

Simpósio Internacional

“Leishmaniose Visceral: Desafios para o Controle no Contexto da Diversidade dos Cenários”



Patologia morfológica e molecular aplicadas à inovação diagnóstica e vigilância da leishmaniose visceral

Morphological and molecular pathology applied to diagnostic innovation and surveillance of visceral leishmaniasis

RIALA6/1762

Juliana Mariotti GUERRA^{1*}, Leonardo José Tadeu de ARAÚJO¹, Rodrigo Albergaria RESSIO², Natália Coelho Couto de Azevedo FERNANDES²

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Patologia Quantitativa, Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, 7º Andar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2874. E-mail: julianaguerra@ial.sp.gov.br, jumariotti.vet@gmail.com

²Núcleo de Anatomia Patológica, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

RESUMO

O conceito de Saúde Única surgiu para ressaltar a união indissociável entre a saúde animal, humana e ambiental. Nesse contexto, a leishmaniose visceral americana (LVA) é considerada uma importante doença de saúde pública no Brasil, devido a sua crescente expansão geográfica e aumento na incidência de casos humanos. A LVA é uma doença parasitária, zoonótica, causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *chagasi*) e transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. Os cães são considerados os principais reservatórios do parasito nas áreas urbanas. O diagnóstico da LVA é baseado em aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. A demonstração da presença do parasito através de exames diretos em tecidos biológicos do hospedeiro é o diagnóstico de escolha, principalmente, em municípios em que a transmissão de LVA ainda não tenha sido confirmada. Diversas metodologias podem ser aplicadas com essa finalidade. O objetivo desse trabalho é apresentar as técnicas citológicas, anatomo-patológicas e moleculares em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina para o diagnóstico da leishmaniose visceral em humanos e cães. Esses dados são complementares à apresentação realizada no I Simpósio Internacional de Leishmaniose Visceral, realizado nos dias 23 e 24 de Abril de 2018, e organizado pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo-SP, Brasil.

Palavras-chave. citologia, imuno-histoquímica, imunocitoquímica, leishmania, cães.

ABSTRACT

The One Health concept emerged to highlight the inseparable link between animal, human and environmental health. In this context, American Visceral Leishmaniasis (AVL) is considered an important public health disease in Brazil, due to its increasing geographic expansion and in the incidence of human cases. AVL is a parasitic and zoonotic disease caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *chagasi*) and transmitted by sandflies of the genus *Lutzomyia*. Dogs are considered the main reservoirs of the parasite in urban areas. The diagnosis of AVL is based on epidemiological, clinical and laboratory aspects. The demonstration of the presence of the parasite through direct examinations in biological tissues of the host is the diagnosis of choice, mainly in municipalities where the transmission of AVL has not yet been confirmed. Several methodologies can be applied for this purpose. The objective of this work is to present the cytological, anatomopathological and molecular techniques in formalin fixed and paraffin embedded samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. These data are complementary to the present study at the First International Symposium on Visceral Leishmaniasis, held on April 23 and 24, 2018, and organized by Adolfo Lutz Institute in São Paulo, Brazil.

Keywords. cytology, immunohistochemistry, immunocytochemistry, leishmania, dogs.

INTRODUÇÃO

Patologia é o ramo da ciência médica responsável pelo estudo das alterações moleculares, funcionais e morfológicas das células, tecidos e órgãos que visa explicar os mecanismos de surgimento e desenvolvimento da doença, podendo ser aplicada na área de pesquisa e de rotina diagnóstica. Nesse último contexto, o profissional especializado analisa as alterações morfológicas celulares a fim de determinar diagnósticos diferenciais das lesões e agrega as informações adicionais obtidas por exames moleculares complementares para a conclusão do caso.

Diversas técnicas podem ser realizadas visando o diagnóstico morfológico e etiológico dos processos patológicos, incluindo a citologia convencional, a citologia em meio líquido e embocado celular, exame necrótico e histopatológico, colorações histoquímicas, imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e exames moleculares em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina. Nesse sentido, atualmente, o Ministério da Saúde¹ (Memorando 480/2013 CGDT/DEVIT/SVS-MS) recomenda o exame citológico convencional (exame parasitológico direto) e o exame imuno-histoquímico como testes de triagem para a confirmação do primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina, sendo parte de um fluxograma para desencadear ações de controle municipais. Portanto, o objetivo deste manuscrito é apresentar essas metodologias diagnósticas que podem ser aplicadas para o aprimoramento diagnóstico da leishmaniose visceral em humanos e em animais.

