



Avaliação da resposta inflamatória em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*

Inflammatory response evaluation in naturally infected dogs by Leishmania infantum

Belarmino Eugênio Lopes-Neto¹, Adam Leal Lima¹, Glauco Jonas Lemos Santos¹, Lucas Diniz Gonçalves¹, Fernanda Maria Machado Maia², José Claudio Carneiro de Freitas¹, Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro^{1*}

Arti
go

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

² Curso de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará.

*Autor para correspondência: e-mail: diana.pinheiro@uece.br

RESUMO: A leishmaniose visceral canina (LVC) é manifestada por danos ao organismo dos animais infectados com *Leishmania infantum* e apresenta-se como doença assintomática ou sintomática. Os diferentes quadros clínicos estão associados a resposta do hospedeiro através da resposta inflamatória e da resposta imunológica específica. Objetivou-se avaliar a resposta inflamatória de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Cães (n = 12), ambos os sexos, foram divididos em dois grupos: soropositivos (n = 6) e soronegativos (n = 6). Amostras de sangue foram coletadas dos animais para a determinação das contagens de Leucócitos Totais e Neutrófilos e os níveis séricos de proteína C reativa (PCR), fibrinogênio (FIB) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os dados foram expressos em média e desvio padrão e para comparação dos grupos foi utilizado o teste *t* Student ($p < 0,05$). Os animais soropositivos apresentaram neutrofilia ($p < 0,05$), PCR acima dos valores de referência para a espécie ($p < 0,05$) e níveis elevados de TBARS ($p < 0,05$) em relação aos animais soronegativos. Pode-se concluir que as proteínas de fase aguda e os mediadores do estresse oxidativo podem ser utilizados como marcadores da resposta inflamatória na LVC.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, proteínas de fase aguda, estresse oxidativo.

ABSTRACT: Canine visceral leishmaniasis (CVL) is manifested by tissue damage in dogs infected with *Leishmania infantum* and is presented as asymptomatic or symptomatic disease. Different clinical pictures are associated with the host response, which is triggered by the inflammatory response and specific immune response. This study aimed to evaluate the inflammatory response in *L. infantum* naturally infected dogs. Dogs (n=12) were divided into two groups: seropositive (n=6) and seronegative (n=6). Blood samples were collected for determination of total leukocyte and neutrophil counts and serum levels of C-reactive protein (CRP), fibrinogen (FIB) and thiobarbituric acid reactive species (TBARS). Data were expressed as mean and standard deviation and to compare the groups Student *t* test was used ($p < 0.05$). Seropositive animals showed elevated neutrophils count ($p < 0.05$), CRP levels above the reference values for the species ($p < 0.05$) and greater levels of TBARS ($p < 0.05$) compared to

seronegative animals. It can be concluded that acute phase proteins and mediators of oxidative stress may be used as markers of the inflammatory response in LVC.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis, acute phase proteins, oxidative stress.

Autor para correspondência: E-mail: * diana.pinheiro@uece.br

Recebido em 09/09/2015; Aceito em 22/12/2015

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20150058>

Introdução

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* os quais representam um problema de saúde pública (MONTEIRO et al., 2005; OMS, 2010).

As espécies de *Leishmania* diferem na enfermidade que provocam nos mamíferos e o cão doméstico é apontado como principal responsável pela manutenção do ciclo do parasito nas áreas urbanas, embora o homem também possa atuar como hospedeiro reservatório, (JÚNIOR et al., 2015).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) pode ser uma doença assintomática ou sintomática, podendo levar o animal a morte. Estes diferentes quadros clínicos dependem da resposta imune do cão e da cepa do parasito inoculado pela picada do inseto vetor (SILVA, 2007; FREITAS et al., 2012).

Após a inoculação do parasito, as primeiras células a serem recrutadas para o local são os neutrófilos, essas células participam ativamente nos mecanismos de defesa contra a infecção, porém elas também

podem participar como elementos de evasão do protozoário, possibilitando a entrada silenciosa e sobrevivência do parasito nos macrófagos (LASKAY et al., 2008; RITTER et al., 2009; CHARMOY et al., 2010).

