

ACÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA E DA RIBOFLAVINA NA INATIVAÇÃO DE *LEISHMANIA* EM SANGUE CANINO CONSERVADO EM BOLSAS PARA TRANSFUSÃO¹

Soraya Regina Sacco²
Cesar Rodrigo de Souza Surian²
Rodrigo Costa da Silva²
Hélio Langoni²
Mary Marcondes³
Raimundo Souza Lopes²

RESUMO

É de extrema importância para a medicina transfusional que haja segurança no procedimento de transferência de hemocomponentes, minimizando a ocorrência da transmissão de patógenos. O presente trabalho investigou a eficiência da luz ultravioleta e riboflavina na inativação de *Leishmania infantum chagasi* em amostras de sangue canino, colhidas em bolsas plásticas para transfusão. Para detectar as bolsas de sangue positivas a serem utilizadas no experimento, foi realizada PCR convencional de sangue de bolsas colhidas de animais sintomáticos, positivos na punção aspirativa de linfonodo e na RIFI (título 1:640), procedentes do CCZ de região epidêmica para a enfermidade. Após 21 dias de armazenamento em temperatura de 4°C, o sangue canino parasitado foi adicionado de riboflavina na concentração final de 50µM. Posteriormente, a bolsa foi colocada no iluminador a um comprimento de onda de 365 nm de luz UV por 30 e 45 minutos, sendo mantida sobre um homogeneizador de bolsa de sangue. Para comprovar a inativação, foram utilizados 28 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos e adultos. Sete animais foram inoculados com o sangue sem tratamento (grupo leishmaniose: G_L); sete, com sangue após a adição de riboflavina (grupo riboflavina: G_{RB}); sete, com sangue após tratamento com riboflavina associado à luz ultravioleta por 30 minutos (grupo tratado 1: G_{T30}) e sete, com sangue após tratamento com riboflavina associado à luz ultravioleta por 45 minutos (grupo tratado 2: G_{T45}). Os animais foram mantidos durante 120 dias em caixas para hamsters no Infectório da área de Zoonoses e Saúde Pública da FMVZ, Unesp, Botucatu-SP, e acompanhados clinicamente. O sangue dos hamsters foi colhido por punção intracardíaca para realização dos exames sorológicos e moleculares. Baço, fígado e medula óssea foram extraídos após a necropsia, foram macerados, sendo a medula óssea obtida após a maceração do osso esterno, e foi realizada extração do DNA para realização da PCR convencional e qPCR. O sangue parasitado não perdeu a capacidade de produzir a infecção após o período de armazenamento (21 dias). Os hamsters inoculados com sangue tratado com riboflavina e luz UV por 30 e 45 minutos apresentaram PCR positiva, apesar dos animais não apresentarem sinais clínicos da enfermidade. Na qPCR, pode-se identificar que a associação da riboflavina com a luz UV reduziu a carga parasitária, porém, não eliminou completamente os parasitas, demonstrando a importância de testes laboratoriais para diagnóstico da leishmaniose na seleção de doadores de sangue.

Palavras-chave: *Leishmania infantum chagasi*, leishmaniose, luz UV, vitamina B2, sangue.

¹ Auxílio à Pesquisa FAPESP.

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, Cx. Postal 560, Botucatu, SP. 18618-000, Brasil. soraya_sacco@rocketmail.com.

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Araçatuba, SP.

ACTION OF ULTRAVIOLET LIGHT AND RIBOFLAVIN IN THE INACTIVATION OF *LEISHMANIA* IN CANINE BLOOD STORED IN BAGS FOR TRANSFUSION

ABSTRACT

It is extremely important for the transfusion medicine the safety in blood components transfer procedure, minimizing the occurrence of pathogen transmission. This study investigated the efficiency of ultraviolet light and riboflavin in the inactivation of *Leishmania infantum chagasi* in canine blood samples collected in plastic bags for transfusion. To detect positive blood bags to be used in the experiment, it was performed conventional PCR of the bags collected from symptomatic animals, with positive aspiration of lymph node and IFA (title 1: 640), from an epidemic region for the disease. After 21 days of storage at 4°C, parasitized canine blood riboflavin was added to a final concentration of 50µM. Thereafter, the bag was placed in the illuminator at a wavelength of 365 nm UV light for 30 to 45 minutes and maintained over a homogenizer blood bag. To prove the inactivation, they were used 28 hamsters (*Mesocricetus auratus*), adult, male. Seven animals were inoculated with the blood without treatment (group leishmaniasis: GL); seven, with blood after the addition of riboflavin (riboflavin group: GRB); seven, with blood after treatment with riboflavin associated with ultraviolet light for 30 minutes (treated group 1: GT₃₀) and seven, with blood after treatment with riboflavin associated with ultraviolet light for 45 minutes (treated group 2: GT₄₅). The animals were kept for 120 days in boxes for hamsters in Infectorio of Zoonoses and Public Healthy, FMVZ, Unesp, Botucatu, and followed clinically. The blood of hamsters was collected by intracardiac puncture for realization of serological and molecular tests. Spleen, liver and bone marrow were extracted after the autopsy, were macerated, and the bone marrow obtained after maceration of the sternum, and DNA extraction was performed to make conventional PCR and qPCR. The parasitized blood has not lost the ability to cause infection after the storage period (21 days). The hamsters inoculated with blood treated with riboflavin and UV light for 30 and 45 minutes were PCR positive, while hamsters not showing clinical signs of the disease. In qPCR, it was identified the association of riboflavin with UV light had reduced the number of *Leishmania*, but did not completely eliminate the parasites, demonstrating the importance of laboratory diagnosis of leishmaniasis tests in the selection of dogs as blood donors.

