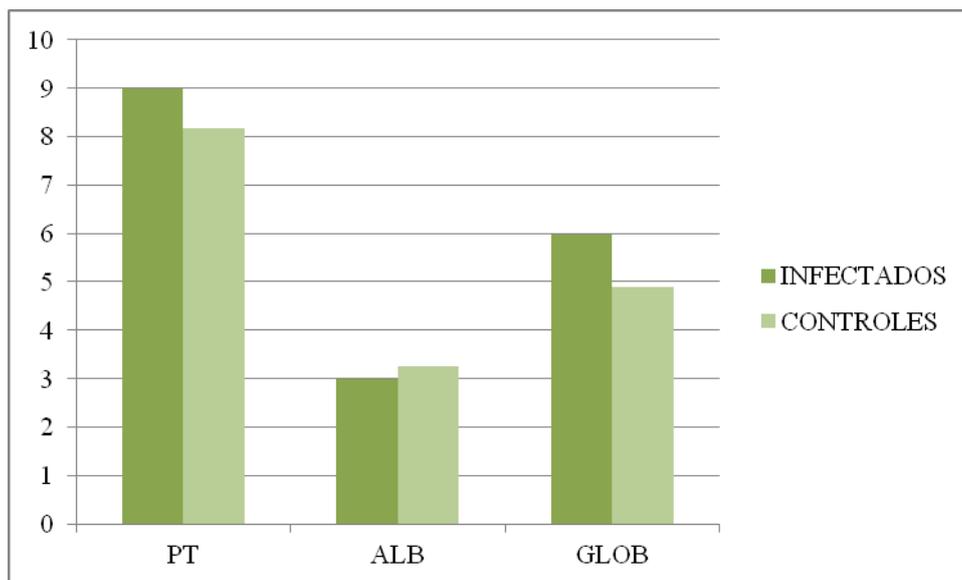


Fig. 6. Valores médios de proteínas totais, albumina e globulina em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* num período recente pós-infecção, e em animais controles.

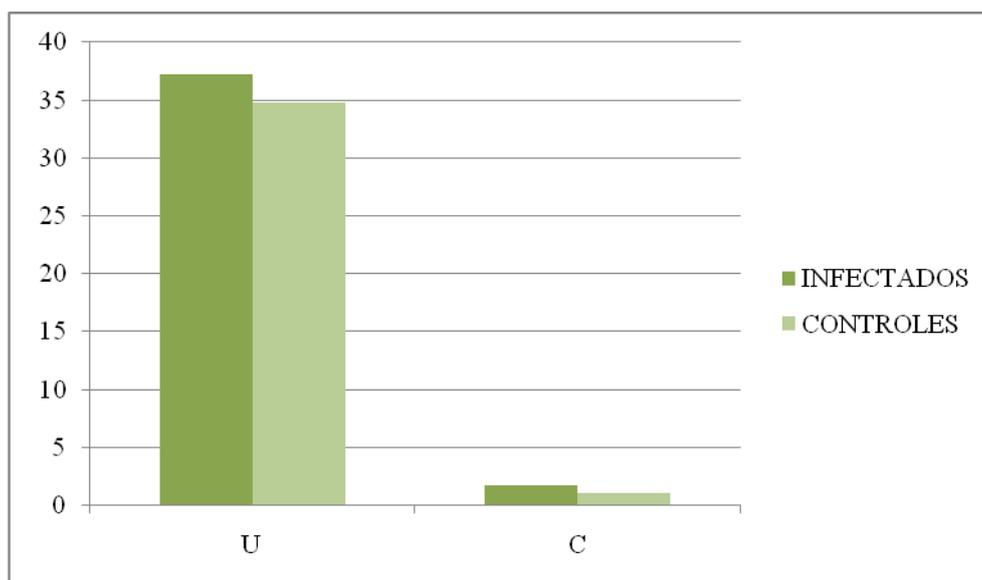


Fig. 7. Valores médios de uréia e creatinina em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* num período recente pós-infecção, e em animais controles.