Citologia convencional

A citologia convencional permite a análise microscópica de células recolhidas de um determinado tecido ou órgão em uma lâmina de vidro. Em casos suspeitos para leishmaniose visceral, essa técnica também pode ser denominada de exame parasitológico direto e o objetivo é detectar estruturas compatíveis com amastigotas de *Leishmania* spp. em esfregaços celulares. Diversas técnicas de coleta e de matriz amostral estão disponíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina.

O método mais comum para coleta de amostras é através da utilização de uma agulha fina que é introduzida no tecido desejado, podendo ser acoplada ou não a uma seringa. As células ascendem pelo canhão

da agulha pela capilaridade ou pressão negativa gerada pela sucção do êmbolo da seringa. Essa técnica pode ser utilizada para aspiração de células representativas de linfonodo, medula óssea, baço, fígado e outros órgãos parenquimatosos, por vezes, com o auxílio de exames de imagem, como a ultrassonografia. As células aspiradas devem ser depositadas sobre uma lâmina de vidro e espalhadas sobre a mesma com o uso de uma outra lâmina de vidro, formando um esfregaço celular em monocamada.

Outras técnicas envolvem a coleta de células, principalmente de mucosas (oral e conjuntival), através do uso de zaragatoas descartáveis e estéreis. O material obtido deve ser depositado com movimentos de rolagem do *swab* sobre a lâmina de vidro. Além disso, técnicas de impressão direta da lâmina de vidro sobre lesões, especialmente ulcerações cutâneas, ou mucosas, podem ser empregadas para o diagnóstico. O raspado cutâneo ou escarificação e deposição do material do bisturi sobre a lâmina de vidro pode ser utilizada em caso de lesões descamativas ou esfoliativas.

As células depositadas sobre a lâmina de vidro, após secas ao ar, devem ser fixadas e coradas. As colorações mais comumente utilizadas são a do tipo *Romanovsky*, como a de panótico rápido. O diagnóstico positivo para leishmaniose ocorre pela identificação de estruturas arredondadas de cerca de 3-5 µm no interior de macrófagos contendo um cinetoplasto.

Entre as vantagens, a citologia convencional é segura e pouco invasiva, permitindo uma detecção rápida e eficaz do processo infeccioso, com baixo custo e de fácil execução. Sua especificidade é de 100%, no entanto, sua sensibilidade pode variar de 30 a 99%, dependendo do tipo de tecido amostrado, carga parasitária e fase clínica da doenças em humanos e animais². Outras desvantagens incluem o grande número de interferentes que podem dificultar a leitura da lâmina como o dessecação e sobreposição celular e contaminação exacerbada por hemácias.

Citologia em meio líquido e embocado celular

A citologia em meio líquido é um método de fixação imediata da amostra citológica em líquido preservativo, com transferência posterior para lâmina por método manual ou automatizado. Este método permite a conservação da morfologia celular por períodos longos (um mês para amostras à temperatura ambiente e três meses para amostras refrigeradas),

possibilitando o envio do material de locais remotos ao laboratório de referência. Outra vantagem da técnica inclui a confecção da lâmina no laboratório de modo padronizado, com distribuição celular uniforme e uma área padronizada da lâmina, além disso permite a utilização da amostra remanescente para execução de métodos complementares, como embocado celular.

Apesar dos bons resultados observados com o uso de citologia em meio líquido para o diagnóstico de linfoma canino, isoladamente, este método não apresentou boa sensibilidade para detecção de amastigotas em amostras nodais. Isto porque, a coloração empregada com este método, a de papanicolaou, não resalta as estruturas intracelulares sugestivas de amastigotas, às quais, podem ser confundidas com o citoplasma celular, além de ocorrer redução importante no tamanho das células e perda da coesão das células. Esses fatores dificultam a leitura da lâmina, principalmente por observadores não acostumados à técnica.