Keywords: *Leishmania infantum chagasi*, leishmaniasis, UV light, vitamin B2, blood.

ACCIÓN DEL LUZ UV Y RIBOFLAVINA EN INACTIVACIÓN DA *LEISHMANIA* EN SANGRE CANINO MANTENIDO EN BOLSAS DE TRANSFUSIÓN

RESUMEN

Es extremadamente importante para la medicina de transfusión tener seguridad en procedimiento de transferencia de componentes de la sangre, lo que minimiza la aparición de transmisión de patógenos. Este estudio investigó la eficacia de la luz ultravioleta y riboflavina en la inactivación de *Leishmania infantum chagasi* en muestras de sangre de perros recogidos en bolsas de plástico para la transfusión. Para detectar bolsas de sangre positivos para ser utilizado en el experimento se realizó PCR convencionales de las bolsas tomadas de animales sintomáticos, la aspiración positiva de los ganglios linfáticos y IFA (título de 1: 640) a partir de CCZ Araçatuba-SP. Después de 21 días de almacenamiento a 4°C la sangre canina parasitada se añadió a riboflavina a una concentración final de 50µM. A partir de entonces, la bolsa fue colocada en el iluminador a una longitud de onda de 365 nm de luz UV durante 30 a

45 minutos y se mantuvo sobre uno homogeneizador de bolsa de sangre. Para demostrar la inactivación se usaron 28 hámsteres (*Mesocricetus auratus*), machos, adultos. Siete animales fueron inoculados con la sangre sin tratamiento (grupo de leishmaniasis: G_L); siete de sangre después de la adición de riboflavina (grupo de riboflavina: G_{RB}); siete de sangre después del tratamiento con riboflavina asociada con luz ultravioleta durante 30 minutos (grupo tratado 1: GT₃₀) y siete con la sangre después del tratamiento con riboflavina asociada con luz ultravioleta durante 45 minutos (grupo tratado 2: GT₄₅). Los animales se mantuvieron durante 120 días en cajas de los hámsters en Infectório de Zoonosis Área FMVZ, UNESP, Botucatu y seguidos clínicamente. La sangre de hámsters se recogió por punción intracardiaca para la determinación de las pruebas serológicas y moleculares. Bazo, hígado y médula ósea se extrajeron después de la autopsia, se maceraron, y la médula ósea obtenida después de la maceración del esternón, y la extracción de ADN se realizó para llevar a cabo PCR convencional y qPCR. La sangre parasitada no ha perdido la capacidad de producir la infección después del período de almacenamiento (21 días). Los hámsteres inoculados con sangre tratado con riboflavina y luz ultravioleta durante 30 y 45 minutos fueron PCR positiva, aunque los animales no presentaran signos clínicos de la enfermedad. En qPCR puede identificar que la combinación de riboflavina con luz UV redujo el número de *Leishmania*, la reducción de la carga parasitaria, pero no elimino completamente los parásitos, lo que demuestra la importancia del diagnóstico de laboratorio de pruebas de leishmaniasis en la selección de los donantes de sangre.

Palabras clave: *Leishmania infantum chagasi*, leishmaniasis, luz UV, vitamina B2, sangre.

INTRODUÇÃO

A transmissão de enfermidades infecciosas pela transfusão sanguínea é bem documentada em Medicina Veterinária. A triagem dos doadores para as principais doenças que podem ser veiculadas pelo sangue é de extrema importância para não piorar a condição clínica do receptor. Existe um risco muito elevado de transmissão de agentes infecciosos, devido ao longo período de incubação e persistência da enfermidade sem sinais clínicos evidentes em animais infectados, existindo assim a probabilidade destes agentes permanecerem viáveis no sangue estocado (1,2).

Os procedimentos de inativação de agentes patogênicos têm uma ampla atividade antimicrobiana, preservando todos os componentes do sangue e representando uma abordagem proativa para a segurança do sangue. O desafio da inativação de patógenos é reduzir o maior número de potenciais agentes patogênicos do sangue, sem comprometer significativamente os constituintes celulares ou proteínas ou introduzir alguma toxicidade nova, carcinogenicidade, ou teratogenicidade (3).

As mais promissoras abordagens para a tentativa de inativação, até o momento, são métodos que têm por alvo o impedimento da replicação do patógeno no genoma de vírus, bactérias e protozoários (tratamento com riboflavina e luz ultravioleta, azul de metileno e Psoralen) (4).

O tratamento de bolsas de sangue para transfusão pela associação riboflavina (RB) e luz UV tem se mostrado muito eficaz em estudos *in vitro* (5). O conhecimento do perfil toxicológico da riboflavina e de seus derivados, sua grande utilização na dieta, assim como o uso de um foto sintetizador eficaz na inativação de patógenos, torna este procedimento promissor para ser utilizado no sangue e seus derivados (6,7).

Sua ação como agente inativador em componentes lábeis tem sido extensamente estudada, com reduções de 4 a 6 log nos títulos de vírus (intra e extracelulares) e bactérias, sem efeitos consideráveis sobre as plaquetas ou fatores de coagulação (4). Cardo et al. (8),

utilizando riboflavina e luz UV, obtiveram uma redução de 5 log de *Leishmania donovani infantum* em cinco de seis unidades de plasma e de 7 log na unidade restante. Além disto, demonstrou uma redução de 5 log de *Leishmania* em cinco de seis unidades de plaquetas, e de 6 log na unidade restante.

