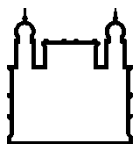


Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ANÁLISE PARASITOLÓGICA E
HISTOPATOLÓGICA DE SEGMENTOS DE PELE DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA
SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE

MARIANA NABUCO DOS SANTOS

Rio de Janeiro
Março de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Mariana Nabuco dos Santos

Leishmaniose visceral canina: análise parasitológica e histopatológica de segmentos de pele de cães naturalmente infectados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Kátia da Silva Calabrese

RIO DE JANEIRO

Março de 2019

Santos, Mariana Nabuco dos.

Leishmaniose visceral canina: análise parasitológica e histopatológica de segmentos de pele de cães naturalmente infectados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe / Mariana Nabuco dos Santos. - Rio de Janeiro, 2019.

xvii, 74f f.; il.

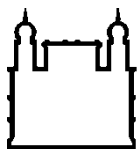
Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientadora: Kátia da Silva Calabrese.

Bibliografia: f. 58-70

1 . Leishmaniose visceral canina. 2. Histopatologia. 3. Pele. 4. qPCR. 5. Sergipe.
I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Mangueiras/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: Mariana Nabuco dos Santos

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ANÁLISE PARASITOLÓGICA E
HISTOPATOLÓGICA DE SEGMENTOS DE PELE DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE

ORIENTADOR: Dra. Kátia da Silva Calabrese

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dr. André Roque (revisor)
(Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos, IOC/FIOCRUZ)

Dra. Maria Regina Reis Amendoeira
(Laboratório de Toxoplasmose e outras Protozooses, IOC/FIOCRUZ)

Dr. Fernando Almeida de Souza
(Laboratório de Imunofarmacologia, UEMA)

SUPLENTE:

Dr. Alexandre Ribeiro Bello
(Faculdade Ciências Médicas, UERJ)

Dra. Marcia Pereira de Oliveira Duarte
(Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 20 de março de 2019.

Aos meus pais por todo amor, apoio e
cumplicidade em todos os momentos da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por estar sempre ao meu lado, sei que tudo acontece no seu tempo e que o senhor tem planos maravilhosos para mim.

Agradeço aos meus pais, Ewerton Messias e Marcelina Nabuco, por serem os melhores pais que eu poderia ter na vida. Por sempre acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado me apoiando.

A minha avó Lizete Nabuco por toda a torcida para que eu alcance meus objetivos.

Aos meus irmãos, Ewerton Nabuco e Marcela Nabuco, e meu primo Alan Nabuco por serem pessoas incríveis e atenciosas, por todos os conselhos e força ao longo desses dois anos de mestrado.

A minha família do Rio, obrigada por terem me recebido e me acolhido nos meus primeiros meses de adaptação na cidade maravilhosa

Aos meus amigos queridos de Aracaju, Augustto Freire, Katiuska Oliveira, Kamilla Ferreira, Ana Maria Marques, Moniely Santos, Flavio Passos, Viviane Oliveira, Vyviana Oliveira, atenção e visitas ao Rio, e mesmo distantes se tornaram sempre tão presentes na minha vida.

Aos meus primos de coração Caroline Monteiro, Marília Correia, Dayana de Moraes, Danilo Paiva, Daniel Paiva, Beatriz Paiva, André Paiva, Rosilei Campos, Rosana Campos, Gilvan Santos por torcerem sempre pelo meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos Luciano Romero e Emiliano Pérez, obrigada por se tornarem meus grandes amigos, pelos dias de muitas risadas e por todo Matte contemplando as lindas paisagens do Rio.

Aos meus amigos de Medicina Tropical da turma de 2017, vocês foram os meus primeiros amigos aqui no Rio e quero levar para toda a vida. E meus amigos que pegaram matéria junto com a nossa turma, Nathalia Alves e Patrick Souza, vocês são pessoas maravilhosas.

Ao meu amigo Daniel de Mello, que se tornou meu grande irmão, obrigada por tudo! Pelos conselhos, risadas e pela sua amizade.

Ao meu amigo e companheiro de salsa, Marlon Vergaray, obrigada por sua amizade!

A todos os meus amigos do Nordeste que vieram desenvolver suas pesquisas na Fiocruz e eu tive o prazer de conhecer, Ana Elisa Reis, Taynan Rosa, Gabriel Xavier, Renata Mondêgo, Amanda Teles, Lucélia Texeira, Dayanne Freitas e Elida Brandão.

Ao meu amigo Derek de Santis, por todos os conselhos, desabafos, por sempre me animar e por todas as vezes que eu te fiz de “google translate” quando eu não entendia uma expressão em inglês. Você é incrível na minha vida.

Ao médico veterinário Anderson Kleber Silva Ramos e toda a equipe da vigilância epidemiológica do Município de Nossa Senhora do Socorro, obrigada pela colaboração e atenção, vocês foram muito importantes na trajetória dessa pesquisa.

Aos meus amigos do LIMP, Sandy Santos, Dra. Flávia Cardoso, Juan Matheus Fernandes, João Victor Silva, Yasmin Rizk, Edlaine Pinheiro, Daiana Haroim e Dr. Fernando Almeida e Luiz d’Escoffier, por sempre dedicarem parte do seu tempo quando eu tinha uma dúvida e por serem tão queridos e carinhosos comigo, sentirei muita falta de todos vocês.

Aos meus colaboradores, Dra. Celeste da Silva Freitas de Souza, Prof. Luiz Otávio Pereira e Dra. Tânia Zaverucha, por toda paciência e atenção e por dividir suas experiências profissionais para contribuir no meu crescimento. Foi um imenso prazer poder trabalhar esses dois anos com vocês.

A Dra. Sônia Cupolilo, obrigada por dividir conosco todo seu conhecimento na área de histopatologia.

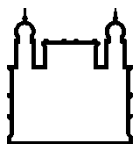
A Dra. Cintia Mello, do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED) do IOC, obrigada por ceder um pouco do seu tempo e me ajudar na identificação da espécie do parasito da minha pesquisa.

A minha Orientadora Dra. Kátia Calabrese, por acreditar em mim e me receber de braços abertos. Foi uma honra ser sua orientanda, serei sempre grata por todas dicas e conselhos.

Agradeço o apoio financeiro da Capes, durante o meu mestrado.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica, seja de maneira direta ou indiretamente.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” (Madre Teresa de Calcutá).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Leishmaniose visceral canina: análise parasitológica e histopatológica de segmentos de pele de cães naturalmente infectados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe

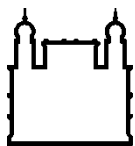
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Mariana Nabuco dos Santos

No ambiente urbano, o cão é considerado o principal reservatório do parasito *Leishmania infantum* e desempenha um papel de dispersor da infecção em áreas endêmicas. Devido a presença de parasitos em sua pele, o cão é fonte de infecção de flebotomíneos. Esse fato é um consenso entre a comunidade científica e as autoridades de saúde pública responsáveis pela vigilância epidemiológica deste agravo, o que torna o cão um dos alvos nas políticas de estratégias de controle da leishmaniose visceral. Desta forma, o presente trabalho propôs estudar a pele de cães com diagnóstico sorológico comprovado pelo Teste Rápido (TR-DPP®-Bio-Manguinhos) e ensaio imunoenzimático (EIE- BioManguinhos) para LV, recolhidos, eutanasiados e necropsiados pela Vigilância Epidemiológica do município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe, associando as alterações histológicas observadas e a carga parasitária detectada em pele, com o estado clínico dos animais. Os animais foram avaliados para observação de sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral canina (LVC). Após eutanásia, fragmentos de pele proveniente de ponta de orelha, focinho e parte interna da coxa foram coletados e processados para avaliação histológica e para determinação da carga parasitária por qPCR. Além disso, foram obtidas amostras de medula óssea para isolamento parasitário. O exame clínico mostrou que 95,5% (21) dos cães eram sintomáticos e a técnica de qPCR detectou DNA de *Leishmania* em 100% dos animais, em pelo menos um segmento de pele analisado. As alterações clínicas mais frequentes encontradas foram hepatomegalia, esplenomegalia e caquexia. Não foi observada correlação entre a quantidade de sinais clínicos observados e a carga parasitária quantificada. Independente do segmento de pele avaliado, a carga parasitária foi homogênea quando avaliamos os animais individualmente, entretanto o tecido cutâneo de orelha foi o mais frequentemente parasitado. Sendo assim, tecido cutâneo de ponta de orelha deve ser eleito como melhor sítio para detecção parasitária. Foi observado correlação positiva entre a intensidade parasitária avaliada pela histologia e a carga parasitária por qPCR, assim como uma correlação positiva entre a intensidade parasitária e o infiltrado inflamatório. A histopatologia mostrou infiltrado inflamatório misto com distribuição difusa, predominando o tipo linfoplasmocitário e linfohistioplasmocitário, em associação com formas amastigotas. Parasitos isolados de duas amostras de medula óssea foram caracterizados como *Leishmania infantum*, pela técnica de PCR-RFLP, comprovando a circulação do parasito no município de Nossa Senhora do Socorro, SE.

Palavra-chave: Leishmaniose visceral canina, pele, histopatologia, qPCR.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Canine visceral leishmaniasis: parasitological and histopathological analysis of skin segments of naturally infected dogs in the municipality of Nossa Senhora do Socorro, Sergipe

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Mariana Nabuco dos Santos

In urban environments, the dog is considered the main reservoir of *Leishmania infantum* and plays a role in the spreading of the infection in endemic areas. Due to the presence of parasites in their skin, the dog is source of infection to phlebotominae (sandflies). This fact is a consensus between the scientific community and the public health authorities responsible for the epidemiological surveillance of this disease, which makes the dog one of the targets in the visceral leishmaniasis (VL) control strategy policies. Thus, the aim of this study was evaluate at the skin of dogs which had a serological diagnosis confirmed by the Dual Path Platform (TR-DPP®-Bio-Manguinhos) and immune-enzymatic assay (EIE-BioManguinhos) for VL, and were collected, euthanized and necropsied by the Municipal Epidemiological Surveillance of Nossa Senhora do Socorro, Sergipe, thereby associating the histological changes observed and the detected parasite load in skin, with the clinical status of the animals. The animals were clinically evaluated to observe clinical signs compatible with canine visceral leishmaniasis (CVL). After euthanasia, fragments of skin from the ear tip, nostril and inner thigh were collected and processed for histological evaluation and parasitic load determination by qPCR. In addition, bone marrow samples were obtained for parasitic isolation. Clinical examination showed that 95.5% (21) were symptomatic and the qPCR technique detected *Leishmania* DNA in 100% of the animals in at least one skin segment analyzed. The most frequent clinical alterations were hepatomegaly, splenomegaly, and cachexia. It was not found correlation between the number of clinical signs observed in dogs with VL and parasite load. Regardless of the evaluated skin segment, the parasite load was homogeneous in the same animal. There was positive correlation between the parasite intensity assessed by histology and the parasitic load by qPCR, as well as a positive correlation between parasite intensity and inflammatory infiltrate. Histopathology showed mixed inflammatory infiltrate with diffuse distribution, predominating in the lymphoplasmocytic and lymphohistoplasmocytic types associated with amastigote forms. Parasites isolated from two bone marrow samples were characterized as *Leishmania infantum* by PCR-RFLP, confirming the circulation of the parasite in the municipality of Nossa Senhora do Socorro, SE. Our results showed that the ear was the most often parasitized, and may serve as a source of phlebotomus infection, corroborating with data from the literature and can be the tissue choice for diagnosis.