Já, o embocado celular é uma forma de preparação citológica na qual há a transferência de um agregado celular fixado, em um meio líquido, por exemplo, para um cassete histológico que é submetido ao processamento histológico e embocado em parafina. Entre suas vantagens estão a simplicidade e alta reprodutibilidade da técnica, a concentração e maior representatividade amostral, a visualização parcial da arquitetura tecidual, realização de múltiplos cortes histológicos e aplicação de metodologias complementares (coloração de hematoxilina e eosina, imuno-citoquímica e colorações específicas) e a possibilidade de armazenamento da amostra à temperatura ambiente. As desvantagens, em relação à citologia convencional, incluem o maior custo, maior tempo de preparo e redução do tamanho celular³.

Necropsia

A necropsia é um procedimento sistematizado, efêmero, que consiste na avaliação do paciente e de seus órgãos após o óbito. Inicia-se com a avaliação externa do cadáver e continua com a abertura do corpo e análise descritiva de todos os órgãos. Seu método bem estabelecido propicia a colheita adequada das amostras, sem esquecimentos, além de garantir uma descrição fidedigna.

Os achados macroscópicos podem ter papel definitivo na conclusão da causa de morte, muitas vezes sendo suficientes para a conclusão do caso. Entretanto, na leishmaniose visceral canina (LVC), o

amplo espectro de alterações apresentados pelos cães⁴, torna o diagnóstico complexo e desafiador para o médico veterinário, e exige a associação com achados microscópicos, exames sorológicos e moleculares para definição etiológica acurada.

Classicamente, a leishmaniose em cães apresenta sinais inespecíficos como apatia, hipertermia, perda de peso, alterações de apetite, astenia, linfadenomegalia localizada ou generalizada, lesões dermatológicas, diarreia, falência renal, ceratoconjuntivite, epistaxe, anemia e onicogrifose⁵. Histologicamente, os achados também são variáveis e afetam diversos órgãos, sendo que as principais lesões ocorrem nos órgãos mais ricamente parasitados como baço, fígado, linfonodos, medula óssea e a pele.

As lesões cutâneas são frequentemente relatadas e incluem, dermatite esfoliativa seca, alopecia, hipotricose, crosta, eritema, despigmentação, hiperpigmentação, hiperqueratose e úlceras, localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações⁶. Em trabalhos realizados pelo nosso grupo, esplenomegalia foi o principal achado macroscópico, seguido pelas lesões cutâneas e onicogrifose, conforme ilustrado na **Figura**.

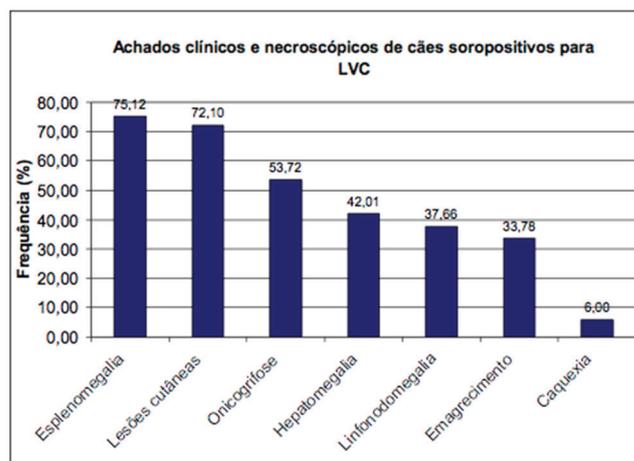


Figura. Frequência de achados clínicos e necroscópicos de cães soropositivos para Leishmaniose Visceral Canina. Votuporanga, 2018

Em humanos, a doença também apresenta variedade de sinais, os quais incluem hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, febre, inapetência, diarreia e vômito, tornando o diagnóstico desafiador e exigindo o emprego de métodos complementares para confirmação⁷.

Histopatologia e colorações histoquímicas

A LVA é caracterizada por alterações multissistêmicas em humanos e em cães, devido a um comprometimento progressivo do sistema mononuclear fagocitário, com hipertrofia e proliferação de macrófagos. Os órgãos mais severamente comprometidos como baço, linfonodos, medula óssea e fígado revelam um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário e plasmocítico, muitas vezes, com a formação de esboços granulomatosos ou piogranulomatosos. Nesses casos, também se observa uma reatividade do interstício dos diferentes tecidos, com um aumento dos componentes fibrilares e da matriz extracelular. Estruturas redondas a ovaladas, com 2 a 4 µm de diâmetro com um cinetoplasto alongado, geralmente posicionado perpendicularmente ao núcleo, são compatíveis com amastigotas e podem ser observadas no interior de macrófagos (e ocasionalmente, em outros leucócitos, células endoteliais, fibroblastos e até algumas células neoplásicas).