Os parasitos podem também multiplicarem-se nos macrófagos e rompê-los e em seguida serem fagocitados por células mononucleares do sistema reticuloendotelial, localizados no baço, fígado e medula óssea, causando severas lesões teciduais (AGA et al., 2002; PODINOVSKAIA & DESCOTEAUX, 2015).

A fagocitose pode ocorrer por mecanismos oxidativos e não-oxidativos. O mecanismo oxidativo é gerado através de processos que utilizam um elevado consumo de oxigênio plasmático (explosão respiratória) resultando na geração de produtos microbicidas, como espécies reativas ao oxigênio (EROs) (SEGAL, 2005).

O acúmulo dos mesmos pode provocar a lesão de biomoléculas e, conseqüentemente, o desenvolvimento do estresse oxidativo o qual pode ser

manifestado através dos sinais clínicos característicos na LVC (BILDIK et al., 2004; BRITTI et al., 2008, ASSCHE et al., 2011).

Um dos indicadores do estresse oxidativo é a avaliação da peroxidação lipídica que é realizada através da dosagem das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), já que a maioria dos EROs reagem com os ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana celular, podendo levar a destruição estrutural da célula, a falência dos mecanismos de troca metabólica e a morte celular (BARBOSA et al., 2010; LIMA & ABDALLA, 2001). Já as proteínas de fase aguda funcionam como biomarcadores da resposta inflamatória que é considerada um importante mecanismo de defesa da imunidade inata (CERON et al., 2005). Como exemplo dessas proteínas, podemos citar a fibrinogênio e a proteína C reativa (PCR).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivos avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas, os níveis de proteínas de fase aguda (proteína C reativa e fibrinogênio), de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como marcadores do processo inflamatório e do estresse oxidativo em animais naturalmente infectados por *L. infantum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 12 cães adultos, de ambos os sexos, com peso e idade variados e

sem raça definida. Os animais soropositivos foram oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza (CCZ), recolhidos através do programa SOS Cão. Um canil particular forneceu os cães soronegativos. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE), nº 08622833-1.

Seleção dos Animais

Os animais foram selecionados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), sendo considerados soropositivos aqueles com títulos de RIFI e ELISA $\geq 1:40$. O diagnóstico sorológico da LVC foi realizado no CCZ utilizando kits padronizados fornecidos pela Bio-Manguinhos.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos: soropositivos (G1; n = 6) e soronegativos (G2; n = 6) para *L. infantum*. Os cães soropositivos apresentavam pelo menos 3 sinais clínicos associados à doença, incluindo alopecia, perda de peso, lesões cutâneas, onicogribose, apatia, ceratoconjuntivite e hepatoesplenomegalia. Foram considerados soronegativos cães sorologicamente negativos por RIFI e ELISA e sem alterações clínicas.

Coleta das amostras de sangue

Foram coletados 10 mL de sangue por venopunção jugular dos cães de ambos os

grupos. Para tanto, utilizou-se uma seringa estéril, distribuindo-se 3 mL de sangue em tubo com anticoagulante (EDTA), 4 mL de sangue em tubo com anticoagulante (Citrato a 3,2%) e 3mL em tubo sem anticoagulante e com gel de separação. Logo após a coleta, as amostras de soros obtidos por centrifugação do sangue foram aliquotadas e armazenadas a -20°C, para posterior análise bioquímica e dosagem de proteína C reativa (PCR). Amostras de plasma em EDTA e Citrato foram coletadas e armazenadas para análise de TBARS e fibrinogênio, respectivamente.

Avaliação hematológica

As amostras de sangue em EDTA foram homogeneizadas e submetidas ao aparelho de automação (Hema Screen® 18) para realização do hemograma completo. Os resultados do hemograma foram realizados tendo-se como valores de referência FELDMAN et al. (2000). Os parâmetros hematológicos avaliados da série branca incluem a contagem de leucócitos totais (LT, $\times 10^3/\text{dL}$) e diferenciais: neutrófilos, eosinófilos, monócitos, basófilos e linfócitos.

Dosagem de Proteína C reativa

O teste da Proteína C reativa (PCR LatexR/Laborclin®) empregado baseou-se numa análise semiquantitativa na diluição do soro sanguíneo (1:2; 1:5). Para tanto 10 μL de soro foram misturados a 10 μL do reagente teste e homogenizados por cinco minutos.

Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentam aglutinação. Nas amostras positivas foi repetido o teste em função das diluições.

Dosagem de Fibrinogênio

Fibrinogênio (FIB) foi avaliado em plasma sanguíneo coletado em tubo com anticoagulante citrato, de acordo com a metodologia de kits comerciais para humano (SATR-FIB2/Diagnostica®) em aparelho de automação (STAR-2 evolution/Stago S.A.S.®). Os resultados de FIB são expressos em relação ao teor de Proteínas Totais (PT) (PT/FIB). As proteínas totais (PT, g/dL) foram determinadas em aparelho de automação (Metrolab® 2300 Plus) com kits específicos (Wiener LAB®).

Avaliação do estresse oxidativo através da dosagem do TBARS

Amostras do plasma sanguíneo (100 μL) foram adicionadas ao de ácido tricloroacético (30%) (200 μL) e agitados por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 200 μL de tampão Tris-HCl (pH 7,4) e 200 μL de ácido tiobarbitúrico (0,73%) e novamente agitados por 1 minuto. A mistura reacional foi colocada em banho-maria fervente por 1 hora.

Após esse período as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado para a leitura em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram calculados de acordo com uma curva

padrão feita com malondialdeído (MDA, 4 μ M).

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Imunologia Animal - LIBA/FAVET/UECE (Universidade Estadual do Ceará).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Para o estudo comparativo entre os grupos foi utilizado o teste *t* Student ($p < 0,05$). Todos os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism[®] 5.04.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudar os aspectos da leishmaniose canina continua sendo um desafio para os pesquisadores. Em Fortaleza, existe uma

carência de dados sobre o comportamento imunológico do cão afetado com *L. infantum* e a região metropolitana é uma área endêmica das leishmanioses. Sendo assim, optou-se por investigar o processo inflamatório de cães naturalmente infectados com *L. infantum* que pudesse auxiliar na avaliação da evolução clínica do animal.

A quantidade de leucócitos totais circulantes e neutrófilos é uma das ferramentas para se analisar o processo inflamatório. Nossos dados apresentados nas figuras 1 e 2 demonstram que não houve diferença significativa entre animais soropositivos e soronegativos com relação aos teores de leucócitos e neutrófilos circulantes, respectivamente.

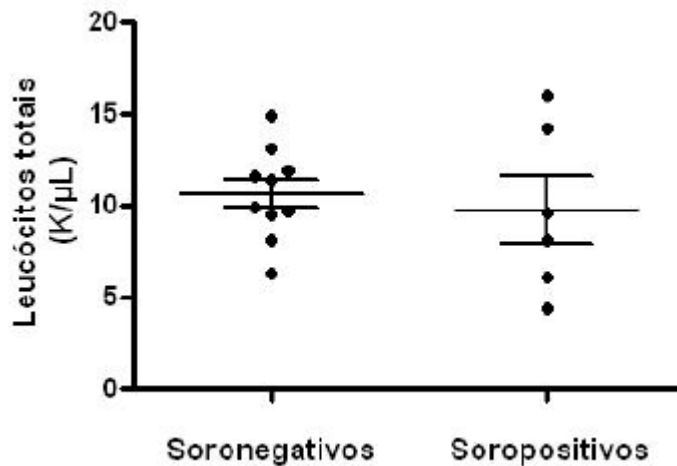


Figura 1. Contagem de leucócitos totais em cães soronegativos e soropositivos para *L. infantum*.

Os valores hematológicos embora sejam limitados no diagnóstico da leishmaniose canina, são de grande utilidade na avaliação do estado clínico do animal e da extensão das lesões existentes,

podendo dar indicações sobre o prognóstico do cão (IKEDA et al., 2002; REIS et al., 2006).

Durante um processo inflamatório vários mediadores são produzidos e

liberados pelas células, como os marcadores do estresse oxidativo, produto da peroxidação lipídica das células e citocinas pró-inflamatórias.

Estas citocinas são responsáveis pela ativação de várias células, incluindo os hepatócitos que produzem as proteínas de fase aguda.