A riboflavina (vitamina B2) participa em várias reações de óxido-redução celular, além de possuir importante papel na estrutura de várias enzimas. Por ser altamente solúvel, penetra rapidamente na célula. Desde a década de 60 já se conhecia a sua ação inativadora na presença de luz visível ou UV. Possui capacidade de agir como um fotossensibilizador causando danos seletivos aos ácidos nucleicos, após exposição à luz UV, sem se ligarem às células e proteínas (9). A RB se associa aos ácidos nucleicos e intercede um processo de transferência de elétrons oxigênio-independente que leva à modificação dos ácidos nucleicos, principalmente sobre os resíduos de guanina, bem como a conversão da riboflavina ao seu fotoproduto lumichromo (10).

A utilização de luz UV, sem a adição de riboflavina, causa dano reversível ao ácido nucleico. Porém, os danos induzidos pela RB são irreversíveis, pois os processos de replicação e reparação são prejudicados devido à modificação da base guanina (11). O número de lesões ocorrem com uma frequência de aproximadamente uma em cada 350 pares de base (bp) (12). O dano em ácido nucleico pode ser menos frequente em DNA mitocondrial, conforme mostrado por Janetzko et al. (13).

O presente trabalho investigou a eficácia do tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado, evitando que este agente patogênico possa ser transmitido em procedimentos de transfusão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 caninos, adultos, de idade e sexo variável, sem raça definida, naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi*, sintomáticos, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de região epidêmica para a enfermidade.

A triagem dos animais foi realizada por exames parasitológicos: punção aspirativa do linfonodo poplíteo e esfregaço de ponta de orelha, com presença de formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos. Além disto, para selecionar os cães, foi utilizado o teste rápido imunocromatográfico Kalazar Detect^{®1}, baseado na detecção de anticorpos contra o antígeno rK39 da *Leishmania* sp. Após isto, foi realizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *L. infantum chagasi* para avaliação do título de anticorpos do sangue das respectivas bolsas e todas as amostras apresentavam títulos de 1:640.

Os animais parasitologicamente positivos e sororeagentes, receberam uma pré-anestesia com acepromazina (0,055mg/kg/IV), seguida, de uma indução e manutenção anestésica com pentobarbital sódico (15mg/kg/IV); sendo, então, colhidos 450mL de sangue por punção da veia jugular. Com os cães ainda em plano anestésico, foi aplicada uma ampola de cloreto de potássio a 19,1%, por via intravenosa, em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Senado Federal, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução nº1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Depois da colheita as amostras foram refrigeradas para transporte, sendo mantidas no refrigerador à temperatura de 4°C, durante 21 dias.

No protocolo de fotoinativação utilizado, as hemácias foram combinadas com uma solução de riboflavina a 500µM/L em solução salina 0,9%, obtendo-se uma concentração

¹ Kalazar Detect®, InBios International, Inc. 562 1st Ave. South, Suite 600. Seattle, WA 98104, USA.

final de 50µM, com pH ajustado para 4,0 a 5,0, sendo preparada e autoclavada em frasco âmbar, conforme descrito por Ruane et al. (14) e Cardo et al. (15).

Para avaliar a transmitância das bolsas a serem utilizadas durante o procedimento foram usadas duas marcas distintas (JP^{®1} e Fresenius Kabi^{®2} - FK) de bolsa tripla para transfusão, sendo medidas as transmitâncias da bolsa principal (hemácias) e das satélites (bolsas para plasma e plaquetas). O material que permitiu maior passagem da luz foi a bolsa de plasma da marca Fresenius Kabi[®], sendo esta a selecionada para o procedimento de fotoinativação no presente trabalho.

As bolsas foram fracionadas e 100 mL de sangue total após a adição da RB foram colocadas no iluminador DNA Workstation³ até atingir 60J/mL (16). A mistura foi exposta à luz UV na faixa de 365nm, conforme indica Goodrich et al. (17). O tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 30 e 45 minutos.

Seltsam e Müller (18) obtiveram melhores resultados na irradiação de luz UV quando, durante o procedimento, a bolsa de sangue estava sob agitação, por isso, durante o procedimento a bolsa esteve sob um homogeneizador de bolsa de sangue tipo gangorra modelo HOMBOL-061, Benfer⁴.

Para detectar as bolsas de sangue positivas a serem utilizadas no experimento, foi realizado PCR convencional das bolsas colhidas dos animais do grupo leishmaniose.

O DNA foi extraído de 200µL do sangue coletado das bolsas, utilizando-se o Illustra™ Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare[®]), conforme instruções do fabricante, sendo posteriormente armazenado em microtubos estéreis livres de DNases e RNases e mantido a -20°C até a realização da técnica de PCR.

As reações de PCR foram realizadas em microtubo de 0,5mL com volumes totais de 25 µL contendo tampão de reação 10mM Tris HCl pH 8,0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 10µM de cada *primer*, 0,2 unidades de *Taq* Platinum (Invitrogen) e 10ng de DNA genômico. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf[®]) com o seguinte perfil de ciclagem: desnaturação de 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos e uma extensão final de 70°C durante 10 minutos. Para amplificação foram utilizados os *primers*:

LC14 250-273 (5'-CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG-3')

LC15 416-439 (5'-TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA-3')

Estes *primers* foram desenhados e testados no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), por meio de análise nos programas Primer3 e PrimerBLAST, direcionados para o gene "*Leishmania infantum chagasi* kinetoplast minicircle DNA", AF169138.1 disponível [GenBank]. Nessa reação, o produto resultante apresentou 190 pares de base (pb), que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *L. infantum chagasi*.