Em estudo realizado por nosso grupo, de 14 cães diagnosticados com leishmaniose visceral, 85,71% dos casos apresentou o fígado com hepatite granulomatosa multifocal. Frequentemente, observou-se destrabeculação hepatocitária e aumento de neutrófilos circulantes nos sinusóides. O infiltrado inflamatório exibiu distribuição portal a médio-zonal, principalmente composto por macrófagos, linfócitos e neutrófilos, por vezes formando esboços granulomatosos. Em quatro casos, foi possível a distinção de amastigotas no interior de histiócitos. Outro achado, menos frequente, foi a degeneração macro e microgoticular de hepatócitos.

Todos os cães apresentaram pelo menos uma alteração microscópica em baço, sem incluir congestão, a qual foi desconsiderada devido ao método empregado de eutanásia. Os achados incluíram histiocitose em 71,43% dos animais avaliados, hiperplasia de polpa branca (35,71%), hematopoiese extramedular esplênica, caracterizada predominantemente por trombopoiese (25,7%) e esplenite aguda, com infiltrado neutrofilico (21,43%). A intensidade dos achados era variável, com cães exibindo discreta expansão de polpa branca a outros em que a expansão era tão intensa, que havia uma coalescência de células linfóides.

Doze (85,71%) cães apresentaram infiltrado inflamatório dermal, composto por celularidade mista de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. Este infiltrado localizava-se principalmente ao redor

de anexos cutâneos, com aumento de marginação leucocitária em vasos. Observou-se também hiperqueratose em parte das peles avaliadas e distinção dos amastigotas em 50% dos casos.

O rim foi importante sítio de lesões, com presença de nefrite intersticial crônica multifocal com intensidade variável, composta por infiltrado linfo-plasmocítico, predominantemente, em 78,57% dos casos. Ainda, 50% dos cães exibiram glomerulonefrite membrano-proliferativa, com espessamento segmentar a global de cápsula de Bowmann, afetando principalmente folheto parietal.

Os linfonodos apresentaram hiperplasia linfóide pronunciada, principalmente de região paracortical (71,43%). Frequentemente, os seios medulares estavam repletos por infiltrado de plasmócitos, com muitas células de Mott em alguns casos, e histiócitos, por vezes repletos de hemossiderina. A cápsula do linfonodo apresentava-se espessa, com infiltração de linfócitos dispersa.

Nove casos (64,29%) apresentaram pneumonia intersticial septal, com infiltrado de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, com reatividade e hiperplasia de BALT. Ainda, observou-se miocardite crônica, rendilhamento de cardiomiócitos e aumento da circulação de neutrófilos. Lesões musculares como miosites mononucleares, mionecrose e fibroses também são descritas. Alterações oftalmológicas com infiltrado inflamatório em conjuntiva, limbo, corpo ciliar, íris, córnea e esclera também são bastante frequentes. Ao contrário dos relatos de meningoencefalite, vasculites e mielites no sistema nervoso central, que são raros.

Os cães apresentam frequentemente lesões cutâneas associadas a LVA. Essas lesões são caracterizadas por dermatite granulomatosa, piogranulomatosa ou plasmocítica com padrão perivascular, perifolicular ou intersticial, superficial ou profunda, nodular a difusa. Úlceras, hiperqueratose ortoqueratótica, queratose folicular, hiperplasia e acantose epidérmica com exocitose leucocitária também podem ser observadas.

Alterações em medula óssea são frequentes em humanos e cães, sendo caracterizadas por aumento na quantidade de macrófagos, com frequente parasitismo. Hipocelularidade granulocítica, com bloqueio de promielócitos, e eritrocítica relativa são frequentes².

As colorações histoquímicas de Giemsa (mistura de azul de metileno, eosina e Azur B) e de Leishman (que emprega metanol, azul de metileno e

eosina) podem evidenciar os parasitas no interior dos macrófagos e facilitar o diagnóstico microscópico.

Imunocitoquímica e imuno-histoquímica

A imunocitoquímica e a imuno-histoquímica consistem em reações específicas de pesquisa de antígenos teciduais ou celulares através de anticorpos conjugados com substâncias que permitam reação cromogênica e avaliação por microscopia óptica. Ambos os métodos são semelhantes tecnicamente, diferindo apenas na amostra em que a técnica será aplicada: a primeira em amostras citológicas e a segunda em histológicas.