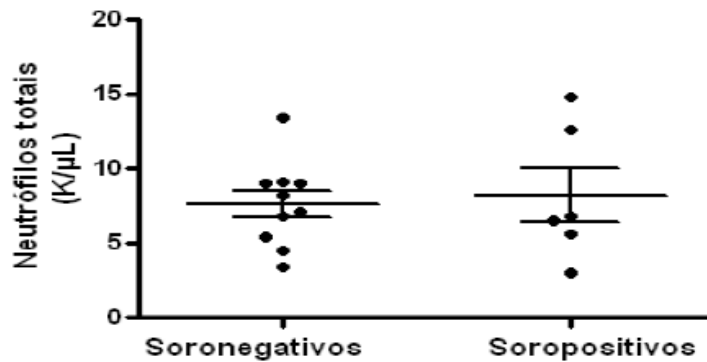


Figura 2. Contagem de neutrófilos em cães soronegativos e soropositivos para *L. infantum*.

A figura 3 apresenta os resultados dos teores de TBARS, método que quantifica espécies reativas ao oxigênio. Os dados dos animais soropositivos apresentaram valores significativamente mais elevados ($p < 0,001$) que os animais do grupo soronegativo, demonstrando que o estresse oxidativo tem participação importante na patogênese da leishmaniose. O teste do TBARS detecta a presença de “burst” oxidativo e é está relacionado com a peroxidação lipídica.

No âmbito veterinário o estresse oxidativo vem sendo correlacionado com diversas enfermidades.

Cães infectados por *Hepatozoon canis*, um parasita intracelular, apresentaram um aumento na produção de

glutathiona e óxido nítrico como resposta à infecção pelo parasita (Kiral et al., 2005), enquanto cães experimentalmente infectados com *Borrelia burgdorferi*, uma espiroqueta causadora da doença de Lyme, apresentaram um aumento na produção de óxido nítrico (HARTER et al., 1999).

Experimentalmente, macrófagos caninos infectados com *L. infantum* apresentaram elevada produção de óxido nítrico (Pinelli et al., 2000), a qual está relacionada com uma baixa carga parasitaria intracelular (Zafra et al., 2008) e que uma falha na produção dessa substância pode levar a um agravamento do quadro clínico do animal.

Estes dados demonstram o papel do óxido nítrico na atividade leishmanicida.

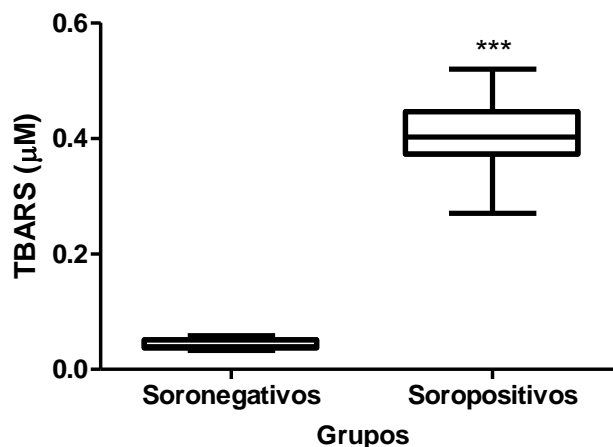


Figura 3. Teores de TBARS em cães soronegativos e soropositivos para *L. infantum*.

*** $p < 0,05$.

O desequilíbrio dos agentes oxidantes e antioxidantes está presente nas diferentes espécies de animais domésticos em diversas situações patológicas, incluindo as doenças infecciosas e parasitárias (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007; WEBB et al., 2008; CELI, 2010; PALTRINIERI et al., 2010). As manifestações da LVC clínica e subclínica revelam diferentes níveis de produção de óxido nítrico, sobretudo nos casos clínicos, onde encontram-se a maior carga parasitária no baço, expressão de moléculas de adesão e produção de óxido nítrico (LIMA et al., 2007; SANTOS et al., 2010).

A figura 4 apresenta os dados dos teores PCR, proteína de fase aguda do

processo inflamatório. Os resultados demonstraram diferença significativa entre os dois grupos, nos quais os soropositivos apresentaram teores desta proteína mais elevados que os animais soronegativos ($p < 0,05$).

Estes dados reforçam a participação das proteínas de fase aguda na patologia demonstrada em cães soropositivos para *L. infantum* e confirmam resultados da literatura (SASANELLI et al., 2007).