Keywords: Canine Visceral leishmaniosis, skin, histological change, qPCR.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos epidemiológico	1
1.2 Interações parasito – hospedeiro	2
1.3 Leishmaniose visceral canina (LVC)	3
1.3.1 O cão como fonte de infecção	3
1.3.2 Sintomatologia	4
1.3.3 Diagnóstico	5
1.3.4 Controle e Prevenção	7
1.3.5 Tratamento	8
1.3.6 A pele na LVC	9
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivo Especifico	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Considerações Éticas	15
4.2 Área de estudo	15
4.3 Animais	16
4.4 Coleta de amostras de medula óssea, confecção de esfregaços e semeadura em meio de cultura e caracterização da espécie de Leishmania	17
4.5 Coleta da pele	18
4.6 Processamento Histológico	18
4.7 Técnica de coloração utilizadas	19
4.7.1 Hematoxilina Eosina	19
4.7.2 Azul de Toluidina	19
4.8 Quantificação da carga parasitária por reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)	20
4.8.1 Extração de DNA	20

4.8.2 Reação de PCR	21
4.9 Análise estatística	21
5. RESULTADOS	22
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9. ANEXOS	71

ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

- FIGURA 4.1** IMAGEM DO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 16
- FIGURA 5.1** OCORRÊNCIA DE SINAIS CLÍNICOS DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 23
- QUADRO 5.1** SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS EM CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SE. 24
- FIGURA 5.2** CARACTERIZAÇÃO DOS PARASITOS ISOLADOS DE MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SE por PCR-RFPL 25
- FIGURA 5.3** CITOLOGIA DE MEDULA ÓSSEA DE CÃO COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 26
- QUADRO 5.2** RESULTADO INDIVIDUAL DA DETECÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTAS EM ESFREGAÇO DE MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 27
- FIGURA 5.4** QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA POR qPCR EM DIFERENTES FRAGMENTOS CUTÂNEOS PROVENIENTES DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL,

NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 29

FIGURA 5.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA POR qPCR EM DIFERENTES FRAGMENTOS CUTÂNEOS PROVENIENTES DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 30

TABELA 5.1 GRAU DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO NOS SEGMENTOS DE TECIDOS CUTÂNEOS DE 22 CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 31

FIGURA 5.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS CUTÂNEOS DE CÃO COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 32

TABELA 5.2 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO CELULAR OBSERVADO NOS SEGMENTOS DE TECIDOS CUTÂNEO DE 22 CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *LEISHMANIA INFANTUM*, NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SE 34

FIGURA 5.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS CUTÂNEOS DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 35

FIGURA 5.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS CUTÂNEOS PROVENIENTES DA ORELHA DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 36

FIGURA 5.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS CUTÂNEOS PROVENIENTES DA COXA DE CÃO COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 37

FIGURA 5.10 ANÁLISE HISTOPATOLOGICA DE FRAGMENTOS CUTÂNEOS PROVENIENTES DA ORELHA DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRE, SERGIPE 39

TABELA 5.3 RESULTADO DA AVÁLIAÇÃO HISTOLOGICA QUANTO A PRESENÇA DE FORMAS AMASTIGOTAS E CARGA PARASITÁRIA EM SEGMENTO DE TECIDO CUTÂNEO DE 22 CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *LEISHMANIA INFANTUM*, NO MUNICÍPIO DE NOSSO SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 40

FIGURA 5.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS CUTÂNEOS PROVENIENTES DE FOCINHO DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 42

FIGURA 5.12 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS CUTÂNEOS DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 43

FIGURA 5.13 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS CUTÂNEOS DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 44

FIGURA 5.14 COMPARAÇÃO ENTRE A CARGA PARASITÁRIA E A INTENSIDADE PARASITÁRIA NOS DIFERENTES SEGMENTOS DE PELE DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL,

NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 45

FIGURA 5.15 COMPARAÇÃO ENTRE A INTESIDADE PARASITÁRIA E A INTESIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NOS DIFERENTES SEGMENTOS DE PELE DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 46

FIGURA 5.16 COMPARAÇÃO ENTRE A CARGA PARASITÁRIA E A INTENSIDADE DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO NOS DIFERENTES SEGMENTOS DE PELE DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 48

FIGURA 5.17 COMPARAÇÃO ENTRE A CARGA PARASITÁRIA E A QUANTIDADE DE SINAIS CLÍNICOS NOS DIFERENTES SEGMENTOS DE PELE DE CÃES COM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, NATURALMENTE INFECTADOS E DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE NOSSA SENHORA DO SOCORRO, SERGIPE 49

Lista de Siglas e Abreviaturas

µm - Micrômetro

BOD - Biochemical Oxygen Demand/ Demanda Bioquímica de oxigênio

CDC - Centro de controle e prevenção de doenças (Center for disease control and prevention)

CEUA - Comissão de ética no uso de animais

ELISA - Ensaio imunoenzimático indireto

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LACEN/SE - Laboratório Central de Saúde Pública de Sergipe

LIMP - Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia

LIPMED - Laboratório de Pesquisas Médica - Referência Nacional para Diagnóstico Molecular e Histopatológico de Leishmaniose

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

MS - Ministério da saúde

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PBS - Tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline)

PCR - polimerase chain reaction

PCR-RFLP - polimerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism

PFA - Paraformaldeído

PVCLV - Programa de Controle Brasileiro de Leishmaniose Visceral Canina

PSG - Promastigote secreted gel/ Gel secretado por promastigota

qPCR - quantitative polimerase chain reaction

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

SINAN - Sistema de informação dos agravos de notificação

TR-DPP® - Teste Rápido-Dual Path Plataform

WHO/OMS - World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde

VENSS - Vigilância Epidemiológica de Nossa Senhora do Socorro

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

1 Introdução

1.1 Aspectos epidemiológicos

As leishmanioses abrangem um grupo de doenças negligenciadas, consideradas um problema de saúde pública que atinge áreas rurais e urbanas no mundo (CDC, 2018). O aumento do número de casos em áreas urbanizadas se deve à mudança no ciclo epidemiológico, que antes era restrito às áreas rurais. Essa alteração no ciclo pode estar atrelada, dentre outros fatores, a atividades antrópicas como desmatamentos, migrações humana e canina e construções inadequadas de residências em áreas periurbanas (Belo et al., 2013; Ribeiro et al., 2013; Werneck, 2014; Lima et al., 2017).

As leishmanioses são definidas por serem um complexo de doenças que ocasionam um amplo espectro de manifestações clínicas, podendo variar desde infecções assintomáticas ou subclínicas a lesões tardias de mucosas e ainda envolvimento sistêmico do sistema fagocítico mononuclear (Pearson & Souza 1996; Sacks e Sher, 2002). O desenvolvimento da doença no hospedeiro vertebrado depende, dentre outros fatores, de interações complexas entre a espécie do parasito envolvido na infecção, a resposta imunológica e a genética do hospedeiro (Handman e Bullen 2002; Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006).

As principais formas clínicas incluídas nas leishmanioses são: as tegumentares, caracterizadas pela presença de lesões cutâneas, a leishmaniose mucosa responsáveis pelas lesões nas mucosas oronasofaríngeas; e a leishmaniose visceral que ocorre de forma sistêmica (CDC, 2018).

Anualmente são descritos entre 700 mil e 1 milhão de novos casos de leishmanioses no mundo. Destes, 90% são registrados em países em desenvolvimento como o Brasil, Índia, Etiópia, Bangladesh e Sudão e entre 20 e 30 mil levam o paciente a óbito (CDC, 2016; WHO, 2018).

No mundo são notificados anualmente de 200.000 a 400.000 novos casos de leishmaniose visceral. Só no Brasil, entre os anos de 2001 a 2014, foram notificados mais de 47.000 novos casos de LV, com maior incidência na Região Nordeste (Reis et al., 2017). Segundo dados do Sistema de informação dos agravos de notificação

(SINAN), dos 4.504 casos notificados no país entre os anos de 2015 a 2017, 2.249 (49,9%) encontravam-se na Região Nordeste.

No estado de Sergipe, casos de LV são notificados desde 1934 e, mesmo não sendo considerada uma área endêmica, é uma área de transmissão ativa. No estado de Sergipe mudanças no cenário epidemiológico deste agravo vêm sendo relatadas (Araujo, 2017). Apesar do maior número de casos confirmados estarem do município de Aracaju, a expansão doença no estado já é evidenciada. Segundo o SINAN, entre os anos de 2010 a 2015, 382 casos dispersos por todo o estado, foram notificados. Casos nos municípios vizinhos, Nossa Senhora do Socorro e Areia Branca vem sendo registrados desde 2012 (Goes et al., 2012; Araujo, 2017). Segundo a Secretaria de Vigilância Epidemiológica do município de Nossa Senhora do Socorro (SVENS) foram confirmados 303 casos caninos e 17 casos humanos de leishmaniose visceral entre 2015 e 2017; com um crescimento gradativo no número de casos da doença a cada ano. Este aumento pode estar relacionado com a migração da população humana e canina infectada, proveniente do próprio estado e também de outros estados, além da presença de vetores no município (Brasil, 2014).

1.2 Interações parasito - hospedeiro

Existem aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* descritas. Dessas, 30 são conhecidas por parasitarem mamíferos e 20 são consideradas prejudiciais à saúde humana (Nunes et al., 2016). Com relação aos flebotomíneos, há mais de 800 espécies descritas, entretanto, apenas 70 espécies são ou estão em via de serem comprovadamente capazes de transmitir *Leishmania* (Alexander e Maroli, 2003; Pimenta et al., 2012). No Brasil, *Leishmania infantum* é o agente etiológico da LV (Nunes et al., 2016). A elevada taxa de infecção atrelada a uma alta densidade populacional do seu principal vetor, *Lutzomyia longipalpis*, contribui para que haja uma condição vetorial favorável e com isso uma eficiente disseminação do parasito (Lara-Silva et al., 2015).

Leishmania infantum é um parasito heteroxênico com duas formas evolutivas principais: amastigota, células ovóides de 3-5µm, imóveis com pequeno flagelo restrito a bolsa flagelar, encontrada em células mononucleares do hospedeiro vertebrado; e promastigotas, células de 5-15µm, alongadas e com flagelo livre, encontradas no tubo digestório do hospedeiro flebotomíneo (Kamhawi, 2006; Pimenta et al., 2012).

