

**NEUTROFILIA E HIPOALBUMINEMIA EM SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *LEISHMANIA INFANTUM***  
(*Neutrophilia and hypoalbuminemia in peripheral blood of dogs naturally infected by Leishmania infantum*)

Emmanuel Teles Sales<sup>1</sup>; Gian Karlo Gama de Almeida<sup>1</sup>; Ana Raquel Fontenele de Oliveira<sup>1</sup>; Tarssila Mara Vieira Ferreira<sup>1</sup>; José Claudio Carneiro Freitas<sup>1</sup>; Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal, Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Av. Dr. Sílas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE. CEP:60.714-903.

**RESUMO**

O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil leucocitário e proteico de cães, naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Para tanto, foram realizados exame parasitológico de punção de medula e PCR em amostras de pele para identificação de *Leishmania spp.* e avaliação de sinais clínicos e dermatológicos, para categorizar e distribuir cães em três grupos: grupo controle (GC); grupo positivo assintomático (GA) e grupo positivo sintomático (GS). Amostras de sangue foram coletadas para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. As principais manifestações clínicas observadas no GS foram alopecia, onicogribose, ceratoconjuntivite e dermatites eritematosas, esfoliativas e ulcerativas. Os animais com a forma visceral (LVC) apresentaram alterações hematológicas significativas, compatíveis com descrições da literatura, com leucocitose significativa ( $p < 0,05$ ) do GS e do GA quando comparados ao GC, além de anemia no GS e GA, em relação ao GC. Também foram observadas hiperproteinemia, hipergamablobulinemia e hipoalbuminemia significativas em GS, quando comparadas aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). A contagem diferencial leucocitária apontou para uma neutrofilia e linfopenia significativas do GS, quando comparadas aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), estando este resultado confirmado pela razão neutrófilo:linfócito aumentada ( $p < 0,05$ ). Ressalta-se um aumento de neutrófilos segmentados maduros no Leucograma, mas sem alterações significativas nos neutrófilos imaturos. Animais naturalmente infectados por *L. infantum* apresentaram leucocitose com neutrofilia e hipoalbuminemia características de alterações sistêmicas associadas a um processo inflamatório. Contudo, faz-se necessária uma investigação mais aprofundada, com um maior número de animais e com acompanhamento da LVC para avaliar a participação dos neutrófilos imaturos neste processo.

**Palavras-chave:** *Leishmania infantum*, Leishmaniose Canina, leucócitos, albumina, inflamação.

Endereço para correspondência:  
diana.pinheiro@uece.br

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the leukocyte and protein profile of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. For that, a bone marrow parasitological test and PCR were performed to identify *Leishmania spp.* Evaluation of clinical and dermatological signs was used to categorize and distribute dogs in three groups: control group (CG); asymptomatic group (AG) and symptomatic group (SG). Blood samples were collected for evaluation of hematological and biochemical parameters. The main clinical manifestations observed in SG were alopecia, onychogryphosis, keratoconjunctivitis and dermatitis. Leukocytosis and anemia were observed in SG and AG ( $p < 0.05$ ) when compared to CG. In SG were detected hyperproteinemia with hyperglobulinemia and hypoalbuminemia when compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). The differential leukocytes count indicated neutrophilia and lymphopenia in SG when compared to AG and CG ( $p < 0.05$ ), and this result was confirmed by a neutrophil:lymphocyte ratio which was increased ( $p < 0.05$ ). We highlight an increase of mature segmented neutrophils in GS, but there is no change in immature neutrophils. Thus, animals naturally infected by *L. infantum* presented leukocytosis with neutrophilia and hypoalbuminemia characteristic of systemic changes associated to inflammatory process. However, a more in-depth investigation with a larger number of animals and earlier follow-up of CanL animals is necessary to evaluate the participation of immature neutrophils in this process.

**Keywords:** *Leishmania infantum*, Canine leishmaniasis, leukocytes, albumin, inflammation, sintomatologia ainda não seriam bem conhecidos.