Os produtos amplificados foram identificados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Sendo utilizados como controles positivos DNAs da cepa ATTC amplificada de *L. infantum chagasi*, e como negativos (água MilliQ + MIX-PCR). A visualização das bandas no gel e a fotodocumentação foram realizadas em transiluminação com luz ultravioleta (296nm).

Após a análise dos resultados, foi selecionada a bolsa de sangue número três, onde foi amplificado o DNA do parasita por PCR convencional durante todo o período de conservação (21 dias), com o objetivo de utilizar a bolsa do animal com a maior carga parasitária

¹ JP Indústria Farmacêutica S.A., Av. Presidente Castelo Branco 999. Ribeirão Preto/SP, Brasil.

² Fresenius Kabi Brasil Ltda, Av. Marginal Projetada 1652, Fazenda Tamboré, Barueri, SP.

³ Loccus Biotecnology - Loccus, São Paulo, SP.

⁴ Benfer Produtos para laboratórios, Rua Padre Agostinho Poncet 74. São Paulo, SP.

(43,04/ μ L). O animal apresentava-se sintomático no momento da colheita, com áreas de alopecia ao redor dos olhos, onicogribose e caquexia.

Após a adição da riboflavina (RB) e após os tratamentos pela luz UV por 30 minutos e 45 minutos, as amostras se mantiveram positivas na PCR sendo, portanto, necessária à inoculação em hamster.

Foram utilizados 28 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos, adultos, que receberam por via intraperitoneal 3,5mL do sangue (2) obtido de cão com leishmaniose; sendo sete animais inoculados com o sangue sem tratamento (grupo leishmaniose: G_L); sete com sangue após a adição de riboflavina (grupo riboflavina: G_{RB}); sete com sangue após tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta por 30 minutos (grupo tratado I: G_{T30}) e sete com sangue após tratamento com riboflavina associada à luz ultravioleta por 45 minutos (grupo tratado II: G_{T45}).

Os animais foram mantidos durante 120 dias em caixas para hamsters¹ no Infectório da área de Zoonoses e Saúde Pública da FMVZ-Unesp, Botucatu/SP, recebendo água e ração Presence[®] linha roedores² *ad libitum*.

Os hamsters inoculados foram acompanhados clinicamente e sacrificados decorridos 120 dias, utilizando protocolo de Hochman et al. (19).

O sangue dos hamsters foi colhido por punção intracardíaca para realização dos exames sorológicos e moleculares. Baço, fígado e medula óssea foram extraídos após a necropsia, para confecção de lâminas pelo método de aposição de tecido (*imprinting*), e subsequente coloração pela técnica de Giemsa para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp., sendo consideradas positivas caso apresentassem pelo menos uma forma amastigota fagocitada ou livre.

Em seguida, os órgãos (baço, fígado e osso) foram macerados, sendo a medula óssea obtida após a maceração do osso externo, e foi realizada extração do DNA para realização da PCR no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO).

O DNA foi extraído de 200 μ L do sangue coletado, utilizando-se o Illustra[™] Blood Genomic Prep Mini Spin Kit, e de amostras de tecido dos hamsters (baço e fígado) utilizando-se Illustra[™] Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit¹¹. As amostras de osso foram extraídas utilizando-se o kit Multi-Source Axygen com prévia etapa de maceração em nitrogênio líquido. O material genético extraído foi armazenado sob congelamento a -20°C , até o momento da realização das provas biomoleculares. Controles positivo (DNA da cepa ATTC amplificada de *L. infantum chagasi*) e negativos (água MilliQ) foram adicionados a cada bateria de extração.

Os primers LC14 e LC15 utilizados foram desenhados e testados no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), por meio de análise nos programas Primer3 e PrimerBLAST, direcionados para amplificar um fragmento de 190 pares de base (pb) do segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *Leishmania infantum chagasi*, AF169138.1 - disponível [GenBank].

O DNA extraído das amostras de hamsters foi amplificado por meio de PCR em Tempo Real para a determinação da carga parasitária, por meio do sistema SYBR[®]Green, em termociclador StepOne[™] Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para a realização da curva-padrão, foram utilizadas amostras de DNA de ATTC nas concentrações decrescentes de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 parasitas/mL, todas analisadas em triplicata. Os dados foram coletados e analisados com o Step One[™] Software v2.1³. Para todas as análises

¹ Caixa de polipropileno. Elo's Com. e Repres. de Aparelhos para Laboratórios de Biotérios Ltda.

² Presence Nutrição Animal, Av. Professor Benedito Montenegro s/n, Bairro Betel, Paulínia/SP, 13140-000.

³ Life Technologies, EUA.

considerou-se slope (-3,380 a -3,300), R² (0,982 a 0,999) e eficiência (98 a 104%) em intervalos aceitáveis para acurada análise dos resultados.

Os resultados foram submetidos à análise descritiva e a comparação entre os grupos leishmaniose (G_L), riboflavina (G_{RB}), tratado 1 (G_{T30}) e tratado 2 (G_{T45}) foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação de médias. Os valores da carga parasitária foram transformados em logaritmos, com o objetivo de atingir tanto a homogeneidade de variâncias, como a normalidade de distribuição. Para as características qualitativas foi utilizado o teste de qui-quadrado. Os resultados foram discutidos ao nível de 5% de significância, segundo Sampaio (20).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Próximo ao final do experimento (120 dias), os animais dos grupos leishmaniose e riboflavina apresentaram emagrecimento aparente, quando comparados aos demais grupos.