A infecção do inseto se dá quando fêmeas, ao realizarem o repasto sanguíneo, ingerem macrófagos contendo as formas amastigotas ou mesmo formas amastigotas livres (Kamhawi, 2006; Bates, 2007; Pimenta et al., 2012). No intestino do inseto, o sangue ingerido é envolvido por uma matriz peritrófica constituída por proteínas, quitina e glicoproteínas, e ocorre a diferenciação das formas amastigotas em promastigotas procíclicas, seguida de uma elevada multiplicação e fixação em porções específicas do tubo digestório médio do inseto (Secundino et al., 2005). Em uma etapa seguinte, ocorre à degradação da matriz peritrófica e, em um processo conhecido como metaciclogênese, alguns parasitos diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, formas infectantes para mamíferos que migram para o intestino anterior do inseto. Lá secretam quitinases, que destroem a válvula estomodeal do inseto, e PSG (promastigote secreted gel) dificultando o processo de repasto sanguíneo. Em um próximo repasto, o flebotomíneo acaba por regurgitar o sangue recém-ingerido, acrescido das formas promastigotas metacíclicas, na pele de um novo hospedeiro vertebrado, levando à transmissão dos parasitos (Pimenta et al., 1992; Saraiva et al., 1995; Rogers et al., 2002; Bates, 2007; Bates, 2008).

Nos hospedeiros vertebrados é possível encontrar as duas formas evolutivas da *Leishmania*. As promastigotas são liberadas durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo infectado e fagocitados por macrófagos. As amastigotas são liberadas por macrófagos no organismo do hospedeiro e novamente fagocitadas por outras células de defesa (Vannier-Santos, 2002). Essas infecções são persistentes devido a resistência apresentada pelo parasito diante do mecanismo de eliminação do macrófago (Tauber, 2003). Para que a *Leishmania* sp possa infectar e se desenvolver no hospedeiro a atuação de moléculas e vias metabólicas são importantes para esse processo, pois as vias metabólicas irão obter nutrientes e metabolismo de carboidratos essenciais para a manutenção desses parasitos dentro da célula (Barros et al., 2012).

1.3 Leishmaniose visceral canina (LVC)

1.3.1 O cão como fonte de infecção

No Brasil, o cão é considerado o principal reservatório da *L. infantum*, tanto em áreas urbanas quanto em áreas rurais, devido a sua proximidade com o homem, alta carga parasitária na pele e grande suscetibilidade à infecção (Ashford, 1996). Desse

modo, o fato do cão residir na mesma propriedade que o homem é tido como um fator de risco para a infecção por *L. infantum* (Cunha et al., 1995). Na realidade, já foi descrito que a infecção canina, geralmente, precede a infecção humana (Barão et al., 2007). O fato do cão ganhar destaque na epidemiologia da LV não é devido apenas a maior taxa de prevalência quando comparada a infecção humana, mas também pela existência de grande quantidade de animais assintomáticos e maior carga parasitária na pele (Paltrinieri et al., 2010). Nesse caso, os cães atuam como fonte de infecção para os vetores e, por não apresentarem sintomas, passam, muitas vezes, despercebidos pela população (Baneth et al., 2008).

A leishmaniose visceral canina (LVC), assim como a doença humana, é uma zoonose com grande impacto na saúde, considerando que, no ambiente doméstico, o cão é apontado como o principal reservatório do parasito responsável pela infecção. O papel do cão como potencial fonte de infecção para os vetores de *Leishmania* sp. é bem definido (Gontijo e Melo 2004), podendo-se concluir que a presença de cães infectados em áreas endêmicas permite a manutenção da transmissão do parasito, aumentando a incidência de casos humanos e caninos (Rosales e Yang, 2014; Costa et al., 2018).

O panorama epidemiológico sobre a expansão geográfica da LV, deixa clara a gravidade da situação (Werneck, 2010). Essa expansão é o resultado, dentre outros fatores, de ações antrópicas, principalmente atividades industriais e agropecuárias, que impactam o ambiente natural, modificando-o. Somado a isso, a ocupação exponencial e desordenada do território por movimentos migratórios humano e presença de cães infectados contribui para essa alteração do perfil epidemiológico da doença (Maia et al., 2014). Vinte por cento dos cães apresentam LVC em áreas altamente endêmicas (WHO, 2019).

1.3.2 Sintomatologia

Assim como em humanos, a infecção canina pode oscilar dentro de um espectro de manifestações clínicas inespecíficas que podem resultar em animais assintomáticos e sintomáticos (Marzochi et al., 1985; Cortada et al., 2004; Feitosa, 2006). São considerados como assintomáticos animais que não apresentam qualquer sinal clínicos de infecção e sintomáticos os que manifestam sinais clínicos, que somado a outros fatores, são considerados compatíveis com a doença. Dentre esses

temos: perda de peso, linfadenopatia local ou generalizada; lesões de pele, principalmente em ponta de orelha; alopecia local ou generalizada; epistaxe; anemia, insuficiência renal; edema de patas e em casos mais graves alterações locomotoras, neurológicas, hepáticas, cardíacas e respiratórias (Viñuelas et al., 2001; Chamizo et al., 2005; Solano-Gallego et al., 2009).

Os animais assintomáticos representam o maior problema no controle do agravo devido à dificuldade de detecção da infecção, impossibilitando medidas de controle adequadas e imediatas. A intensidade de parasitismo apresentada pelo animal não parece estar diretamente relacionada à gravidade do quadro clínico apresentado, podendo ser encontrados animais com sintomatologia leve e parasitismo intenso (Feitosa et al., 2000; Camargo-Neves et al., 2006).

Sinais clínicos envolvendo a pele dos animais com LVC são comuns de serem observados. Os mais frequentes são alopecia, dermatite esfoliativa, onicogrifose, dermatite ulcerativa e, mais raramente, dermatite pustular, dermatite nodular mucocutânea e dermatite papular (Saridomichelakis e Koutinas, 2014).

1.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da LVC é um desafio devido à variedade de manifestações clínicas inespecíficas, comuns a outras enfermidades dos cães, por exemplo babesiose e erliquiose (Gomes et al., 2008) além, de muitas vezes, a ausência de sinais clínicos, no caso dos animais assintomáticos. Esses animais assintomáticos podem permanecer neste estado por toda a vida ou desenvolver os sintomas após períodos que variam de três meses a anos após a infecção primária (Gontijo & Melo, 2004; Ikeda-Garcia e Marcondes, 2007). Além disso, a imunossupressão provocada pela infecção pode ocasionar infecções oportunistas, impedindo o diagnóstico clínico correto (Silva, 2007), tornando o diagnóstico laboratorial indispensável para confirmação deste agravo.

Basicamente existem duas categorias de métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico de LVC, o parasitológico, incluindo os moleculares, e o sorológico (Nogueira et al., 2009). Os métodos parasitológicos são considerados o padrão ouro para o diagnóstico das leishmanioses (Ikeda-Garcia e Marcondes, 2007). As técnicas mais utilizadas são as citológicas, por *imprint* ou esfregaços, que permitem a

identificação direta, em lâminas, de formas amastigotas provenientes de tecidos ou exsudato obtidos do animal (Brasil, 2006). Entretanto, em casos de animais com baixa carga parasitária, podem ocorrer resultados falsos negativos (Schimming, 2012). Os métodos diretos, apesar da alta especificidade, apresentam sensibilidade em torno de 80% para cães sintomáticos e menor sensibilidade ainda para cães assintomáticos (Brasil, 2014). O sucesso desses métodos depende da carga parasitária apresentada pelo animal e da escolha do material biológico coletado (Brasil, 2006).

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito (Ikeda-Garcia e Marcondes, 2007), aumentando a sensibilidade, entretanto, dependendo do material biológico de escolha e do tempo de infecção esta sensibilidade pode diminuir significativamente. Em infecções recentes a sensibilidade pode chegar a 88% e diminuir para 50% em infecções tardias (Ikeda-Garcia & Feitosa, 2006). A utilização de amostras de sangue para a realização desta técnica é um processo menos invasivo para o animal, contudo, a sensibilidade do teste é maior quando se utilizam outros tecidos, como a pele, baço e medula óssea, devido à distribuição mais homogênea dos parasitos nesses tecidos (Fisa et al., 2001; Manna et al., 2004). Além de outros fatores como condições físico-químico da reação, iniciadores e sondas escolhidos para o PCR e a natureza e concentração do DNA da amostra (Bastien et al., 2008).

As técnicas sorológicas são ferramentas importantes no diagnóstico da LVC, entretanto, devem ser interpretadas com cuidado e não serem o único método de escolha. Os testes sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes e as principais técnicas utilizadas imunoenzimáticas como o “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA), com suas diferentes modificações e os imunocromatográficos, incluindo o teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina (Teste imunocromatográfico Rápido Dual Path Platform), produzido por Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ. Os testes sorológicos disponibilizados, em geral, apresentam sensibilidade e especificidade satisfatórias, entretanto, é preciso considerar que um animal sororeagente não pode ser conclusivo de doença ativa, assim como um soronegativo pode estar infectado (Barros, 2011). Além disso, várias infecções, como leishmaniose tegumentar, tripanossomíases, erlichiose, borreliose, dirofilariose, babesiose, presentes em cães podem ter reação cruzada com LV e gerar resultados falsos positivos. Outra dificuldade é que em infecções recentes, até 3

meses de infecção, ou no período pré-patente o resultado do exame poderá ser negativo (Ikeda- Garcia e Marcondes, 2007).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) apesar de ser uma técnica com baixa especificidade e poder apresentar reação cruzada com vários outros agravos, até 2011 no Brasil, foi a mais frequentemente utilizada em estudos epidemiológicos já que era indicado pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) do Ministério da Saúde (MS), como teste confirmatório depois da triagem pelo ELISA (Almeida et al., 2005; Silva et al, 2013; Laurenti et al., 2014). A partir de 2011, com o objetivo de aperfeiçoar, simplificar e agilizar o diagnóstico da LVC o MS substituiu o protocolo, e hoje utiliza-se como teste de triagem o Teste Rápido DPP e o ELISA (Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina - Biomanguinhos) como teste confirmatório (Brasil, 2014). O DPP é um teste imunocromatográfico que utiliza como antígenos proteínas recombinantes desenvolvidas a partir de genes de amostras viscerotrópicas de *Leishmania*, o que aumenta sua especificidade. Ele é capaz de detectar anticorpos anti antígenos de *L. infantum* em pequenas amostras de sangue total, soro ou plasma. Além disso, pode ser utilizado em campo fornecendo o resultado em apenas 15 minutos.