## INTRODUÇÃO

As Leishmanioses seriam zoonoses, desencadeadas por protozoários do gênero *Leishmania spp.*, sendo de grande importância principalmente para a saúde pública. Nas zonas urbanas, o cão seria considerado o principal reservatório da afecção (MAIA *et al.*, 2013) e, quando acometido pela forma visceral (LVC), poderia apresentar um amplo espectro de respostas (FERREIRA *et al.*, 2016); porém, os fatores que levariam ao exacerbamento ou controle dessa

Durante a infecção, as células do sistema monocítico fagocitário atuam como apresentadoras de antígenos, que poderiam estimular uma resposta dos linfócitos TCD4+ (BANETH *et al.*, 2008), com ativação de macrófagos produtores de óxido nítrico, responsável pela destruição intracelular de *Leishmania spp.* (IKEDA *et al.*, 2003). Além dos macrófagos, os neutrófilos seriam células de grande importância para o processo de infecção, tanto diretamente (sendo recrutadas ao sítio de infecção), podendo eliminar o parasita por fagocitose, por liberação de espécies reativas de oxigênio e pelas armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs)

(KRUGER *et al.*, 2015), como indiretamente (nas funções de ativação e regulação das células do sistema imune inato e adaptativo) (MANTOVANI *et al.*, 2009). Nas infecções por *Leishmania* spp., em geral, seriam especialmente importantes, por serem as primeiras células a serem recrutadas ainda nas primeiras horas após a infecção, como no caso de infecção por *L. infantum* (THALHOFER *et al.*, 2011).

Estudos recentes do perfil neutrofilico em humanos diagnosticados com Leishmaniose Visceral (LV) demonstraram alterações, tanto na sua função, como em seu estágio de maturação; sendo, então, potencialmente determinantes na severidade da infecção (YIZENGAW *et al.*, 2016). Também foi reportado, em casos humanos de Leishmaniose Cutânea (LC), que os neutrófilos teriam uma participação mais importante em influenciar o estado inflamatório sistêmico dos pacientes, através da produção de mediadores inflamatórios, do que através de destruição direta do parasita (CONCEIÇÃO *et al.*, 2016) e na infecção experimental de camundongos com *L. amazonense* também foi investigado o papel e o perfil dos neutrófilos, durante a infecção (SOUSA *et al.*, 2014). Nesse sentido, estudos sobre o perfil leucocitário/neutrofilico e bioquímico na inflamação sistêmica

provocada em cães na Leishmaniose Visceral ainda não foram relatadas. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi caracterizar o perfil leucocitário e proteico em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará, sob protocolo nº 6508268/2016.

### População do estudo

Amostras de sangue de 33 cães adultos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses em Fortaleza (Ceará, Brasil), foram incluídas nesse estudo. O diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) foi baseado no teste rápido DPP LVC Bio-Manguinhos<sup>®</sup>, associado ao teste sorológico ELISA e PCR para *L. infantum* em amostras de pele obtidas por biópsia. Punção aspirativa de medula óssea foi realizada, para pesquisa parasitológica. Os cães ( $n = 33$ ) naturalmente infectados por *L. infantum* foram divididos com base na presença ou ausência de alterações clínico-dermatológicas em: um grupo assintomático (GA,  $n = 10$ ) e outro grupo, sintomático (GS,  $n = 23$ ), sendo consideradas alterações clínicas relevantes para a inclusão dos animais aquelas

características da infecção, tal como: caquexia, onicogribose, alopecia, dermatites, ceratoconjuntivites, entre outras. Cães sem manifestações clínico-dermatológicas e que apresentaram resultados negativos nesses testes foram considerados como sendo não infectados e incluídos como o grupo controle (GC,  $n = 5$ ).

### **Coleta de amostras de sangue e Análises hematológica e bioquímica**

Amostras de sangue (10 mL) foram coletados dos diferentes grupos, através de venopunção da jugular com seringa estéril. Desse total, 5 ml de sangue foram colocados em tubo de coleta contendo anticoagulante EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), para serem destinados a uma avaliação hematológica e outros 5 mL em tubo de coleta sem anticoagulante, para a avaliação bioquímica. As amostras foram então centrifugadas, para obtenção do soro, que foram aliqüotadas e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise bioquímica. Os resultados dos exames hematológico e bioquímico foram comparados aos valores de referência para a espécie canina.

As amostras de sangue coletadas em frascos com EDTA foram conduzidos ao laboratório de Patologia Clínica da FAVET-UECE, para avaliação dos

parâmetros hematológicos em aparelho de automação: contagem total de hemácias, hematócrito (HCT, %), contagem de Leucócitos totais (LT,  $\text{mm}^3$ ) e diferencial de leucócitos, e contagem de plaquetas (PLT,  $\text{mm}^3$ ). Foram realizados esfregaços de sangue das amostras, para contagem diferencial dos leucócitos e avaliar o perfil neutrofílico desses animais.