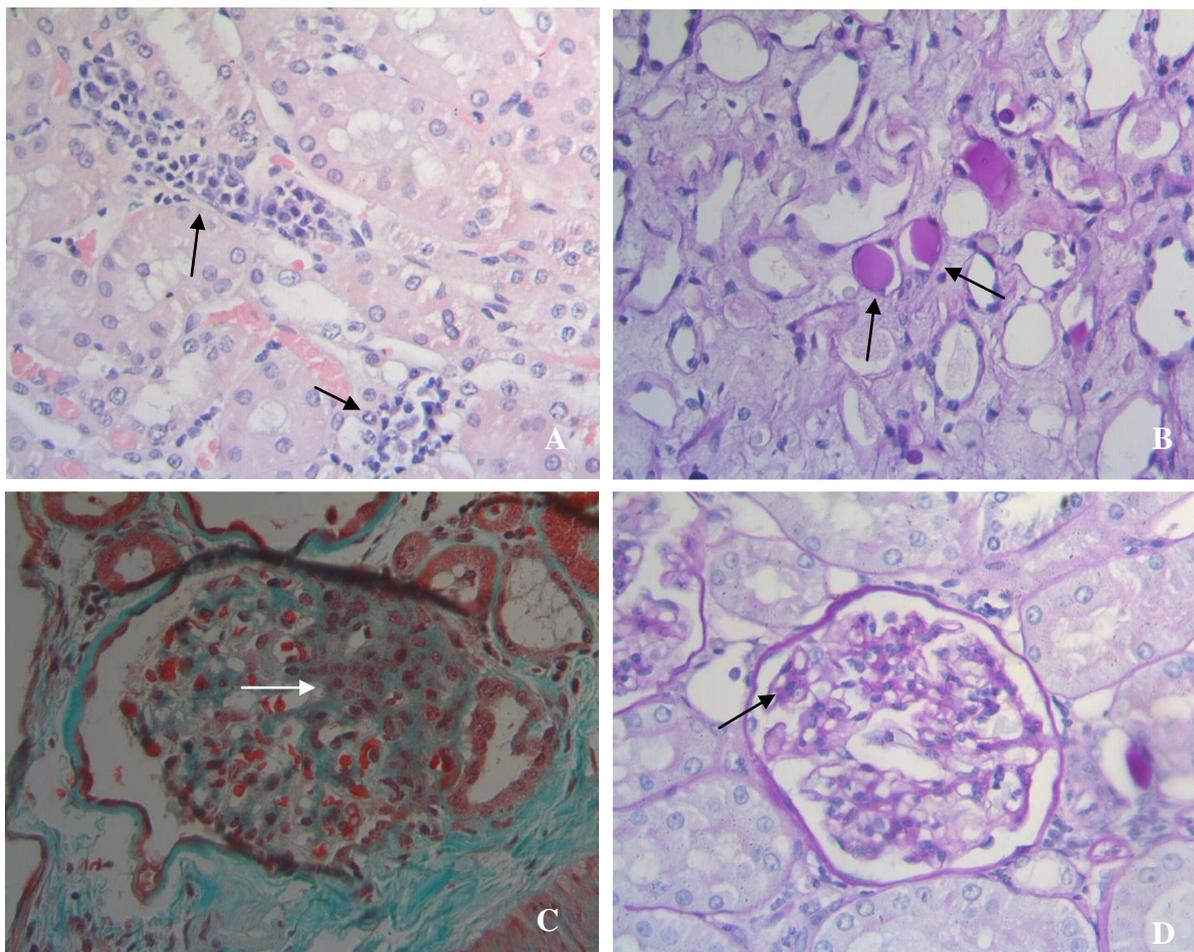


Fig. 8A. Rim. Cão naturalmente infectado por *Leishmania (L.) chagasi*. Infiltrado inflamatório mononuclear (seta) em cão com mais de 3 manifestações clínicas (cão nº 8). Coloração: H-E. Aumento: 40x. **Fig. 5B.** Cilindros hialinos (setas) em cão com 3 sinais clínicos (cão nº16). Coloração: PAS. Aumento: 40x. **Fig. 5C.** Expansão do mesângio em caso de Glomeruloesclerose Segmentar Focal (seta) em cão com 3 manifestações clínicas (cão nº 13). Coloração: Tricrômico de Massom. Aumento: 40x. **Fig. 5D.** Espessamento da membrana basal do capilar gloerular (seta) em caso de Glomerulonefrite Membranoproliferativa em cão com mais de 3 sinais clínicos (cão nº 8). Coloração: PAS. Aumento: 40x.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABRANCHES, P. et al. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **The Journal of Parasitology**, v. 77, p. 557–561, 1991.

ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean kala-azar. VI—Canine visceral leishmaniasis. **Proceedings of the Royal Society London**, v. 110, p. 402–412, 1932.

ALENCAR, J. E. Aspectos clínicos do calazar americano. Revista Brasileira Malariol Doenças Trop 1959; 11:19-44. In: COSTA, C. H. N. **Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil**. Rio de Janeiro: Cadernos Saúde Pública, v. 24, p. 2959-2963, 2008.

ALENCAR, J. E. **Imprensa oficial Calazar canino**: Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Fortaleza: Brasil, 1959. p. 342.

ALMEIDA, M. A. O. et al. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, p. 151–158, 2005.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.
ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 552–557, 2006.

ANAM, K. et al. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 231–235, 1999.

ASHFORD, D. A. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American Society of Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 251-255, 1995.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**, 3. ed. St. Louis: Saunders-elsevier, 2006. p. 685-698.

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

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic development in the last years. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 24, p. 684-703, 1997.

BETTINI, S.; GRADONI, L. Canine leishmaniosis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniosis. **Insect Science and its Application**, v. 7, p. 241–245, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias – aspectos clínicos, vigilância epidemiológica e medidas de controle**. Brasília, DF, p. 121–126, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF, 2006. 120p.