Durante a necropsia dos hamsters, realizada para colheita dos órgãos (baço, fígado e medula óssea) obteve-se os seguintes resultados: 100% dos animais dos grupos leishmaniose e riboflavina apresentaram esplenomegalia, 50% dos hamsters destes dois grupos apresentaram hepatomegalia e 42% dos animais do grupo leishmaniose apresentaram ascite. Os hamsters do G_{T30} e G_{T45} não apresentaram sinais e sintomas durante o período de observação.

No presente trabalho após 120 dias os hamsters do grupo leishmaniose apresentaram hepatoesplenomegalia e ascite. Lei et al. (21) inocularam hamsters com *L. infantum chagasi* pela veia safena e em aproximadamente 15 semanas (105±22,2 dias), os animais apresentaram pele enrugada, aumento de volume abdominal devido à hepatoesplenomegalia, e/ou ascite. Freitas et al. (2) realizaram inoculação de sangue total de cão com leishmaniose e de concentrado de células mononucleares isoladas infectadas por *Leishmania* em hamsters e observaram que após inoculação de sangue total de cão com leishmaniose os sinais e sintomas clínicos nos hamster foram mais evidentes, apresentando aumentos variáveis no baço, no fígado e de gânglios linfáticos mesentéricos, bem como presença de líquido ascítico em alguns casos.

Dessa forma, pode-se dizer que no sangue canino da bolsa três utilizado para inoculação nos hamsters dos grupos G_L e G_{RB}, havia leishmanias e que essas foram transmitidas. O volume de sangue canino utilizado para inoculação dos hamsters no experimento (3,5mL) demonstrou que o parasita *Leishmania infantum chagasi* pode ser experimentalmente transmitido pelo sangue total de cães naturalmente infectados para seus os receptores (hamsters sensíveis).

Esse é um achado importante, dado ao amplo uso de transfusões de sangue na Medicina Veterinária. Além disso, no Brasil, geralmente a terapia pelo sangue envolve o uso de sangue total e de cães doadores escolhidos aleatoriamente, sem o diagnóstico laboratorial para leishmaniose.

Segundo Fast et al. (22), a ação da RB associada à luz UV resulta na inibição das citocinas/quimiocinas, por isso, hipotetizou-se que esse é o motivo, os hamsters do presente estudo receberam sangue tratado, não apresentaram sinais e sintomas clínicos, associado à baixa carga parasitária.

Segundo Goto e Lindoso (23), o hamster mimetiza a patogenia e a clínica da doença humana e canina, manifestando a hepatoesplenomegalia e supressão da resposta das células T. Portanto os animais dos grupos tratados G_{T30} e G_{T45} podem não ter desenvolvido a doença clínica pela supressão da resposta imune mediada por linfócitos T, que segundo Rosypal et al. (24) interagem com os macrófagos parasitados. Estudos realizados por Guarga et al. (25) em cães sintomáticos provenientes da região do Mediterrâneo com LV revelaram que a ausência

de resposta celular está relacionada com a diminuição dos níveis de CD4+ e altos títulos de anticorpos. Ainda de acordo com esses autores (24), os macrófagos infectados têm capacidade reduzida de interagir com linfócitos T, o que interfere na liberação de interferon-gama e promovem a destruição do parasito.

Dos sete hamsters inoculados do grupo leishmaniose somente um foi negativo, não sendo encontradas formas amastigotas do agente em *imprinting* dos órgãos avaliados (medula óssea, baço e fígado), sendo, portanto 83% dos animais positivos para *Leishmania*. O mesmo ocorreu no grupo riboflavina. Porém dos sete animais do grupo tratado I e dos sete do grupo tratado II, quatro em cada grupo foram positivos na pesquisa de formas amastigotas de leishmanias (57%) em pelo menos um dos órgãos linfoides, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando se compara G_L e G_{RB} com os grupos tratados com riboflavina associada à luz ultravioleta (G_{T30} e G_{T45}).

Mesmo após o tratamento com riboflavina associada à luz UV nos grupos G_{T30} e G_{T45} , em 57% dos animais em cada grupo detectaram-se as formas amastigotas no esfregaço sanguíneo, indicando que a técnica não eliminou completamente os parasitas.

Quando avaliados os órgãos linfoides separadamente, formas amastigotas de LV foram encontradas em *imprinting* da medula óssea dos hamsters no grupo leishmaniose, sendo que 86% das amostras eram positivas e 14% negativas; no grupo riboflavina 71% eram positivas e 29% negativas; no tratamento com associação de riboflavina e luz UV por 30 minutos (grupo tratado I) 29% eram positivas e 71% das lâminas eram negativas e no tratamento com associação de riboflavina e luz UV por 45 minutos (grupo tratado II) 14% eram positivas enquanto que em 86% das lâminas não foi encontrado o parasita. Essa menor porcentagem de lâminas positivas para *L. infantum chagasi* foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando se compara os grupos tratados com luz UV por 30 e 45 minutos com os grupos leishmaniose e riboflavina.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp. foram encontradas no *imprinting* de baço, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Sendo a porcentagem de amostras positivas 71% e a porcentagem de amostras negativas 29% no grupo leishmaniose e 57% positivas e 43% negativas, nos grupos riboflavina, tratado I e tratado II.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp foram encontradas no *imprinting* de fígado, não havendo diferença entre os grupos ($p > 0,05$), sendo que 14% das amostras eram positivas e 86% negativas no G_L , 29% das amostras eram positivas e 71% negativas no G_{RB} , 29% das amostras eram positivas e 71% negativas no G_{T30} e 14% das amostras positivas e 86% negativas no G_{T45} .