1.3.4 Controle e Prevenção

O Programa de Controle da Leishmaniose Visceral existe há mais de 50 anos e tem como objetivo a interrupção da transmissão da LV do animal ao homem e de homem a homem; a execução das medidas profiláticas necessárias à obtenção da interrupção da transmissão do parasito; a unificação do tratamento e controle do vetor e do reservatório doméstico (Costa, 2001). O controle vetorial com o uso de inseticidas de ação residual e inquéritos soropidemiológicos caninos com posterior eutanásia dos cães soropositivos são as principais recomendações do PCLV. Além disso, para reduzir a letalidade, preconiza o diagnóstico e tratamento precoce. Apesar dos esforços e recursos disponibilizados para o sucesso do PCLV existe a percepção de que mudanças são necessárias já que as ações direcionadas para a redução da transmissão não vêm surtindo o efeito desejado. Segundo Werneck (2016), são necessárias melhorias no acesso e cuidado ao paciente com LV; fomento em pesquisas que gerem novas ferramentas de controle; implementação de abordagens

educativas que incorporem a participação ativa da população nas ações de controle e saneamento ambiental, entre outros.

Atualmente, outra alternativa para o controle da LVC é o uso de vacinas (Gradoni, 2015; Rock et al., 2015). Apesar de existirem duas vacinas contra LVC licenciadas e disponíveis no mercado: a Leish-Tec produzida pelo laboratório Hertape no Brasil e a Cani-Leish da Virbac, licenciada na Europa (Mendes, 2016); os resultados obtidos com ensaios de fase III revelam apenas proteção parcial contra o desenvolvimento da doença e infecção ativa (Fernandes et al., 2011).

1.3.5 Tratamento

Recentemente, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio de uma nota técnica conjunta com o MS (n° 001/2016 MAPA/MS), permitiu o registro do fármaco Milteforan para utilização no tratamento da LVC. O tratamento dos animais com esse medicamento passou então a ser uma possibilidade legal em concordância com a Portaria Interministerial n°1.426 de 11 de julho de 2008, que proíbe o tratamento para LV em cães utilizando medicamentos humanos. O MS emitiu parecer técnico favorável ao uso da Milteforan no tratamento da LVC porque a droga não é utilizada para o tratamento da doença em humanos e até o momento, não há qualquer evidência científica a favor de sua eficácia que justifique sua incorporação no protocolo terapêutico da LV humana. Entretanto, o MS ressalta que a opção por esse tratamento é única e exclusivamente uma escolha do proprietário do animal já que não configura como uma medida de saúde pública. O milteforan (Milteforan® Virbac) é um fármaco que estimula uma resposta imunológica celular, com biodisponibilidade absoluta de 94%, com ampla distribuição nos tecidos e é administrado por via oral em doses únicas diárias. O fármaco apresenta poucas contraindicações, assim como poucos efeitos colaterais (Prasad et al., 2004). Segundo o fabricante, o medicamento atua reduzindo a carga parasitária, diminuindo assim o potencial do cão em infectar os flebotomíneos, entretanto, ainda segundo o fabricante, não fica dispensado o uso concomitante de repelentes e a cada 4 meses é necessária uma reavaliação clínica, laboratorial e parasitológica do animal já que não existe cura parasitológica estéril na LVC.

1.3.6 A pele na LVC

Apesar da natureza viscerotrópica do protozoário causador da LVC, as lesões dermatológicas são frequentes, sendo detectada em 90% dos cães infectados. Muitas vezes essas lesões podem representar o único sinal clínico da doença (Koutinas et al., 1993). Além disso, quantidades elevadas de parasitos podem ser detectadas até mesmo na pele aparentemente saudável de animais assintomáticos (Deane, 1956; Ordeix et al., 2017). A comprovação do parasitismo cutâneo é um importante dado clínico-epidemiológico, principalmente pelo fato do animal poder ser fonte de infecção para os insetos vetores que transmitem os parasitos para os novos hospedeiros vertebrados (Marzochi et al., 1985).

O sistema tegumentar é composto pela pele e anexos, como pelos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas (Ross e Pawlina, 2012). A pele é constituída por 3 camadas, a superior chamada de epiderme, a intermediária, derme e a mais interna, hipoderme (Rivitti, 2014).

A epiderme é a camada mais externa da pele, composta pelo tecido estratificado e possui um espessamento maior em algumas áreas específicas como o plano nasal. Está constantemente se renovando, porém, sua nutrição é feita através dos vasos sanguíneos da derme, uma vez em que os vasos sanguíneos e linfáticos são ausentes em sua estrutura. As células encontradas são os queratinócitos (encontrados em maior quantidade), melanócitos (atuam na pigmentação), células de Langerhans (apresentação de antígenos) e de Merkel (mecanorreceptores de pressão). A epiderme é dividida: em estrato basal, composta de células cuboides e está intimamente aderindo a derme; estrato espinhoso, que apresenta camada cuboide e aplanada; estrato granuloso, possui queratinócitos nucleados e aplanares; o estrato lúcido, com células anucleadas e planas e o estrato córneo contendo diversas camadas de queratinócitos anucleados (Pinho, 2013). A derme é composta por um tecido conjuntivo fibroelástico, vasos linfáticos, sanguíneos, músculos, nervos, glândulas sebáceas, sudoríparas e folículo piloso. Na derme são encontrados plasmócitos, mastócitos, macrófagos, fibroblastos, e, em menor quantidade, linfócitos que junto com as células de Langerhans compõem o tecido linfóide ligado à pele (Hargis e Ginn, 2007).

A derme nos cães é dividida em camada superior (ou papilar) e camada profunda (ou reticular). A derme superior é composta, especialmente, por fibras colágenas delgadas, frouxas e distribuídas de forma desorganizada (tecido conjuntivo frouxo), enquanto a derme profunda é constituída por fibras mais densas, organizadas e distribuídas de forma paralela à superfície cutânea (tecido conjuntivo denso). As fibras dérmicas são sintetizadas por fibroblastos e dão origem às fibras colágenas, que correspondem a 75-90% do total, ou fibras elásticas, encontradas em menor quantidade (Scott et al., 2001). A hipoderme, última camada da pele, é composta por tecido adiposo. Sua densidade é variável. Tem função de isolamento térmico e protege, de forma mecânica, o organismo contra as pressões e traumas externos. Ela também funciona como um depósito nutricional de reserva e ajuda com a motilidade da pele, no que diz respeito a estruturas adjacentes (Rivitti, 2014).

A pele tem ampla funcionalidade para o organismo, dentre elas, conferir proteção imunológica, devido à presença de células imunes ativadas, percepções táteis e proteção mecânica (Rivitti, 2014). Além disso, confere elasticidade e flexibilidade que garante formas e movimentação, formação de melanina, queratinização, vascularização e por fim permite retenção de água, lipídios, vitaminas e proteínas (Pinho, 2013).

Nas leishmanioses a pele é o sítio inicial da infecção. Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos somente conseguem atingir os vasos superficiais da derme e da interface derme/epiderme, devido à pequena extensão de sua probóscide (Bates, 2007; 2008). No hospedeiro vertebrado, fatores presentes, no sítio da infecção, permitem a ativação da resposta imunológica que atuam destruindo as formas parasitárias que se multiplicam no interior de células fagocíticas. Quando essa resposta imunológica não é satisfatória, as amastigotas multiplicam-se e dissipam-se para todos os órgãos provocando diversas manifestações clínicas e patológicas que, em alguns casos, pode levar o hospedeiro a óbito (Torres-Guerrero et al., 2017). As manifestações clínicas que surgem após a infecção dependem da interação entre o parasito e o hospedeiro, variando de acordo com a genética e o estado imunológico deste. As alterações histológicas observadas estão associadas ao tipo de resposta imunológica apresentada pelo animal (Santos-Gomes et al., 2002). A carga parasitária na pele de cães infectados com *L. infantum* é frequentemente alta e, pela sua

associação à infecção vetorial, torna-se importante alvo de estudos isolados ou concomitante a outros órgãos (Manna et al, 2006; Pinto et al., 2013).

Na LVC as áreas cutâneas mais afetadas são as do focinho e orelha. Enquanto em animais assintomáticos, muitas vezes, alterações inflamatórias não são observadas, nos sintomáticos a densidade de células inflamatórias varia de discreta a intensa. O infiltrado pode estar distribuído de forma difusa, entretanto, rotineiramente, está localizado em regiões perivascular e perianexial (Costa, 2008). Quadros de foliculite são frequentemente registrados. O infiltrado inflamatório é misto e composto principalmente por macrófagos, linfócitos e plasmócitos (Costa, 2008). Apesar da carga parasitária ser frequentemente alta, a intensidade pode variar de ausente a intensa em diferentes segmentos de pele, dependendo do estado clínico do animal, que está relacionado as variações de resistência do hospedeiro (Tafari et al., 2001; Solano-Galego et al., 2004). Animais sintomáticos, geralmente, apresentam maior número de parasitos quando comparados a animais assintomáticos (Giunchetti et al., 2008a; 2008b) e esse fato fica evidente pelas variações encontradas na pele de cães de uma mesma região endêmica (Calabrese et al., 2010). Quando os cães de diferentes regiões são comparados, vários outros fatores devem ser considerados. Fatores extrínsecos como variações nas condições climáticas e também tempo de endemicidade da região podem influenciar. Em áreas onde a doença foi recentemente introduzida, os cães são incapazes de controlar a propagação do parasito, que atinge vários órgãos já nos primeiros estágios da doença (Calabrese et al., 2010).

O fato de o cão apresentar alto parasitismo na pele, principalmente em regiões de pouco pelo, como orelha e focinho, e sua associação direta com a infecção vetorial e consequente propagação da infecção para outros hospedeiros vertebrados, justifica a importância de estudos sobre este órgão. O estudo dos aspectos clínicos, parasitológicos e histopatológicos da pele desses animais são fundamentais para a compreensão da dinâmica de transmissão dos parasitos em áreas endêmicas. Através do trabalho proposto seria possível definir se a carga parasitária na pele está associada à intensidade e tipo de infiltrado inflamatório e se a presença de infiltrado na pele segue um padrão específico que poderia ser usado como indicativo de infecção. Essas respostas poderão ser de grande importância para tornar a pele um alvo de estudo, principalmente, no diagnóstico da doença. Concomitantemente, considerando a ausência de trabalhos sobre a LV no município de Nossa Senhora do

Socorro (SE), o estudo fornecerá conhecimento para compreender o papel dos cães no ciclo de manutenção da parasitose na área, auxiliando no delineamento de estratégias mais eficientes para o controle da LV nessa região.

2 Justificativa

Surtos de leishmaniose visceral humana são precedidas de enzootia canina (Calabrese et al. 2010) e o cão incriminado como principal fonte de infecção para os vetores (Brasil, 2014). Alguns fatores como a distribuição cosmopolita, o papel que o animal ocupa nos grupos sociais, intenso parasitismo da pele, facilitando a infecção dos flebotomíneos (Barata et al., 2005; Courtenay et al., 2014), altas taxas de prevalências de infecção, elevado número de animais assintomáticos (Marcondes & Rossi, 2013) e alta competência para estabelecer a infecção em flebotomíneos (Laurenti et al., 2014; Doehl et al., 2017), colocam o cão como principal elo na cadeia de transmissão da LV.