Das amostras de soro de cães coletados em tubos sem EDTA, foram avaliados os níveis de proteína total sérica (TPS, g/dL), albumina (Alb, g/dL) e globulina (Glob, em g/dL); A dosagem sérica foi realizada por sistema automatizado (Konelab 60i) utilizando kits comerciais específicos (Wiener Lab<sup>®</sup>), de acordo com a metodologia do fabricante.

### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico computacional GraphPadPrism 7.0. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos ao teste de Grubbs e Kolmogorov para determinar a homocedasticidade dos dados. As alterações clínicas observadas foram expressas em percentagem. Para as análises hematológicas e bioquímicas foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. Em todos os

casos, significância foi definida em  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as principais alterações sintomatológicas observadas nos cães podem ser citadas: onicogribose em 91,3% dos animais ( $n=21$ ), conjuntivite em 34,7% ( $n=8$ ), além de alguma forma de outras lesões dermatológicas, variando de leve a severa, em 60,8% ( $n=14$ ). Dentre essas outras alterações dermatológicas, pode-se observar alopecia/hipotricose em 56,5% dos animais ( $n=13$ ), lesões ulcerativas em 17,3% ( $n=4$ ) e dermatopatias em 43,4% ( $n=10$ ). Também foram observadas lesões em ponta de orelha, em 21,7% dos animais ( $n=5$ ). Essas alterações clínicas e dermatológicas estão de acordo com a literatura que apontaria uma evolução sintomatológica, à medida que houvesse o aprofundamento e cronicidade da infecção (SILVA *et al.*, 2015).

As alterações hematológicas encontram-se na Tab. 1. Os leucócitos totais (LT) sofreram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em GA, quando comparado ao controle, apontando um quadro de leucocitose. Por outro lado, GS manteve-se semelhante ao GC. Esse achado de leucocitose em animais acometidos por LVC estaria respaldado em literatura prévia (JAFARI *et al.*, 2006), embora nem

sempre esta alteração fosse observada (FREITAS *et al.*, 2012). Verificou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no hematócrito (HCT), nos grupos com Leishmaniose, em relação ao controle. Uma alteração comumente relatada na LV seria uma anemia; podendo estar, inclusive, relacionada com o estágio da infecção (DIAS *et al.*, 2009). Apesar das plaquetas encontrarem-se reduzidas em GS e GA quando comparadas ao GC, nestes grupos as plaquetas encontram-se dentro dos níveis de normalidade da espécie. Tem sido relatado que, nos quadros mais avançados da infecção por LV, haveria uma tendência a diminuição da contagem plaquetária (contagens inferiores a  $150.000/\text{mm}^3$ ) (DUARTE *et al.*, 2009).

Com relação aos parâmetros proteicos, a proteína total sérica (TPS) do GS ( $8,34 \pm 0,72$ ) apresentou aumento significativo, quando comparada aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), bem como a globulina estava significativamente superior no GS ( $6,15 \pm 1,06$ ) ( $p < 0,05$ ). A albumina sérica nos animais do GS ( $2,09 \pm 0,60$ ) encontrava-se inferior ( $p < 0,05$ ) ao GC ( $3,19 \pm 0,28$ ).



**Tabela 1:** Análises hematológica e proteica em cães naturalmente infectados por *L. infantum*

Parâmetros	Cães soronegativos (GC, n=4)	Cães soropositivos/PCR+	
		Assintomáticos (GA, n=8)	Sintomáticos (GS, n=25)
Leucócitos totais ( $\times 10^3/L$ )	9,1 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	13,35 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	14,2 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>
HCT (%)	46,0 $\pm$ 4,39 <sup>a</sup>	37,66 $\pm$ 3,40 <sup>b</sup>	35,38 $\pm$ 5,27 <sup>b</sup>
PLT ( $\times 10^3/L$ )	311,0 $\pm$ 37,9 <sup>a</sup>	178,6 $\pm$ 124,1 <sup>b</sup>	233,3 $\pm$ 150,9 <sup>ab</sup>
PTS (g/dL)	7,13 $\pm$ 0,65 <sup>ab</sup>	6,5 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	8,45 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>
Albumina (g/dL)	3,19 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	2,64 $\pm$ 0,52 <sup>ab</sup>	2,19 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>
Globulina (g/dL)	3,93 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	3,86 $\pm$ 1,47 <sup>a</sup>	6,05 $\pm$ 1,04 <sup>b</sup>
A/G	0,67 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,71 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	0,28 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>