As proteínas de fase aguda são importantes marcadores do processo inflamatório, e suas alterações estão associadas a vários processos inflamatórios, inclusive na leishmaniose canina (CERON et al., 2005; MARTINEZ-SUBIELA et al., 2011).

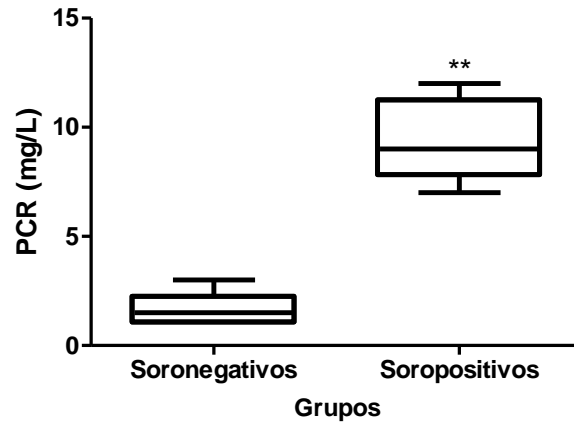


Figura 4. Níveis séricos de proteína C reativa em cães soronegativos e soropositivos para *L. infantum*. * $p < 0,05$.

Os níveis de PCR devem ser interpretados com cautela, uma vez que outros processos patológicos também podem aumentar sua concentração. No entanto, a vantagem de medir a proteína C reativa é a sua grande sensibilidade como marcador da resposta inflamatória

(CERON et al., 2005). Em cães, elevada concentração de PCR tem sido demonstrada em numerosos processos inflamatórios e pode ser usada para monitorar o curso de doenças inflamatórias em cães (PLICKERT et al., 2011).

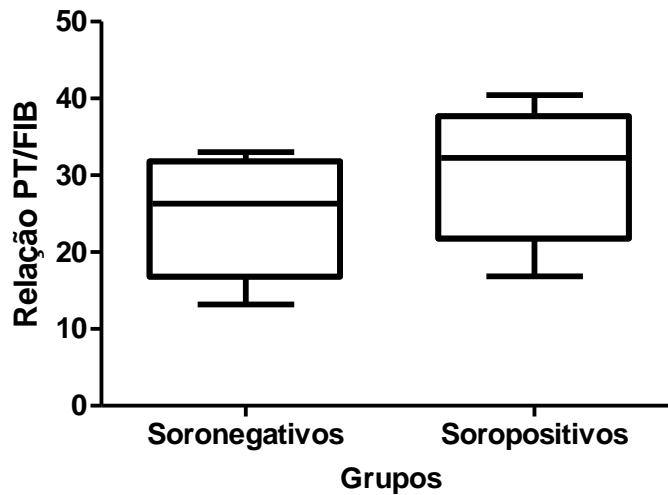


Figura 5. Níveis plasmáticos de fibrinogênio em cães soronegativos e soropositivos para *L. infantum*

Na avaliação do fibrinogênio plasmático, outra proteína de fase aguda, não houve diferença significativa entre os grupos estudados. Os resultados do FIB são expostos em relação aos teores de proteínas totais e amostras apresentando a razão PT/FIB menor que 10:1 é indicativo de fibrinogênio aumentado, sendo assim demonstrados na figura 5. Foram feitas as dosagens de proteínas totais para o cálculo da razão PT/FIB. Não houve alterações nem nos teores de fibrinogênio e nem na relação PT/FIB. Estes dados indicam que o fibrinogênio não estava aumentado nos animais soropositivos para *Leishmania spp.* Dentre as alterações encontradas na leishmaniose destaca-se a hiperproteinemia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (IKEDA et al., 2003; REIS et al., 2006). Os achados bioquímicos na LVC podem estar relacionadas com uma resposta humoral policlonal imunológico, o que leva ao aumento dos níveis de proteína no soro (REIS et al., 2006).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as proteínas de fase aguda e os mediadores do estresse oxidativo podem ser utilizados como marcadores da resposta inflamatória na LVC. Estudos devem ser realizados em relação a progressão da doença e ao aparecimento dos sinais clínicos, em animais naturalmente infectados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGA, E. et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 898-905, 2002.