BRAZIL, R. P.; GOMES, B. B. Bionomia. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Orgs.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, p. 257-274, 2003.

CARRASCO, J.; MORRISON, A.; PONCE, C. Behaviour of *Lutzomyia longipalpis* in an area of southern Honduras endemic for visceral/atypical cutaneous leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 92, p. 869–876, 1998.

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

CHAMIZO, C; MORENO, J; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 103, p. 67–75, 2005.

CIARAMELLA, P. et al.. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

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

COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos Saúde Pública**, v. 24, p. 2959-2963, 2008.

COSTA, C. H. N. et al. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 99, p. 229-236, 2005.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAUJO, M. V. Epidemia de calazar no Estado do Piauí, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, p. 361–372, 1990.

COSTA, F. A. L. et al. CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1455-1458, 2000.

COSTA, F. A. L. et al. Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 677, 2003.

COSTA, F. A. L. et al. T cells adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 112, 2010.

COSTA, J. M. L. et al. Leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, Brasil. A evolução de uma epidemia. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, p. 321-324, 1995.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1314–1320, 2002.

COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.

CUNHA, A. M. Infecções experimentais na leishmaniose visceral americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, p. 581–598, 1938.

DA COSTA-VAL, A. P. et al. Canine visceral Leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immuneresponse, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 15, p. 1–8, 2007.

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

DANTAS-TORRES, F.; BRANDAO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, p. 151–156. 2006.

De AMORIM, I. F. G. et al. Humoral immunological profile and parasitological statuses of leishmune vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 55-63, 2010.

DEANE, M. P.; DEANE, L. M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposas (*Lycalopex ventulus*) naturalmente infectadas pela *Leishmania donovani*. **O Hospital**, v. 46, p. 651–653, 1954.