Para leishmaniose, ambas são utilizadas em conjunto com a avaliação histológica ou do esfregaço, permitindo a confirmação etiológica de amastigotas suspeitas na avaliação por HE, além de evidenciar a presença dos mesmos quando são escassos.

Trata-se de método gênero específico, ou seja, não permite a distinção da espécie de *Leishmania* envolvida e permite a detecção das amastigotas com sensibilidade e especificidade de 60 a 70%⁸. A imuno-histoquímica oferece um aumento quantitativo na detecção da forma amastigota da *Leishmania* sp em diversos órgãos, bem como aumento de 50% de positividade na pele, quando comparada aos testes histopatológicos de rotina⁸, além de diminuir as reações cruzadas com outros tripanossomídeos.

Em estudo realizado por nosso grupo⁹, com avaliação necroscópica, histológica e imuno-histoquímica de 134 cães com LVC diagnosticada por métodos sorológicos, em Votuporanga, São Paulo, ficou demonstrado que a imuno-histoquímica dos órgãos obteve sensibilidade de 98,51% e especificidade de 100%. O principal órgão com positividade foi o baço, com detecção de amastigotas em 78,79% dos casos, seguido pelo linfonodo poplíteo⁹.

Ressaltamos a importância da avaliação conjunta de mais de um órgão, com especial atenção ao baço, linfonodo, fígado e pele com lesão, visto que a sensibilidade alta foi alcançada com a análise de múltiplas vísceras simultâneas. Também observamos que mesmo em tecidos sem alterações notáveis na macroscopia e sem distinção de amastigotas na avaliação do HE, a *Leishmania* pode ser detectada pela imuno-histoquímica. Isto, muitas vezes mostra, que as estruturas parasitárias podem ser obscurecidas pelo processo inflamatório ou a densidade parasitária sr

baixa, o que dificulta sua observação.

Em decorrência dos resultados positivos obtidos por este método, a imuno-histoquímica foi incluída no fluxograma ministerial¹ (Memorando 480/2013 CGDT/DEVIT/SVS-MS), para determinação do primeiro caso canino autóctone para leishmaniose visceral do município e desencadeamento de medidas de vigilância e controle.

Hibridização *in situ*

A Hibridização *in situ* (ISH) é uma técnica pela qual se identificam sequências específicas de nucleotídeos em células ou cortes histológicos. Devido à sua alta especificidade, a hibridização *in situ* também tem sido utilizada para o diagnóstico da LVC em tecidos de biópsia fixados em formalina e emblocados em parafina^{10,11}. Já foi descrito na literatura que a ISH apresenta desempenho comparável¹⁰ ou superior¹² ao da IHQ no diagnóstico da LVC. Além disso, ao contrário do que ocorre na histopatologia e na IHQ, a ISH permite discriminar a *Leishmania* (*L.*) *infantum* (syn. *chagasi*) das outras espécies de *Leishmania*¹⁰.

Essa metodologia também pode ser utilizada em alternativa aos métodos de referência para a identificação das espécies de *Leishmania*, como a cultura parasitológica, seguida por eletroforese de enzima multilocus - MLEE, e reação em cadeia da polimerase - PCR). No entanto, a ISH é menos sensível apenas quando comparada com a essas técnicas aplicadas à amostras de pele congeladas e com alguns ensaios sorológicos. Estas metodologias também apresentam desvantagens em seu uso para o diagnóstico da LVC. A cultura parasitológica leva de 5 a 30 dias (em média 15 dias) para ser realizada e o número de centros de referência que utilizam a MLEE é restrito, sem levar em consideração a probabilidade de contaminação microbiológica, quando as amostras são coletadas em campo, sem condições adequadas de esterilidade. As desvantagens da PCR estão na falta de padronização entre os diferentes protocolos utilizados entre os laboratórios, a possibilidade de contaminação e no fato de que um resultado positivo não necessariamente indica infecção com *Leishmania* viva¹⁰. Por último, os ensaios sorológicos podem resultar em falsos-positivos devido à reações cruzadas com o soro de cães infectados com *L. brasiliensis*, *T. cruzi*, *T. caninum* e *Ehrlichia canis*¹³. De forma semelhante à PCR, um resultado positivo não necessariamente indica infecção

atual e não diferencia resultados positivos devido à reação vacinal¹⁰. Neste contexto, as principais vantagens da ISH sobre a cultura parasitológica, PCR, métodos sorológicos, no diagnóstico LVC está no fato de que ela possibilita a visualização simultânea dos amastigotas intactas no tecido preservado. A observação dos amastigotas possibilita correlacionar os parasitas com as lesões associadas e, também, semi-quantificar a carga parasitária^{10,11}.