ASSCHE, T.V. et al. Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51, p. 337-351, 2011.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BILDIK, A. et al. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n.1, p.63-66, 2004.

BRITTI, D. et al. Superoxide dismutase and Glutathione peroxidase in the blood of dogs with Leishmaniasis. **Veterinary Research Communication**, v. 32, n. 1, p. 251-254, 2008.

CAMPOS, E.B.P. & YOSHIDA, W.B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 4, 2004.

CERON, J.J. et al. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p. 85–99, 2005.

CHARMOY, M. et al. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

CHAUDHURI, S. et al. Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 120-124, 2008.

- COSTA-VAL, A.P et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 174, n.3, 636-643, 2007.
- CRNOGAJ, M. et al. Malondialdehyde levels in serum of dogs infected with *Babesia canis*. **Veterinaria Medicina**, v. 55, n. 4, p. 163–171, 2010.
- DROGE W. Free radical in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, n. 1, 2002.
- FREITAS J.C.C. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.
- GONTIJO, C.M.F. & MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
- HARTER, L. et al. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in dogs experimentally infected with *Borrelia burgdorferi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, p. 271-284, 1999.
- JÚNIO, N.F.L. et al. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 115-119, 2015.
- KAYE, P. & SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 9, p. 604-615, 2011.
- KIRAL, F. Dogs with *Hepatozoon canis* respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 15- 21, 2005.
- KJELGAARD-HANSEN, M. Comments on measurement of C-reactive protein in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, p. 402–403, 2010.
- KOHEN, R. & NYSKA, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.
- LASKAY, T. & van ZANDBERGEN. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection promoting factor. **Immunobiology**, n. 213, p. 183–191, 2008.
- LIMA, E.S. & ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- MANDELKER, L. & VAJDOVICH, P. Oxidative Stress in applied basic research and clinical practice. 1ed. New York: Humana Press, 2011, 260p.
- MARQUES, M.I.L.M. *Leishmaniose canina*. 2008. 131p. Dissertacao (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinaria, Universidade Tecnica de Lisboa.
- MARTINEZ-SUBIELA, et al. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 197– 202, 2011.

- MEYER, D.J. & HARVEY, J.W. Veterinary laboratory medicine: Interpretation & Diagnosis. 2a Ed. Editora Saunders Company. p. 87-88, 99-100, 148, 1998.
- MONTEIRO, E.M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Monte Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p. 147-152, 2005.
- NAITO, Y. et al. Oxidative stress markers. **Anti-Aging Medicine**, v. 7, n. 5, p. 36-44, 2009.
- OMS, Organização Mundial da Saúde. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/1/9789241564090_eng.pdf>. Acesso em: 16 de jul. 2014.
- PINELLI, E. et al. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 181–189, 2000.
- PLICKERT, H.D. et al. Evaluation of a point-of-care test for canine C-reactive protein. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 3, p. 384–388, 2011.
- PODINOVSKAIA, M & DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111-119, 2015.
- REILING, L. et al. Overexpression of a single *Leishmania major* gene enhances parasite infectivity in vivo and in vitro. **Molecular Microbiology**, v.76, n.5, p.1175–1190, 2010.
- 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, n. 1, p. 68-75, 2006.
- RITTER, U. et al. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009.
- SANTOS, F.R. et al. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Parasitology Research**, v. 108, n. 6, p. 1397-1403, 2010.
- SASANELLI, M. et al. Acute phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 335–338, 2007
- SEGAL, A.W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review Immunology**, v. 23, p. 197-223, 2005.
- SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.
- SOARES, R. & COSTA, C. Oxidative stress, inflammation and angiogenesis in the metabolic syndrome. 1 ed. Portugal: Springer, 2009. 209p.
- VECINA, J.F. et al. Importância do fibrinogênio plasmático na identificação de processos inflamatórios de cães. **Ciências Veterinárias Tropical**. v. 9, n. 1, p. 31-35, 2006.
- WONG, V.M. et al. Serum C-reactive protein concentrations in healthy Miniature Schnauzer

dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 3, p. 380-383, 2011.

ZAFRA, R. et al. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is

associated with low intracellular parasite burden.

Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 123, p. 353–359, 2008.