LT: Leucócitos totais; HCT: hematócrito; PLT: plaquetas; PT: Proteínas totais do soro; PCR: Reação em cadeia da polimerase para *L. infantum*. Letras diferentes na mesma linha denotam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Dessa forma, o presente estudo observou um aumento dos níveis de proteína total e globulina, associado a uma diminuição nos níveis de albumina sérica. Esse aumento das proteínas totais do plasma e presença de hiperglobulinemia seria considerado como uma das alterações mais comuns na LVC; estando, possivelmente, associado ao aumento dos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, principalmente em estágios mais crônicos da infecção (CIARAMELLA e CORONA, 2003). Contudo, a hipoalbuminemia observada nos animais se deveria, provavelmente, à

migração da albumina para o meio extravascular, com formação de edema, alteração clínica bastante comum na LVC (KUMAR *et al.*, 2016). Nossos dados reforçam o comprometimento proteico, com redução ( $p < 0,05$ ) da relação albumina:globulina nos animais do grupo sintomático (GS) e, conseqüentemente, indicam um quadro inflamatório. A albumina é uma proteína transportadora encontrada em grande quantidade no plasma e que devido ao aumento da permeabilidade vascular induzida por mediadores químicos na presença de um

estímulo por patógenos ou danos teciduais acumula-se nos tecidos provocando o edema (MEYER *et al.*, 1995). Este dado na clínica veterinária poderá ser um indicativo de reposição de albumina para melhora do quadro clínico animal.

A contagem diferencial dos leucócitos do sangue periférico está representada na Fig. 1. Os dados desse trabalho demonstraram um aumento significativo na contagem de neutrófilos superior em animais do GS, em relação aos GA e GC ( $p < 0,05$ ). Estudos prévios sugeririam que a contagem diferencial leucocitária não variaria significativamente

com o estágio clínico da infecção (AMUSATEGUI *et al.*, 2003). Valeria ressaltar que a neutrofilia era acompanhada de linfopenia no GS, quando comparado aos demais grupos. Esses achados estão de acordo com estudos prévios em quadros característicos de Leishmaniose (BOGDAN *et al.*, 2001; JAFARI *et al.*, 2006). Por fim, a análise neutrofilica, realizada em todos os grupos testados, não resultou em alterações significativas quanto ao estágio de maturação dos neutrófilos, estando todos os grupos com resultados semelhantes, quanto à contagem de neutrófilos maduros.

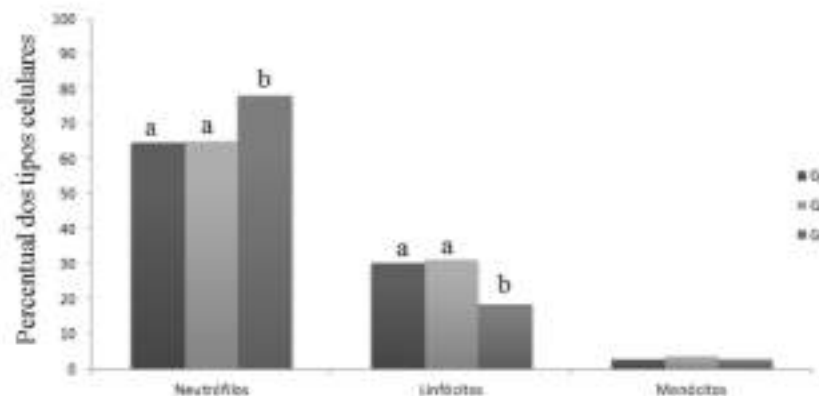


Figura 1: Contagem diferencial entre os leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos nos grupos controle (GC), assintomático (GA) e sintomático (GS).

Letras diferentes (a) e (b) denotam diferença significativa entre os grupos avaliados ( $p < 0,05$ ).

Os neutrófilos imaturos eram raros e encontravam-se dentro da normalidade para a espécie e sem diferenças entre os grupos (Fig. 2). Foi observada, no entanto, uma tendência a um aumento na contagem de neutrófilos

segmentados e hipersegmentados em animais do GS, mas sem diferença significativa. Para se verificar a influência da neutrofilia sobre a linfopenia, foi analisada a relação neutrófilos:linfócitos (Fig. 3), a qual estava elevada ( $p < 0,05$ ) no

GS em relação a GC e GA. Estes dados reforçam um quadro inflamatório na Leishmaniose, além de apontar para a importância desta célula neste quadro

infeccioso, as quais são apontadas no sítio da infecção como “cavalo de Tróia” (JOCHIM & TEIXEIRA, 2009).