A alta carga parasitária da pele de cães com LVC mostra o importante papel desses animais na disseminação dos parasitos e enfatiza o risco que representam para a saúde pública, especialmente porque dividem o mesmo habitat com o homem (Costa et al., 2018; Calabrese et al., 2010). Contudo, estudos mostram que o padrão de parasitismo pode ser diferente e influenciado por fatores inerentes ao hospedeiro ou não (Calabrese et al., 2010). Além disso, a pele é indicada como um sítio confiável para avaliação parasitológica e também pode ser considerada como indicador da severidade da doença clínica na LVC (Giunchetti et al., 2006). Sendo assim, considerando a importância do cão na transmissão da LV, o estudo do padrão de parasitismo cutâneo de animais naturalmente infectados na cidade de Nossa Senhora do Socorro, SE, poderá contribuir para definição do papel desses animais como fonte de infecção para os vetores na área endêmica em questão.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estudar a infecção por *Leishmania infantum* em diferentes seguimentos de pele de cães naturalmente infectados do município de Nossa Senhora do Socorro, SE

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção canina em Nossa Senhora do Socorro, SE;
- Avaliar a carga parasitária em diferentes segmentos de pele dos cães, por PCR;
- Realizar análise histopatológica dos diferentes segmentos de pele dos animais, avaliando o infiltrado inflamatório e a intensidade do parasitismo.
- Associar os achados histológicos cutâneos com as formas clínicas apresentadas e a carga parasitária.

4 Material e Métodos

4.1 Considerações Éticas

A pesquisa foi realizada com amostras biológicas de cães provenientes de ações de vigilância e controle do município de Nossa Senhora do Socorro, SE. Após eutanásia dos animais, as amostras foram cedidas ao Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, IOC (anexo 1), não sendo assim necessária a submissão desse projeto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), segundo a resolução normativa 30/2016 (item 6.1.10 - b) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (anexo 2).

4.2 Área de estudo

O Município de Nossa Senhora do Socorro está localizado no estado de Sergipe, à 13 km da capital Aracaju (Fig. 4.1). O município conta com uma população estimada em 181.928 habitantes (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2017). A cidade de Nossa Senhora do Socorro possui uma área de 155.018 km², está localizada na latitude 10° 51' 18", longitude 37° 07' 34", com clima tropical quente e úmido, inverno moderado, apresentando um período de seca que varia de 1 a 3 meses e um período chuvoso entre os meses de março a agosto e temperatura média de 25 °C.

A partir de 1980, o município vem sofrendo um crescimento econômico devido ao projeto Grande Aracaju, que visa estimular a economia, associando as atividades industriais com a habitação. Com isso houve um investimento imobiliário no município de Nossa Senhora do Socorro que ocasionou mudanças em áreas antes pouco povoadas e ocupadas por manguezais.



Fonte :Google Earth Pro

Figura 4.1- Imagem do município de Nossa Senhora do Socorro - Sergipe.

4.3- Animais

A equipe da Vigilância Epidemiológica do município de Nossa Senhora do Socorro (VENS) realizou o teste rápido (TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – BioManguinhos), em cães domiciliados em áreas urbanas e rurais. Dos animais que se apresentaram reagentes para o teste rápido, foram colhidas amostras sanguíneas e os soros, enviados ao Laboratório Central de Saúde Pública de Sergipe (LACEN/SE) para confirmação do resultado através do teste ELISA. Conforme preconizado pelo Ministério da Saúde, somente cães sororreagentes nos dois testes foram recolhidos para eutanásia pela equipe da Vigilância Epidemiológica (Brasil, 2014).

No presente estudo, amostras de pele de 22 cães com diagnóstico sorológico comprovados para leishmaniose visceral e amostras de 3 cães não reagentes foram estudadas. Todos os animais eram domiciliados em áreas rurais e urbanas do município e foram eutanasiados como resultados de ações de vigilância no município.

Os animais não reagentes para leishmaniose visceral eram portadores de alguma forma de carcinoma e foram eutanasiados a pedido dos proprietários. Segmentos de pele desses animais foram incluídas neste estudo como comparação com os obtidos dos animais sororreagentes.

Os animais foram avaliados clinicamente por meio de técnicas semiológicas de inspeção e apalpação para observação de sinais clínicos e classificados como assintomáticos e sintomáticos, pelo médico veterinário responsável pela VENS. Animais com mais de 1 sinal clínico foram considerados sintomáticos e animais sem sintomatologia, assintomáticos. Para a classificação foram considerados os seguintes sinais clínicos: presença de ulcerações e alterações cutâneas ou mucosas, linfonodos aumentados, hepatomegalia, esplenomegalia, onicogribose, alopecia, lesões ou alterações oculares aparentes e caquexia. Os animais foram eutanaziados, após a avaliação clínica, pelo médico veterinário responsável pelo serviço de vigilância do município de Nossa Senhora do Socorro. Após o procedimento as carcaças foram imediatamente doadas à aluna responsável pelo presente estudo.

4.4 - Coleta, de amostras de medula óssea, confecção de esfregaços e semeadura em meio de cultura e caracterização da espécie de *Leishmania*

A carcaça do animal foi posicionada em decúbito dorsal, para assepsia e tricotomia do local da pele sobre o osso da epífise da tíbia e, a seguir, foi realizada uma punção aspirativa de medula óssea utilizando-se agulha de 40x1,2mm acoplada à seringa de 20mL, para obtenção de material para possível detecção e isolamento parasitário.

Uma pequena amostra de medula óssea foi utilizada para confecção de esfregaços em lâminas, corados pelo Panótico e, posteriormente, examinados em microscópio de luz (HBO 50 Axiolab - Zeiss), para detecção de formas amastigotas de *Leishmania*. Outra parte do material foi transferida para tubos com meio de cultura bifásico NNN (Novy and MacNeal, 1904; Nicolle, 1908) acrescido de meio Schneider®, suplementado com 20% de soro fetal bovino e encaminhados ao Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia/IOC – FIOCRUZ (LIMP) para tentativa de isolamento parasitário e posterior caracterização da espécie de *Leishmania* implicada na infecção.

No LIMP os tubos contendo as amostras foram mantidas em estufa incubadora B.O.D (FANEM, modelo 347) a 26 °C e examinados semanalmente em microscopia de luz (HBO 50 Axiolab - Zeiss). As culturas positivas foram encaminhadas ao Laboratório de Referência Nacional para Diagnóstico Molecular e Histopatológico de Leishmaniose do Instituto Oswaldo Cruz (LIPMED) para caracterização da espécie de *Leishmania* pela técnica de PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism), segundo Graça et al. (2012).

4.5 - Coleta da pele

Fragments de pele da ponta de orelha, do focinho e da parte interna da coxa dos 25 animais eutanasiados foram coletados para processamento e avaliação histopatológica. Fragmentos de pele da ponta de orelha dos 22 animais e fragmentos do focinho e da parte interna da coxa de 21 animais também foram coletados para quantificação da carga parasitária por qPCR. Todos os fragmentos de pele foram obtidos de áreas sem ulceração. Antes da coleta foi realizada assepsia com álcool 70% e tricotomia das regiões de pele onde foram retiradas amostras de tecido. Parte dos fragmentos obtidos foi fixado em PFA a 4% (Paraformaldeído) em PBS (Tampão Fosfato de Sódio), pH 7,4, mantidos a 4 °C para análise histológica e a outra parte foi mantida em álcool 70% para quantificação da carga parasitária por qPCR.

4.6 - Processamento Histológico

No LIMP, os tecidos cutâneos foram clivados em fragmentos de 5 a 10mm de espessura, acondicionados em cassetes apropriados, (modelo M490-2), e recolocados em PFA a 4% (Paraformaldeído) em PBS (Tampão Fosfato de Sódio), pH 7.4, por 24 horas a 4 °C. Após esse período, os fragmentos foram submetidos a uma bateria de desidratação, clarificação e impregnados em parafina, com o auxílio de um processador automático de tecidos (Leica - TP 1020), na seguinte sequência: álcool etílico 80 °GL (2 horas), 95 °GL (2 horas), 100 °GL-I (2 horas), 100 °GL-II (2 horas), 100 °GL-III (2 horas) e 100 °GL-IV (2 horas) e diafanizados com 3 banhos de Xilol (2 horas) 3 banhos de parafina 56 a 60 °C (2 horas). Por fim o material foi incluído em parafina (Unidade Modular de Inclusão Micron - AP 280) e cortes de 5µm foram obtidos em micrótomo automático (Micron - HM 360).

4.7 – Técnicas de coloração utilizadas

4.7.1 – Hematoxilina Eosina

Está técnica foi utilizada para avaliação do infiltrado inflamatório e da intensidade parasitária nas amostras estudadas, estimados por meio da microscopia de luz, utilizando-se os parâmetros (-) ausente, (+) discreto, (++) moderado e (+++) intenso como descritos por Giunchetti et al. (2008b).

Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de etanol, 100, 90, 80, 70GL, e água destilada e corados durante 7min em hematoxilina de Harris pré-filtrada (2,5g de hematoxilina – Sigma foi dissolvida em 25mL de álcool absoluto, paralelamente, 50g de alúmen de amônia foram dissolvidos em 500mL de água destilada pré-aquecida. As duas soluções foram misturadas e aquecidas até breve fervura, retirada do fogo e acrescida de 1,25g de óxido vermelho de mercúrio. A solução foi imediatamente resfriada, por meio da imersão do frasco em água fria. Foi então acrescido 20mL de ácido acético glacial, e amadurecida por 2 meses. Os cortes foram lavados e azurecidos em água corrente, diferenciados em álcool-ácido (5 gotas de ácido clorídrico em 100mL de álcool etílico a 95GL), novamente lavados em água corrente e corados por 2min em solução alcoólica de eosina (5g de eosina Y “yellowish” - Merck dissolvidas em 200mL de água destilada acrescida de 800mL de álcool etílico absoluto). Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, montados entre lâmina e lamínula com “Entellan” (Merck), examinados e fotografados em microscópio óptico de luz (marca Zeiss, modelo Axioplan 2, equipado com equipamento fotomicrográfico Axiophot 2).

4.7.2 – Azul de Toluidina

Está técnica foi empregada para coloração e detecção de mastócitos.

Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de etanol, 100, 90, 80, 70GL, e água destilada, mergulhados em Eritrosina Orange G por 15 minutos e lavados em água acetificada durante 5 minutos (5 gotas de ácido por 100mL de água tipo I). Em seguida, os cortes foram cobertos com uma solução de azul de toluidina a 1% por 2 a 3 minutos e lavadas rapidamente em água tipo I. A diferenciação foi iniciada em água acetificada até a obtenção de uma

coloração azul uniforme no corte. Após a diferenciação, o excesso de água dos cortes foi retirado com uma secagem parcial com papel absorvente, de forma a mantê-los ainda úmido. Assim, as lâminas foram mergulhadas rapidamente sob agitação em álcool absoluto, durante 2 a 3 segundos. Nessa etapa, o corte foi desidratado e a diferenciação iniciada, extraindo o azul. Finalmente, as lâminas foram mergulhadas em partes iguais de Álcool e Xilol para extrair o excesso de azul até o aparecimento da cor róseo da eritrosina. Assim que esse resultado foi alcançado os cortes foram mergulhados em xilol para interromper a diferenciação. Finalizada a coloração, foi realizada a montagem dos cortes entre lâmina e lamínula com “Entellan” (Merck), examinados e fotografados em microscópio óptico de luz (marca Zeiss, modelo Axioplan 2, equipado com equipamento fotomicrográfico Axiophot 2).

4.8 - Quantificação da carga parasitária por reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)

4.8.1 - Extração de DNA

Para a extração as amostras foram digeridas em tampão de lise (10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50mM Tris, 0.5% SDS (sodium dodecyl sulfate) e 10µL de proteinase K a 20 mg/mL e incubadas por 24 horas a 56 °C. Após a digestão foram adicionados 500µL de fenol e a mistura centrifugadas a 18.600G à 4 °C por 15 minutos. Seguindo, a fase superior foi recolhida e a ela adicionado 500µL de clorofórmio/álcool isoamílico (23:1). A mistura foi agitada por inversão durante 30 segundos e, novamente, submetidas a centrifugação a 18.600 G à 4 °C por 15 minutos. Novamente, o sobrenadante foi recolhido e a ele adicionado 1mL de etanol absoluto. A solução foi agitada durante 30 segundos e submetida a nova centrifugação (18.600 G à 4 °C) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento deixado à temperatura ambiente até a total evaporação do etanol. Finalmente o sedimento foi ressuscitado em 100µL de água livre de DNA e armazenados a 4 °C por uma noite. Na etapa seguinte os DNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro de microvolumes (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific) com leituras das absorbâncias a 260nm e, posteriormente, as concentrações de DNA ajustadas em água tipo I estéril para 10ng/µL.

4.8.2 – Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada para um volume total de 10µL por poço para preparação da placa, utilizando-se o kit Fast SYBR® Green PCR Master Green (Applied Biosystems). Em cada poço foi utilizado: 2µL de amostra (20ng de DNA total), 250 nmolar de cada “primer” e 5µL do mix de reação. Foi utilizado o primer kDNA-3 de específico de *Leishmania* sp. (Weirather et al, 2011) na concentração final de 100nM/poço (“primer forward” [5’ GGGTAGGGGCGTTCTGC 3’] e “primer reverse” [5’ CCCGGCCTATTTTACACCAACC 3’]). Como controle de reação cada amostra foi também submetida à amplificação pelo endogene GAPDH (“primer forward” [5’ TCAACGGATTTGGCCGTAGG 3’] e “primer reverse” [5’ TGAAGG GGTGATTGATGGG 3’]). Simultaneamente, uma curva de concentração foi realizada em duplicata com DNA de promastigota de *L. infantum* em concentrações decrescentes de 20ng a 0,2 pg. A reação foi realizada em um termociclador (StepOnePlus™, Thermo Fisher Scientific) com os seguintes tempos e temperaturas: 1 ciclo de 20 segundos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 3 seg a 95 °C e 30 segundos a 60 °C, intercalados, seguida de curva de dissociação.

4.9 – Análise estatística

Nas avaliações semiquantitativas dos diferentes segmentos cutâneos, por análise histológica, foram consideradas distribuição, localização, tipo e intensidade do infiltrado inflamatório, além da presença de amastigotas. Para determinação da intensidade de infiltrado foi considerado a seguinte classificação: (-) = ausente, (+) = discreto, (++) = moderado, (+++) = acentuado.

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 7.0. Foram consideradas significativas diferenças com $p < 0.05$.

Teste de correlação de Spearman foi empregado para avaliar a correlação entre diferentes variáveis e o teste de Kruskal-Wallis para analisar diferença de carga parasitária entre os diferentes segmentos cutâneos.

5 Resultados

5.1. Aspectos clínicos

Dos 22 animais sororreagentes avaliados clinicamente, apenas 1/22 (4,5%) foi considerado assintomático e 21/22 (95%) sintomáticos, ou seja, apresentaram pelo menos um sinal clínico sugestivo da doença. Na avaliação clínica, hepatomegalia, esplenomegalia e caquexia foram as alterações clínicas sistêmicas mais frequentes 16/21, observadas em 76% dos animais, seguida de linfadenomegalia do poplíteo em 11/21 (52%) e onicogribose em 4/21 (19%). Os sinais clínicos oculares não foram frequentes, sendo observadas somente em 4/21 (19%) dos cães (Figura 5.1), no qual apresentavam, na sua maioria, quadro de uveíte. Alterações cutâneas como alopecia, acompanhada de áreas de descamação foram observadas em 11/21 (52%) dos cães. Alopecia generalizada foi registrada em 7/11 (64%) dos cães, nas orelhas em 2/11 (18%), periorbital em 1/11 e área de focinho e patas 1/11 (9%). Foi registrada também a presença de lesão cutânea em 7/21 (33%) dos animais. Desses, 5/7 (72%) apresentaram lesão em ponta de orelha (Quadro 5.1).

5.2 Isolamento e caracterização da espécie de *Leishmania* (PCR-RFLP).

O isolamento do parasito, em cultura de material obtido por meio da punção da medula óssea, foi possível em duas amostras (9%) das 22 coletadas. Nas demais culturas não foi possível o acompanhamento da evolução da cultura, devido a contaminação secundária por condições não favoráveis no momento da coleta.

Os parasitos isolados apresentaram o padrão de restrição, nas enzimas estudadas (BstUI, Mbol, HaeIII), compatível com *Leishmania infantum* (Figura 5.2).

5.3 Citologia da medula óssea

A avaliação citológica das amostras da medula óssea dos 22 cães revelou a presença de formas amastigotas de *Leishmania infantum* (Figura 5.3) em 12/22 (54,5%) das amostras examinadas (Quadro 5.2).

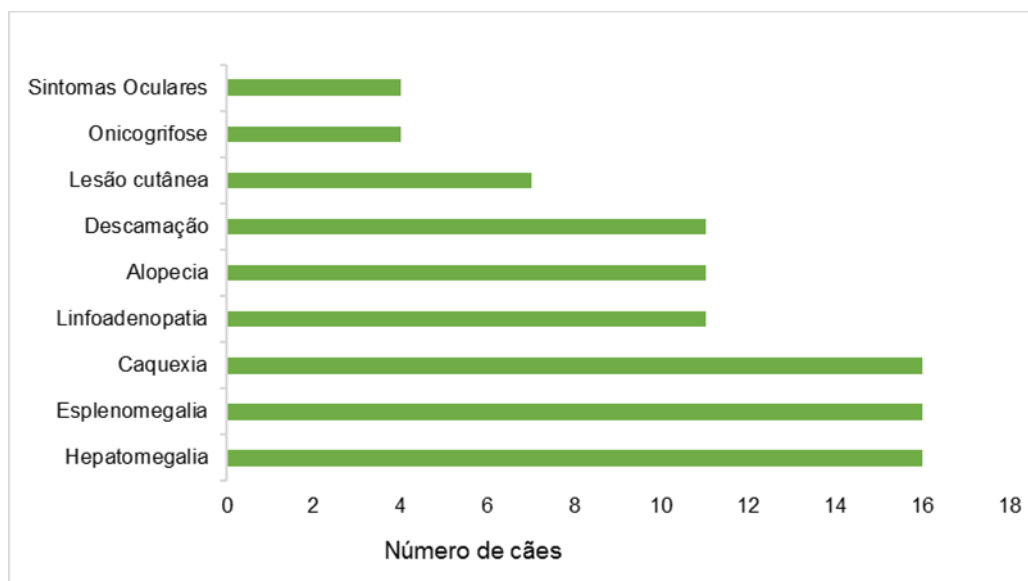


Figura 5.1 – Ocorrência de sinais clínicos em cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe.

Quadro 5.1 – Sinais clínicos observados em cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, SE.

Id. Animal	SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS									
	Onicogribose	Hepatomegalia	Esplenomegalia	Linfonodo aumentado	Caquexia	Sinais clínicos oculares	Descamação	Lesão cutânea	Alopecia	Classificação Clínica
01	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim (Opacidade)	Sim		Sim (peri-orbital)	SINT.
02	Sim	Sim	Sim		Sim					SINT.
03										ASSINT.
04	Sim	Sim	Sim		Sim			Sim (ponta de orelha)		SINT.
05		Sim	Sim							SINT.
06		Sim	Sim	Sim	Sim		Sim		Sim (Generalizada)	SINT.
07		Sim	Sim	Sim		Sim (Secreção)	Sim	Sim (ponta de orelha)	Sim (Generalizada)	SINT.
08		Sim		Sim	Sim		Sim		Sim (Generalizada)	SINT.
09			Sim	Sim	Sim		Sim	Sim	Sim (Generalizada)	SINT.
10		Sim	Sim	Sim	Sim		Sim		Sim (Generalizada)	SINT.
11		Sim	Sim		Sim					SINT.
12		Sim	Sim	Sim	Sim					SINT.
13					Sim		Sim			SINT.
14					Sim	Sim	Sim	Sim (ponta de orelha)	Sim (orelha)	SINT.
15		Sim	Sim	Sim			Sim	Sim (ponta de orelha)	Sim (orelha)	SINT.
16		Sim	Sim	Sim	Sim			Sim (ponta de orelha)		SINT.
17				Sim	Sim		Sim		Sim (generalizada)	SINT.
18	Sim					Sim		Sim		SINT.
19		Sim	Sim	Sim	Sim		Sim		Sim (Generalizada)	SINT.
20		Sim	Sim		Sim					SINT.
21		Sim	Sim		Sim		Sim		Sim (focinho)	SINT.
22		Sim	Sim				Sim			SINT.