DIAS, D. V. et al. Leishmaniose visceral canina – Estudo parasitológico e histológico em olhos de cães – Parte I. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 58, p. 331–337, 1999

DOS-SANTOS, W. L. C. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 251–259, 2008.

DOS-SANTOS, W. L. et al. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 92, p. 89–94, 2004.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, v. 110, p. 647–656, 1993.

FERRER, L. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381–388, 1988.

GENARO, O. et al. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 43, 1988.

GHALIB, H. W. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 324–329, 1993.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 269–277, 2008a.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 121, p. 23–33, 2008b.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 100–107, 2006.

GOMES, R. B. et al. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 127-133, 2007.

GRADONI, L. Na update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine leishmania vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 100, p. 87-103, 2001.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. **Proceedings...Sevilha**, 2002. p. 7-15.

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

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

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and Eresponses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunolog and Immunopathology**, v. 103, p. 77–81, 2005.

JERONIMO, S. M. et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 386-388, 1994.

KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 74–79, 1984.

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

KRAUSPENHAR, C. et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, 2007.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811–827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 94–106, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; LILLICK-KENDRICK, R. (Ed). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987, 120p.

LIMA, W. G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropical**, v. 92, p. 43–53, 2004.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de patologia clínica veterinária**. 3. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

LOPEZ, R. et al. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, p. 469–474, 1996.

[MADEIRA, M. F.](#) et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? [Research in Veterinary Science](#), v. 87, p. 260–262, 2009.

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

MARTINEZ-MORENO, A. et al. Immunological and histological study of T- and Blymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 51, p. 49–59, 1993.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose visceral-Calazar. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, 1981.

MAURICIO, I. L. et al. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, p. 237–246, 1999.

METTLER, M. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel

tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical and Microbiology**, v. 43, p. 5515–5519, 2005.

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitology**, v. 24, p. 371–377, 2008.

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

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491–493, 1994.

MORRISON, A. C. et al. Seasonal abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medical Entomology**, v. 32 p. 538–548, 1995.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. Capítulo 8.11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 494p.

NIETO, C. G. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, p. 117–130, 1999.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 510–517, 2001.

PANARO, M. A. et al. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, p. 187–195, 2001.

PIAUÍ. Secretaria Estadual da Saúde do Piauí. Coordenação de Vigilância em Saúde Ambiental. **Programa de Controle das Leishmanioses. Série histórica de 1998 a 2008**. Teresina, PI, 2009.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E. et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, p. 121–126, 1999.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum* specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex restricted manner. **European Journal of Immunol**, v. 25, p. 1594–1600, 1995.

PINHEIRO, P. H. C. et al. Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. **Infectious Immunology**, v. 73, p. 3787–3789, 2005.

PLEVRAKI, K. et al. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 228–233, 2006.

QUEIROZ, P. V. S. et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 267–273, 2009.

QUINNELL, R. J. et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, p. 161–168, 2003.

QUINNELL, R. J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1421–1424, 2001.

RAMIRO, M. J. et al. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine**, v. 21, p. 2474–2484, 2003.

REIS, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 102–116, 2006a.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 68–75, 2006b.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 87–95, 2009.

- REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American Cutaneous Leishmaniasis? a critical review of the current evidence. **American journal of tropical medicine hygiene**, v. 61, p. 530–541, 1999.
- REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. p. 214- 256.
- SALOMON, O. D.; ORELLANO, P. W. *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 475–476, 2005.
- SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315-317, 1998.
- SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 88, p. 21–30, 2002.
- SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal Vector Borne Disease**, v. 45, p. 255–272, 2008.
- SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 577-579, 2006.
- SHAW, J. J. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: FARRELL, J. **World Class Parasites: Leishmania**. Boston: Kluwer Academic Publishers, p. 11-31, 2002.
- SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1996.
- SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 285-291, 2001.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1–18, 2009.