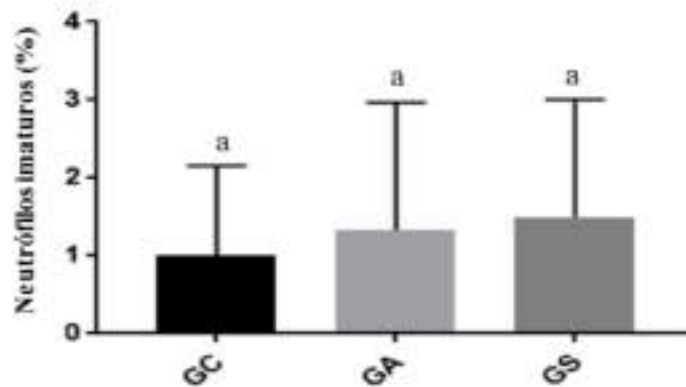


Figura 2: Percentagem de neutrófilos imaturos nos grupos controle (GC), assintomático (GA) e sintomático (GS) para Leishmaniose canina.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados ( $p < 0,05$ ).

De um modo geral, a literatura sempre apontou a existência de uma alteração do perfil leucocitário em pacientes com Leishmaniose Visceral (MUSUMECI *et al.*, 1978). Além de ter seus números totais comprometidos, seria argumentado que os neutrófilos poderiam ter sua função na infecção por Leishmaniose diminuída, devido a um bloqueio no CD10, presente na superfície dos neutrófilos e que regulariam seus

processos inflamatórios e quimiotáticos (ELGHETANY, 2002). Estudos recentes em humanos apontariam a LV associada com quadro de aumento na ativação neutrofílica, além de um aumento na frequência de neutrófilos imaturos e uma diminuição na efetividade de suas funções, o que poderia caracterizar a importância neutrofílica na severidade da infecção (YIZENGAW *et al.*, 2016).



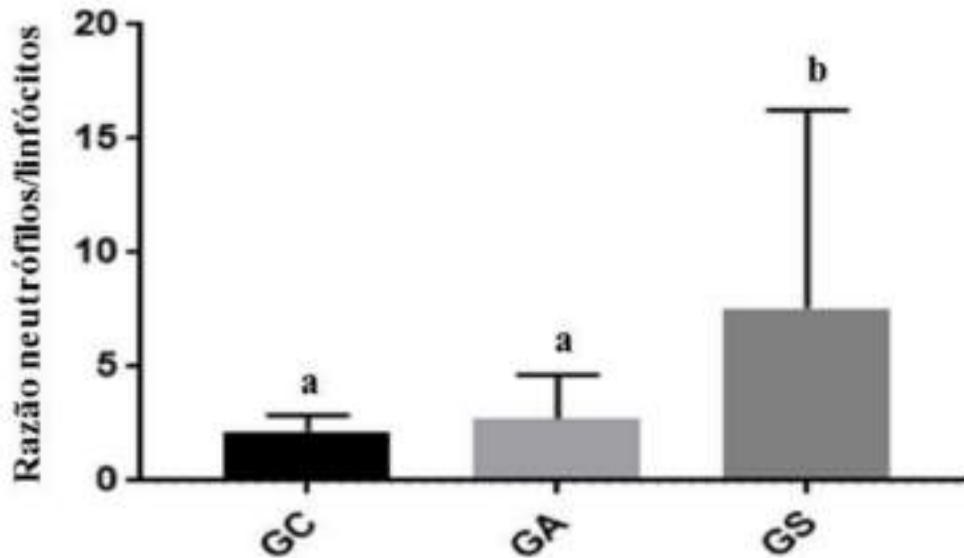


Figura 3: Razão entre neutrófilos e linfócitos nos grupos controle (GC), assintomático (GA) e sintomático (GS).

Letras diferentes denotam diferença significativa entre os grupos avaliados ( $p < 0,05$ ).

Em resumo, foram observados neutrofilia e linfopenia significativa do GS quando comparado ao GA, em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas no tocante ao estágio de maturação entre os grupos. Vale ressaltar que, no presente estudo, os animais não tinham histórico prévio de exames, o que dificulta o acompanhamento por estadiamento dessas alterações leucocitárias.