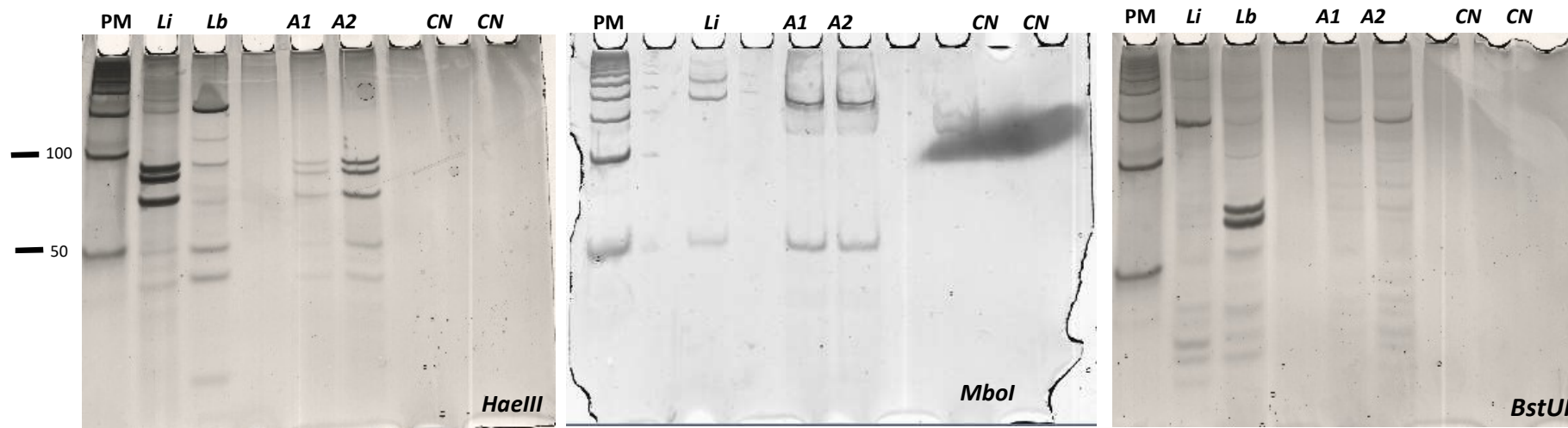


Figura 5.2 – Caracterização dos parasitos isolados de medula óssea de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, SE por PCR-RFPL. Visualização do padrão de bandas obtido após digestão enzimática do gene hsp70, com as enzimas de restrição BstUI, Mbol e HaellI, em gel de poliacrilamina 12,5%. PM- Marcador de peso molecular de 50pb; Li – *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP75); L.b. – *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); CN – controle negativo.

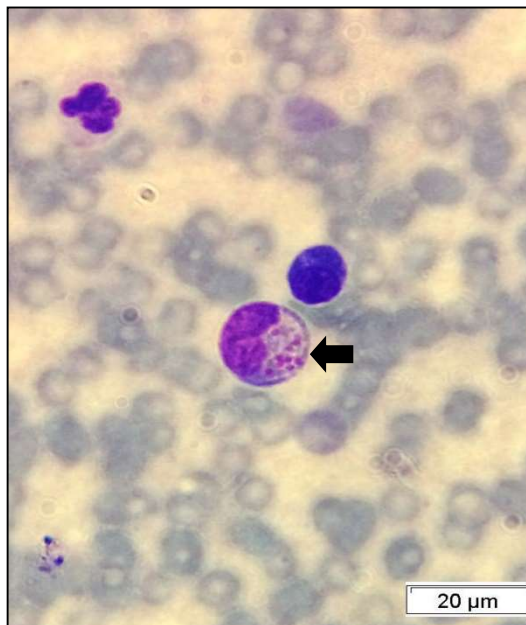


Figura 5.3 – Citologia da medula óssea de cão com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. Formas amastigotas no interior de macrófago (seta). Panótico (1000X)

Quadro 5.2 – Resultado individual da detecção de formas amastigotas em esfregaço de medula óssea de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe.

Id. do animal	Presença de amastigota
01	Positivo
02	Positivo
03	Negativo
04	Positivo
05	Negativo
06	Positivo
07	Positivo
08	Positivo
09	Negativo
10	Negativo
11	Negativo

Id. do animal	Presença de amastigota
12	Positivo
13	Positivo
14	Positivo
15	Negativo
16	Positivo
17	Negativo
18	Negativo
19	Positivo
20	Positivo
21	Negativo
22	Negativo

5.4 Quantificação da carga parasitária por reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)

O qPCR detectou a presença do DNA de *Leishmania* em todos os cães sororreagentes para LVC e na maior parte dos tecidos analisados. A carga parasitária diferiu entre os diferentes animais. Entretanto, de forma geral, foi homogênea quando se avaliou os diferentes segmentos cutâneos de um mesmo animal (Figura 5.4). Não se observando diferença quando comparamos a carga parasitária nos diferentes segmentos cutâneos de diferentes animais (Figura 5.5).

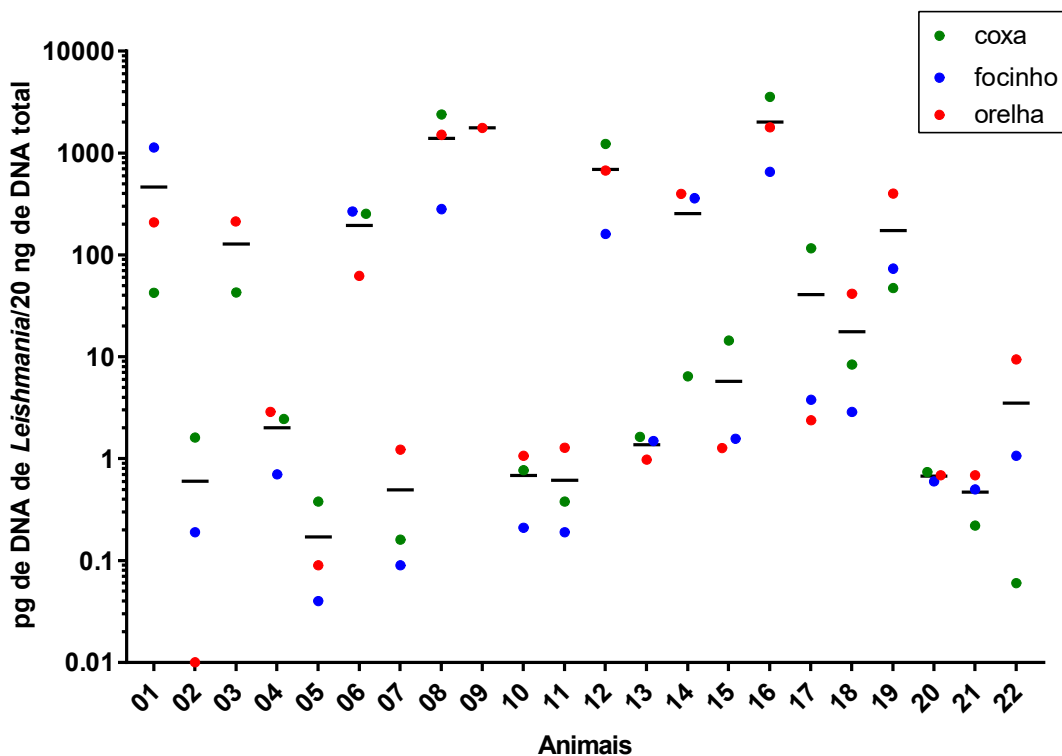


Figura 5.4 - Quantificação da carga parasitária por qPCR em diferentes fragmentos cutâneos provenientes de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. A barra representa a média aritmética entre os diferentes tecidos de um mesmo cão. Como descrito no item 4.5 não foram coletados fragmentos de focinho e coxa do cão número 9.

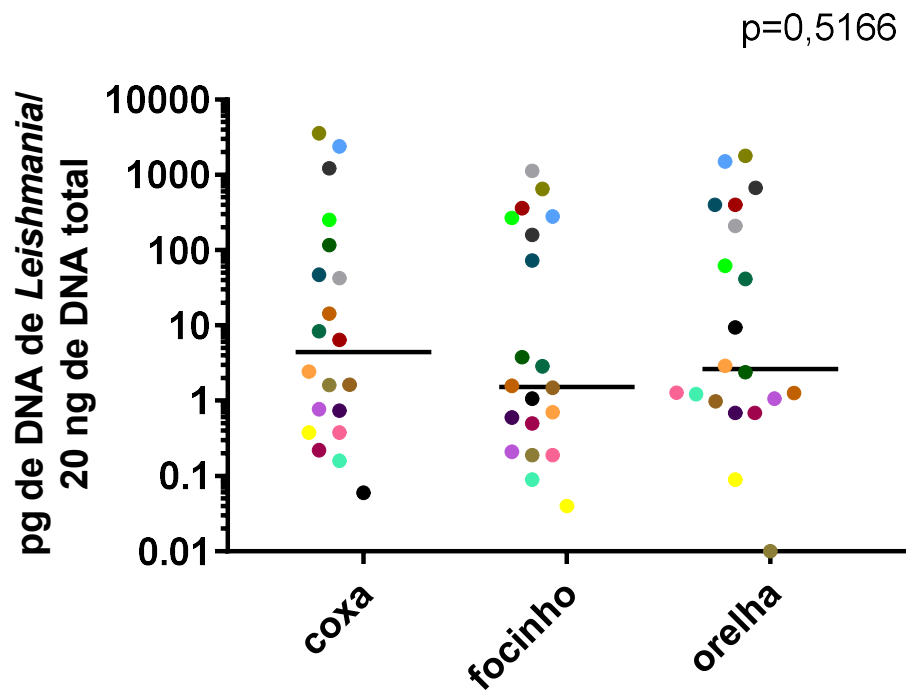


Figura 5.5 - Quantificação da carga parasitária por qPCR em diferentes fragmentos cutâneos provenientes de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. Cada animal está representado por uma cor que se repete para cada segmento cutâneo avaliado. A barra representa a mediana das amostras provenientes dos mesmos tecidos entre os diferentes animais. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

5.5 Avaliação histopatológica dos segmentos de pele

5.5.1 Intensidade do infiltrado inflamatório

O quadro histológico não diferiu muito de um animal para outro. Os 22 animais sororreagentes apresentaram algum grau de infiltrado inflamatório em pelo menos um segmento de pele analisado. Foram analisados segmentos de pele proveniente da ponta de orelha, focinho e parte interna da coxa de cada animal, totalizando 66 segmentos cutâneos. Destes, 52/66 (78,8%) apresentaram células inflamatórias. Vinte e dois (33%) em tecido cutâneo proveniente da ponta de orelha; 18/66 (27,3%) de focinho; e 12/66 (18,1%) da parte interna da coxa. A intensidade do infiltrado variou de discreto a acentuado nos diferentes segmentos analisados. A maior concentração de células inflamatórias foi observada nos segmentos de tecido cutâneo proveniente da orelha, em 7/22 (31,8%) das amostras a intensidade foi acentuada (+++), em outras 7/22 (31,8%) moderado (++) e em 8/22 (36,5%) discreto (+). Nas amostras provenientes do focinho, em 1/22 (4,5%) o infiltrado foi acentuado; 3/22 (13,6%) moderado e 14/22 (63,6) discreto. Na parte interna da coxa, 1/22 (4,5%) foi acentuado e 11/22 (50%) discreto (Tabela 5.1). Observou-se uma correlação positiva entre a intensidade de infiltrado inflamatório e carga parasitária, ou seja, quanto maior a carga parasitária mais intenso é o infiltrado inflamatório (Fig 5.6).