A pesquisa de amastigotas foi positiva no baço na maioria dos animais infectados, independente do grupo inoculado com sangue de canino com leishmaniose, confirmando as observações de outros autores em infecções experimentais, e em casos caninos e humanos de leishmaniose visceral submetidos à necropsia (26,27,28). De acordo com Singh e Sivakumar (27), em cães, a sensibilidade é maior quando se utiliza aspirado esplênico. Segundo Zijlstra et al. (26) o diagnóstico da doença nos cães pode ser feito pela demonstração das formas amastigotas em aspirados de linfonodos, medula óssea e baço, com sensibilidade de 58, 70 e 96% respectivamente.

A pesquisa de formas amastigotas nos *imprintings* dos órgãos linfoides dos hamsters dos grupos G_L , G_{RB} , G_{T30} e G_{T45} serviu para diagnosticar a LV. Para Ferrer (29) uma das formas mais seguras de diagnóstico de leishmaniose visceral é a observação direta de formas amastigotas do parasita em *imprintings* de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos. Para Slappendel e Ferrer (30) a especificidade deste método é virtualmente 100%, mas dependendo do tempo despendido procurando o parasita a sensibilidade passa a ser de no máximo 80% em animais sintomáticos e menor em cães assintomáticos.

Os sete hamsters inoculados do grupo leishmaniose tiveram todas as amostras de sangue negativas na PCR convencional, enquanto 100% das amostras de medula óssea e baço foram positivas. No fígado a PCR foi positiva em 42% das amostras. Isto ocorreu porque os animais não estavam mais em parasitemia, devido ao tempo transcorrido entre a inoculação e a obtenção do sangue (120 dias), estando os parasitas nos órgãos linfoides.

No grupo riboflavina 28% das amostras foram positivas pela PCR convencional no sangue, 71% no baço e no fígado e 86% foram positivas na medula óssea. Este grupo se comporta de forma semelhante ao GL, já que a riboflavina utilizada sem a associação com a luz UV, não apresenta sua ação inativadora de agir como um fotossensibilizador, e desta forma segundo Marschner e Goodrich (9) não provoca os danos seletivos aos ácidos nucleicos esperados.

Dos hamsters que receberam sangue tratado com riboflavina e luz ultravioleta por 30 minutos (tratado 1), 28% das amostras foram positivas para PCR no sangue, 100% positivas no baço e medula óssea e 71% no fígado. Mesmo após o tratamento com riboflavina associada à luz UV por 30 minutos os animais apresentaram diagnóstico laboratorial positivo, e quando realizada a técnica da PCR convencional, pode-se observar DNA do parasita no sangue, baço, medula óssea e fígado, indicando que o tratamento não eliminou completamente o parasita.

Os animais que receberam sangue tratado com riboflavina associada à luz UV por 45 minutos (tratado 2) apresentaram porcentagem de positivos na PCR convencional de 28% no sangue e 100% no baço, fígado e medula óssea. Mesmo após o tratamento com RB e 45 minutos de luz UV os animais apresentaram diagnóstico laboratorial positivo, podendo-se observar DNA do parasita no sangue, baço, medula óssea e fígado, pela PCR convencional, indicando que o tratamento assim como no grupo GT₃₀ não eliminou completamente o agente.

Para o diagnóstico realizado por PCR convencional a utilização dos protocolos de luz UV (30 e 45 minutos) não revelou diagnóstico negativo, sendo necessário a utilização da PCR quantitativa para determinar a carga parasitária. Para Nunes et al. (31), a escolha do tecido onde será realizada a pesquisa do DNA do parasita influencia a sensibilidade da reação. De acordo com Miró et al. (32) e Paltrinieri et al. (33), nas amostras de sangue a sensibilidade é menor, principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele e medula óssea. Segundo Mortarino et al. (34) a técnica de PCR em tempo real (qPCR) é um método avançado que pode detectar níveis extremamente baixos de parasitas, baseando-se na detecção e quantificação em tempo real da fluorescência emitida proporcionalmente à síntese do produto de PCR, sendo um método mais sensível do que o PCR convencional, com menor risco de contaminação, uma vez que o sistema é fechado.

A somatória da média da carga parasitária do sangue com os órgãos linfoides (MO, baço e fígado) foi de $134 \times 10^6 \pm 113 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo leishmaniose, $73 \times 10^6 \pm 43 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo riboflavina, $9 \times 10^6 \pm 19 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo tratado I, com a associação de riboflavina mais 30 minutos de luz UV e de $0,5 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6/\mu\text{L}$ no grupo tratado II, com a associação de riboflavina mais 45 minutos de luz UV.

Isto demonstra que apesar dos hamsters serem positivos na técnica de PCR convencional para *L. infantum chagasi*, houve menor carga parasitária nos grupos tratados I e II, quando comparados aos grupos leishmaniose e riboflavina ($p < 0,05$). Esta redução se deve, segundo Speek e Rosenkranz (10) ao fato da RB se associar aos ácidos nucleicos do parasita e interceder um processo de transferência de elétrons oxigênio-independente que leva à modificação destes ácidos nucleicos, principalmente sobre os resíduos de guanina. Para Kumar et al. (11), a utilização de luz UV, sem a adição de riboflavina, causa dano reversível ao ácido nucleico, porém, os danos induzidos pela RB são irreversíveis, pois os processos de replicação e reparação são prejudicados devido à modificação da base guanina.