## CONCLUSÃO

Animais naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam alterações sistêmicas manifestadas por leucocitose

com neutrofilia e hipoalbuminemia características de alterações sistêmicas associadas a um processo inflamatório. Contudo, faz-se necessária uma investigação mais aprofundada, com um maior número de animais e com acompanhamento da LVC, para avaliar a participação dos neutrófilos imaturos neste processo.

## REFERÊNCIAS

AMUSATEGUL I.; SAINZ A.; RODRIGUEZ F.; TESOURO M. A.; Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*, v.18, p.147-156, 2003.

- BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. CANINE leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, v.24, n.7, p.324-330, 2008.
- BOGDAN, C.; SCHONIAN, G.; BANULS, A.L.; HIDE, M.; PRATLONG, F.; LORENZ, E.; ROLLINGHOFF, M.; MERTENS, R. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, v.32, p.302-306, 2001.
- CONCEIÇÃO, J.; DAVIS, R.; CARNEIRO, P.P.; GIUDICE, A.; MUNIZ, A.C.; WILSON, M.E.; et al. Characterization of neutrophil function in human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10:e0004715. doi:10.1371/journal.pntd.0004715, 2016.
- DIAS, E.L.; BATISTA, Z.S.; GUERRA, R.M.; CALABRESE, K.S.; LIMA, T.B.; ABREU-SILVA, A.L. Canine visceral leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of Sao Jose de Ribamar Municipality, Maranhão State, Brazil. *Ciência Animal Brasileira*, v.9, p.740–745, 2009.
- DUARTE, M.I.S.; BADARÓ, R.S. Leishmaniose visceral. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Veronesi: Tratado de Infectologia. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2009. v.2, p.1254-79.
- ELGHETANY, M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, v.28, p.260–74, 2002.
- FREITAS, J.C.C.; PINHEIRO, D.C.S.N.; LOPES-NETO, B.E.; SANTOS, G.J.; ABREU, C.R.; BRAGA, R.R.; CAMPOS, R.M.; OLIVEIRA, L.F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.45, p.24-29, 2012.
- IKEDA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M.; GONÇALVES, M.E.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. Perfil hematológico de cães infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: estudo retrospectivo de 191 casos. *Clinica Veterinária*, v.47, p.42-48, 2002.
- JAFARI, S.S.; TAMADON, A.; FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M.H.; BIGHAM, A.; ASGHARI, Q. First report of visceral leishmaniasis in a German shepherd dog in Fars province, Southern

- Iran. Comparative Clinical Pathology, v.15, p.267-269, 2006.
- JOCHIM, R. C.; TEIXEIRA, C.  
*Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. Trends in Parasitology, v.25, p.145-157, 2009.
- KRUGER, P.; SAFFARZADEH, M.; WEBER, A.N.; RIEBER, N.; RADSAK, M.; VON BERNUTH, H.; *et al.*  
Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. PLoS Pathogens, v.11, p.3, 2015.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ROBINS, E. COTRAN: Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 9ª ed. São Paulo: Elsevier, 2016.
- MAIA, C.; DIONÍSIO L.; AFONSO, M.O.; NETO, L.; CRISTÓVÃO, J.M.; CAMPINO, L. *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.108, n.4, p.481-487, 2013.
- MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M.A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S.  
Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nature Reviews in Immunology, v.11, p.519-31, 2009.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J.: Medicina de Laboratório Veterinário – interpretação e diagnóstico. 1ª ed. São Paulo: Roca; 1995.
- MUSUMECI, S.; D'AGATA, A.; SCHILIRO, G.; FISCHER, A.  
Leukokinetic studies in Mediterranean kala azar. Acta Tropica, v.35, p.183-93, 1978.
- SOUSA, L.M.; CARNEIRO, M.B.; RESENDE, M.E.; MARTINS, L.S.; DOS SANTOS, L.M.; VAZ, L.G.; MELLO, M.D.; MOSSER, P.S. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. Parasite Immunology, v.36, p.13-31, 2014.
- THALHOFER, C.J.; CHEN, Y.; SUDAN, B.; LOVE-HOMAN, L.; WILSON, M.E.  
Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. Infection and Immunity, v.79, p.108-117, 2011.
- YIZENGAW, E.; GETAHUN, M.; TAJEBE, F.; CERVERA, E.C.C.; ADEM, E. *et al.*; Visceral leishmaniasis patients display altered composition and maturity of neutrophils as well as impaired neutrophil effector functions. Frontiers in Immunology, v.7, p.1-12, 2016.