SOLANO-GALLEGOS, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 560–563, 2001.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **International Journal of Parasitology**, v.35, p. 63–73, 2005.

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 3, p. 203–212, 2001.

TERESINA. **Gerência de Zoonozes de Teresina**. Teresina, PI, 2009.

TERESINA. **Gerência de Zoonozes de Teresina**. Teresina, PI, 2010.

VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 45, 2008.

VOULDOUKIS, I. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 253–256, 1996.

WERNECK, G. L. et al. Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiology Infection**, v. 135, p. 195–201, 2007.

WERNECK, G. L. et al. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. **Epidemiology**, v. 13, p. 364–367, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis**. Geneva, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 20 dez 2010.

ZATELLI, A. et al. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 558–561, 2003.

ZELEDON, R.; MURILLO, J.; GUTIERREZ, H. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) and possibilities of the existence of visceral leishmaniasis in Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 455–459, 1984.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIA

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Identificação

Animal nº _____

Sexo: Macho () Fêmea (); Cor: _____

Peso: _____ Kg; Idade: _____

Procedência: _____

Exame clínico

Emagrecimento: Sim () Não ()

Alopecia: Sim () Não ()

Descamação furfurácea na pele (seborréia): Sim () Não ()

Queratite: Sim () Não ()

Lesões de pele: Sim () Não ()

- Localização: Focinho () Orelha () Extremidades () Outros _____

Queratinização no focinho Sim: () Não ()

Ulcerações de pele Sim () Não ()

- Localização: Focinho () Orelha () Extremidades () Outros _____

Onicogribose: Sim () Não ()

Nódulos Subcutâneos: Sim () Não ()

Conjuntivite: Sim () Não ()

Mucosas pálidas: Sim () Não ()

Edema: Sim () Não ()

Epistaxe: Sim () Não ()

Diarréia: Sim () Não ()

Fezes sanguinolentas: Sim () Não ()

Apatia: Sim () Não ()

Paresia do trem posterior: Sim () Não ()

Incoordenação motora: Sim () Não ()

Hiperestesia: Sim () Não ()

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Eu _____, proprietário(a) do animal denominado _____, da raça _____, idade _____, autorizo a equipe do Setor de Patologia Animal - UFPI, sob a responsabilidade do professor Dr. Francisco Assis Lima Costa, a realizar em meu animal, coleta de sangue bem como aspirado de medula óssea e linfonodo poplíteo. Autorizo também a realização de exame citológico, bioquímico e sorológico a cada 3 meses, durante 1 ano, para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (“Calazar”). Declaro que estou ciente dos procedimentos, e que me foi explicado em detalhes todas as condutas a serem realizadas em meu animal. Comprometo-me a receber esta equipe em minha residência para os referidos procedimentos, durante todo o tempo necessário, possibilitando assim a conclusão desta pesquisa.

Teresina, _____ de _____ de _____.

NOME COMPLETO DO(A) PROPRIETÁRIO(A)

ASSINATURA DO(A) PROPRIETÁRIO(A)

RG

TERMO DE LIBERAÇÃO DO ANIMAL

Eu _____, proprietário (a) do animal denominado _____, da raça _____, espécie canina e idade _____, autorizo a equipe do Setor de Patologia Animal-UFPI, sob a responsabilidade do professor Dr. Francisco Assis Lima Costa, a recolher meu animal após estar ciente do resultado positivo para Leishmaniose Visceral Canina (“Calazar”), para que nele seja realizada a eutanásia, com todos os requisitos humanitários. Declaro que estou ciente dos procedimentos, e que me foi explicado em detalhes todas as condutas a serem realizadas.

Teresina, _____ de _____ de _____.

NOME DO(A) PROPRIETÁRIO(A)

ASSINATURA DO(A) PROPRIETÁRIO(A)

RG