O órgão com maior carga parasitária foi a medula óssea, todos os grupos apresentaram grande quantidade do parasita, porém houve significativamente menor carga parasitária na MO nos hamsters do grupo G_{T30} e G_{T45} quando comparados aos grupos leishmaniose e riboflavina (RB) ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística descritiva da carga parasitária ($/\mu\text{L}$) obtida pela qPCR da medula óssea nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	$133 \times 10^6 \text{A}$	112×10^6	116×10^6	6,62	304×10^6	42×10^6
Riboflavina	$73 \times 10^6 \text{A}$	43×10^6	86×10^6	0,00	106×10^6	19×10^6
Tratado I	$9 \times 10^6 \text{B}$	19×10^6	3,87	0,00	52×10^6	7×10^6
Tratado II	$0,45 \times 10^6 \text{B}$	1×10^6	2,69	0,00	3×10^6	$0,45 \times 10^6$

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Quando se compara a redução da carga parasitária dos grupos com o grupo leishmaniose, o grupo riboflavina apresentou uma redução de 46% da carga inicial, enquanto o grupo tratado I (30 minutos de luz UV) teve uma redução de 93% da carga parasitária e o grupo tratado II (45 minutos de luz UV) uma redução de 99% da carga parasitária do início do experimento. Sendo o tratamento do G_{T45} o mais efetivo na redução da carga parasitária.

O baço foi o segundo órgão com maior carga parasitária, havendo diferença significativa entre o grupo leishmaniose e o grupo riboflavina e tratado II ($p < 0,05$) (Tabela 2). Houve uma redução de 90% da carga parasitária no grupo riboflavina, de 40% no grupo tratado I (30 minutos de luz UV) e de 87% no grupo tratado II (45 minutos de luz UV), quando comparados ao grupo leishmaniose.

Tabela 2. Estatística descritiva da carga parasitária ($/\mu\text{L}$) obtida pela qPCR do baço nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	$476 \times 10^3 \text{A}$	1×10^6	90,87	9,39	2×10^6	475×10^3
Riboflavina	$45 \times 10^3 \text{B}$	87×10^3	5×10^3	64,70	239×10^3	33×10^3
Tratado I	$283 \times 10^3 \text{A}$	404×10^3	2×10^3	300,55	911×10^3	152×10^3
Tratado II	$59 \times 10^3 \text{B}$	99×10^3	9×10^3	0,00	276×10^3	37×10^3

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

O fígado não apresentou carga parasitária tão alta quanto aos demais órgãos avaliados, não havendo diferença estatística entre os grupos estudados ($p > 0,05$) (Tabela 3). Segundo Wilson et al. (35) o fígado serve como local de replicação inicial do parasito e o baço como local de persistência. Em seu estudo com camundongos, 60 dias pós-infecção o baço passou a apresentar maior carga parasitária em comparação ao fígado, sugerindo que o fígado esteja montando uma resposta imune eficiente frente ao parasito. Sabe-se que a infecção do fígado é auto limitante, com formação de granulomas, e que no baço o crescimento do parasito é lento e persistente, além desse órgão ser conhecido por ser mais suscetível à infecção por *Leishmania* spp.

Tabela 3. Estatística descritiva da carga parasitária (μL) obtida pela qPCR do fígado nos diferentes grupos: leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	58,22	131,86	7,59	0,00	356,78	49,84
Riboflavina	111,16	218,35	11,22	0,00	500,61	97,65
Tratado I	83,50	220,00	18,21	2,16	583,20	83,30
Tratado II	119,50	207,17	18,93	0,00	551,70	78,30

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

O sangue em todos os grupos teve baixa carga parasitária pela técnica de qPCR, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$) (Tabela 4). Uma explicação para este fato é que parasitemia nesta fase da infecção é menor, já que os parasitas encontram-se nos órgãos linfoides. Na PCR para amostras de sangue, a sensibilidade é menor (31), principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele, medula óssea (32,33) e baço (36).

Tabela 4. Estatística descritiva da carga parasitária (μL) obtida pela qPCR do sangue nos diferentes grupos : leishmaniose, riboflavina, tratado I com riboflavina associada a 30 minutos de luz UV e tratado II com riboflavina associada a 45 minutos de luz UV.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Leishmaniose	0,85	1,35	0,25	0,00	3,24	0,61
Riboflavina	0,03	0,08	0,00	0,00	0,20	0,03
Tratado I	0,30	0,81	0,00	0,00	2,13	0,30
Tratado II	0,46	0,88	0,00	0,00	2,42	0,33

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

A diferença nos resultados no sangue e nos órgãos linfoides pode estar relacionada com a distribuição heterogênea dos parasitas, em cada tecido, bem como a carga parasitária e resposta imune local (37).

Os resultados do presente estudo são semelhantes aos de Cardo et al. (8), que utilizando riboflavina e luz UV em bolsas de plasma, obtiveram uma redução significativa de *Leishmania donovani infantum*, principalmente quando se avaliam os resultados das cargas parasitárias na medula óssea e no baço.

A associação da riboflavina com a luz UV reduziu a carga parasitária de *Leishmania infantum chagasi* quando se considera a somatória da média da carga parasitária do sangue com os órgãos linfoides (MO, baço e fígado), porém, não evitou que este agente patogênico possa ser transmitido em procedimentos de terapia pelo sangue, já que o parasita e o seu DNA foram encontrados nos órgãos linfoides. Porém, o sangue parasitado tratado com riboflavina e luz ultravioleta não foi capaz de produzir sinais e sintomas em hamsters durante o período estudado de 120 dias.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, nas condições em que foi realizado, permitem concluir que o sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* não perdeu a capacidade de produzir a infecção após o período de armazenamento de 21 dias.

O tratamento com luz ultravioleta e riboflavina do sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* impede o aparecimento de sintomas nos hamsters e diminui a sua carga parasitária.