Outras técnicas moleculares

Diversas outras técnicas moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou em tempo real, MLEE, nested-PCR, amplificação aleatória do ácido desoxirribonucleico (DNA) polimórfico, sequenciamento convencional ou em larga escala, entre outras, podem ser aplicadas em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina para o diagnóstico e tipificação de casos suspeitos para infecção por *Leishmania* spp.

A etapa crucial para a aplicação de tais técnicas é a extração do material genético. Nesse sentido, a utilização de tecidos parafinados para as análises moleculares possui alguns pontos críticos que podem influenciar no sucesso das amplificações posteriores, devido ao processamento histológico do material. Dentre essas etapas podemos citar o tempo de pré-fixação (tempo decorrido entre a coleta do tecido e o início da fixação), tempo e tipo de fixador utilizado, necessidade de descalcificação, tempo e temperatura do processamento histológico. Por isso, é necessário um protocolo de extração específico de macromoléculas de amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, visando um melhor aproveitamento do processo para obtenção de material genético em boa quantidade e de boa qualidade¹⁴.

Dessa forma, as inovações tecnológicas e metodológicas dos últimos tempos criaram novas possibilidades de uso para os tecidos parafinados; além dos estudos histomorfológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos, essas amostras passaram a ser também fonte de material para a pesquisa e rotina diagnóstica através dos métodos em biologia molecular.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância e Saúde, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Memorando nº 480/2013 – CGDT/Devit/ SVS-MS. Algoritmo para confirmação de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina. Brasília (DF): MS; 2013.
2. Laurenti, MD. Patologia e patogenia das Leishmanioses. [tese de livre-docência]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/livredocencia/10/tde-26112010-105228/es.php>
3. Fernandes NC, Guerra JM, Réssio RA, Wasques DG, Etlinger-Colonelli D, Lorente S et al. Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples. *Vet Comp Oncol*. 2016; 14 Suppl 1:107-16. <http://dx.doi.org/10.1111/vco.12137>
4. Esteve LO, Saz SV, Hosein S, Solano-Gallego L. Histopathological findings and detection of Toll-like recepto 2 in cutaneous lesions of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2015;209(3-4):157-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.004>
5. Ikeda-Garcia FA, Marcondes M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clin Vet*. 2007;12(71):34-42. Disponível em: <https://issuu.com/clinicavet/docs/clinica-veterinaria-n71>
6. Ciaramella P, Olivia G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. 1997;141(21):539-43.
7. Oliveira J M, Fernandes AC, Dorval ME, Alves TP, Fernandes TD, Oshiro ET et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(2), 188-93. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000200016>

8. Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, de Melo MN, Michalik MS. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*;292(1-2):17-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2004.05.009>
9. Guerra JM, Fernandes NCC, Kimura LM, Shirata NK, Magno JA, Abrantes MF et al. Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2016;75:1686. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial75_completa/artigos-separados/1686.pdf
10. Menezes RC, Figueiredo FB, Wise AG, Madeira MF, Oliveira RV, Schubach TM et al. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. *J Clin Microbiol*. 2013;51(1):206-11. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02123-12>
11. Dinhopf N, Mostegl MM, Richter B, Nedorost N, Maderner A, Fagner K et al. In situ hybridisation for the detection of *Leishmania* species in paraffin wax-embedded canine tissues using a digoxigenin-labelled oligonucleotide probe. *Vet. Rec*. 2011;169(20):525. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.d5462>
12. Furtado MC, Menezes RC, Kiupel M, Madeira MF, Oliveira RV, Langohr IM et al. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2015 Dec;8(1):620. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1224-4>
13. Barros JH, Almeida AB, Figueiredo FB, Sousa VR, Fagundes A, Pinto AG et al. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(7):419-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.03.014>
14. Scorsato AP, Telles JEQ. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47(5):541-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442011000500008>