O trabalho está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEEA), protocolo nº 120/2007 – CEEA.

REFERÊNCIAS

1. Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. J Am Vet Med Assoc. 2001;219:1076-83.
2. Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP, Michalick MSM. Transmisión of *Leishmania infantum* via blood transfusión in dogs: potencial for infection and importante of clinical factors. Vet Parasitol. 2005;137:159-67.
3. Bryant BJ, Klein HG. Pathogen inactivation: the definitive safeguard for the blood supply. Arch Pathol Lab Med. 2007;131:719-33.
4. Wendel S. A quimioprofilaxia de doenças transmissíveis por transfusão em componentes lábeis hemoterápicos. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35:275-81.
5. Goodrich RP, Hansen E, Gilmour D, Jesser R, Keil S, Goodrich T. Inactivation of pathogens in blood products with riboflavin and light. Lakewood, CO: Gambro BCT Inc; 2000.
6. Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP. Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. Transfus Med Rev. 2008;22:133-53.
7. Reikvam H, Marschner S, Apelseh TO, Goodrich R, Hervig T. The Mirasol® Pathogen Reduction Technology system and quality of platelets stored in platelet additive solution. Blood Transfus. 2010;8:186-92.
8. Cardo LJ, Rentas FJ, Ketchum L, Salata J, Harman R, Melvin W, et al. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani infantum* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. Vox Sang. 2006;90:85-91.
9. Marschner S, Goodrich R. Pathogen reduction technology treatment of platelets, plasma and whole blood using riboflavin and UV light. Transfus Med Hemother. 2011;38:8-18.
10. Speck WT, Rosenkranz HS. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia a potential environmental health hazard to new-born infants: a review. Environ Mutagen. 1979;1:321-36.

11. Kumar V, Lockerbie O, Keil SD. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *J Photochem Photobiol.* 2004;80:15-21.
12. Goodrich RP, Edrich RA, Goodrich L, Scott C, Manica K, Hlavinka D, et al. The antiviral and antibacterial properties of riboflavin and light: applications to blood safety and transfusion medicine. In: Silva E, Edwards AM. *Flavins: photochemistry and photobiology. Comprehensive series in photochemical and photobiological sciences.* Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2006. p.83-113.
13. Janetzko K, Hinz K, Marschner S, Klüter H, Bugert P. Monitoring of the mirasol pathogen reduction procedure for platelet concentrates by PCR and bioanalyzer. *Transfus Med Hemother.* 2007;34:60-5.
14. Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SDK, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion.* 2004;44:877-85.
15. Cardo LJ, Salata J, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apheresis Sci.* 2007;37:131-7.
16. Rentas F, Harman R, Gomez C, Salata J, Childs J, Silva T, et al. Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. *Transfusion.* 2007;47:240-7.
17. Goodrich RP, Doane S, Reddy HL. Design and development of a method for the reduction of infectious pathogen load and inactivation of white blood cells in whole blood products. *Biologicals.* 2010;38:20-30.
18. Seltsam A, Müller TH. UVC irradiation for pathogen reduction of platelet concentrates and plasma. *Transfus Med Hemother.* 2011;38:43-54.
19. Hochman B, Ferreira LM, Bôas FCV, Mariano M. Integração do enxerto heterólogo de pele humana no subepitélio da bolsa jugal do hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Cir Bras.* 2003;18:415-30.
20. Sampaio IBM. *Estatística aplicada à experimentação animal.* Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia; 1998.
21. Lei SM, Ramer-Tait AE, Dahlin-Laborde RR, Mullin K, Beetham JK. Reduced hamster usage and stress in propagating *Leishmania chagasi* promastigotes using cryopreservation and saphenous vein inoculation. *J Parasitol.* 2010;96:103-8.
22. Fast LD, Dileone G, Marschne S. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation. *Transfusion.* 2006;51:1397-404.
23. Goto H, Lindoso JAL. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:615-23.

24. Rosypal AC, Gogal RMJ, Zajac AM, Troy GC, Lindsay DS. Flow cytometric analyses of cellular responses in dogs experimentally infected with a north american isolate of *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 2005;131:45-51.
25. Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Alvar J, et al. Canine leishmaniasis transmission, higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T-helper cells. *Res Vet Sci*. 2000;69:249-53.
26. Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EAG, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from Sudan. *Trop Med Int Health*. 2001;6:108-13.
27. Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*. 2003;49:55-60.
28. Wyllie S, Fairlamb AH. Refinement of techniques for the propagation of *Leishmania donovani* in hamsters. *Acta Trop*. 2006;97:364-9.
29. Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Canine Leishmaniasis: an update; 1999; Barcelona. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet; 1999. p.6-10.*
30. Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniasis. In: *Greene CE. Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: WB Saunders; 1990. p.450-8.*
31. Nunes CM, Dias AKK, Gottardi FP, Paula HB, Azevedo MAA, Lima VMF, et al. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2007;16:5-9.
32. Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*. 2008;24:371-7.
33. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Ass*. 2010;236:1184-91.
34. Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parassitologia*. 2004;46:163-7.
35. Wilson ME, Sandor M, Blum AM, Young BM, Metwali A, Elliott D, et al. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue specific replication of *Leishmania chagasi*. *J Immunol*. 1996;156:2231-22.
36. Solcà MS, Guedes CE, Nascimento EG, Oliveira GG, Santos WL, Fraga DH, et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Vet Parasitol*. 2012;184:133-40.

37. Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. Vet J. 2009;179:142-4.

Recebido em: 28/05/2015

Aceito em: 11/07/2016