Tabela 5.1 – Grau de infiltrado inflamatório nos segmentos de tecido cutâneo de 22 cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe.

Grau de infiltrado inflamatório	Orelha	Focinho	Coxa
-	0	18,2% (4/22)	5,5%(10/22)
+	31,8% (7/22)	63,6% (14/22)	50% (11/22)
++	31,8% (7/22)	13,6% (3/22)	0
+++	36,5% (8/22)	4,5% (1/22)	4,5% (1/22)
Total	100% (22/22)	81,81% (18/22)	54,5% (12/22)

(-) = ausente; (+) = discreto; (++) = moderado; (+++) = acentuado

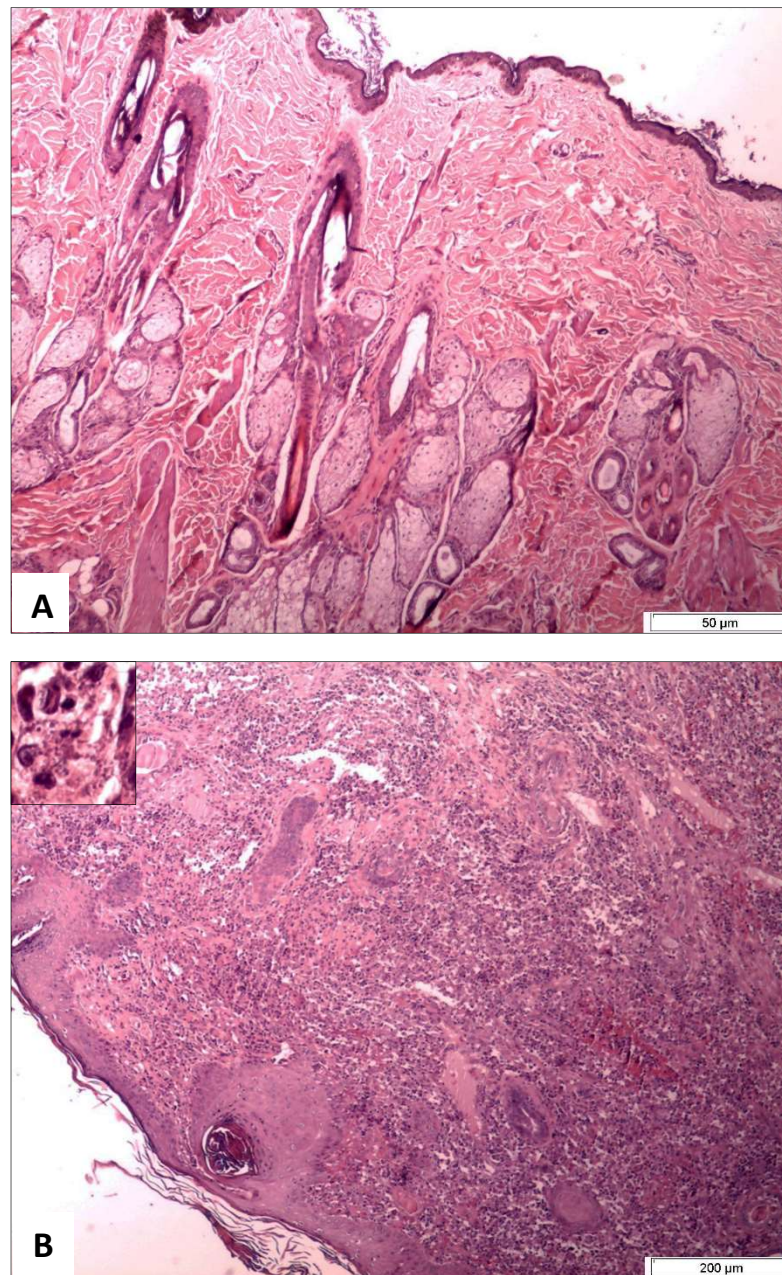


Figura 5.6 - Análise histopatológica de fragmentos cutâneos de cão com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. A: Ausência de amastigotas e infiltrado inflamatório em pele de coxa do cão 13, HE (400X); **B:** Pele da orelha do cão 19 com presença de macrófagos altamente parasitados associado a infiltrado inflamatório intenso e difuso, HE (100X). Em maior aumento (1000X), amastigotas em macrófagos.

5.5.2 Caracterização do infiltrado inflamatório

A presença de infiltrado inflamatório misto com distribuição difusa foi uma constante nas amostras de tecidos cutâneos avaliados, predominando o infiltrado do tipo linfoplasmocitário em 21/66 (31%) e linfohistioplasmocitário em 29/66 (44%) das amostras avaliadas. Também foram notados neutrófilos em 27/66 (41%), além de 17/66 (26%) de mastócitos e formas amastigotas de *L. infantum* em 26/66 (40%) dos fragmentos cutâneos avaliados (Tabela 5.2 e Fig. 5.7).

Como mostrado na tabela 5.2, no tecido cutâneo da orelha o infiltrado inflamatório do tipo linfoplasmocitário estava presente em 4/22 (18%) das amostras e linfohistioplasmocitário em 16/22 (73%). Em 5/22 (23%) foram observados neutrófilos e em 9/22 (41%) mastócitos, com intensidade variando de moderada a acentuada (Fig. 5.8). Associado ao infiltrado inflamatório foi possível observar a presença de formas amastigotas de *L. infantum* em 18/22 (82%) das amostras analisadas.

Nos fragmentos provenientes do focinho o infiltrado do tipo linfoplasmocitário foi observado em 12/22 (55%) e linfohistioplasmocitário em 5/22 (23%). Neutrófilos estavam presentes em 2/22 (9%) das amostras, além da presença intensa de mastócitos em 1/22 (4,54%) e discreta em 2/22 (9%). 4/22 (18%) das amostras de pele apresentaram formas amastigotas associadas.

Ainda na tabela 5.2 podemos notar que o tecido cutâneo da parte interna da coxa apresentou infiltrado linfoplasmocitário em 5/22 (23%) e linfohistioplasmocitário em 6/22 (27%) dos fragmentos examinados. Destes em, 2/22 (9%) o infiltrado também foi observado em regiões perifoliculares. A presença de neutrófilos foi registrada em 2/22 (9%) e mastócitos, variando de discreto a acentuado, em 7/22 (32%) (Fig. 5.9).

Tabela 5.2 – Avaliação do infiltrado celular observado nos segmentos de tecido cutâneo de 22 cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, no município de Nossa Senhora do Socorro, SE.

Tecido	Lin/Plasm	Lin/Hist/Plasm	Neut	Mast	Amast
Orelha	18% (4/22)	73% (16/22)	23% (5/22)	41% (9/22)	82% (18/22)
Focinho	55% (12/22)	23% (5/22)	9% (2/22)	14% (3/22)	18% (4/22)
Coxa	23% (5/22)	27% (6/22)	9% (2/22)	23% (5/22)	32% (7/22)

Lin/Plasm – linfoplasmocitário; Lin/Hist/Plasm – linfohistioplasmocitário; Neut - neutrófilos; Mast – mastócitos; Amast - amastigotas.

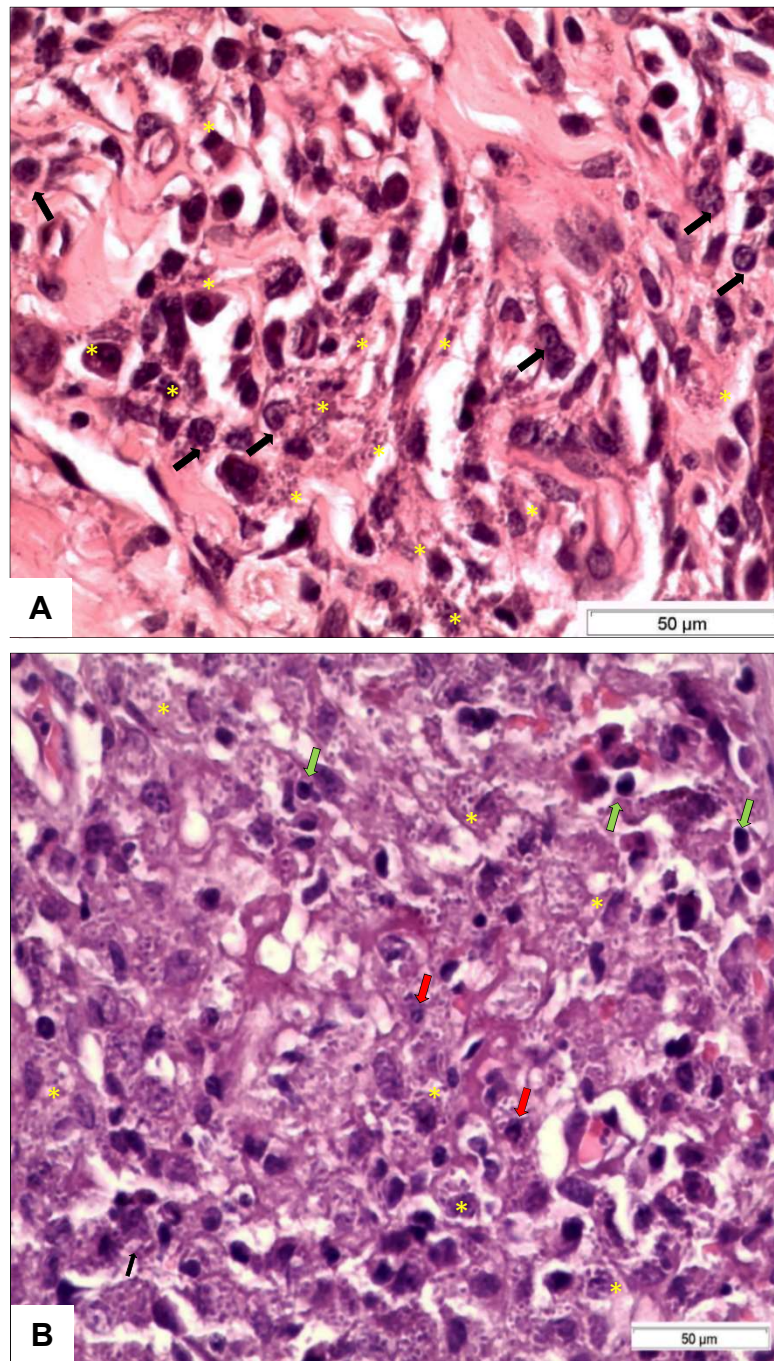


Figura 5.7 - Análise histopatológica de fragmentos cutâneos de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. A: Pele do focinho do cão 14 apresentando infiltrado inflamatório com predomínio de plasmócitos (setas) e amastigotas (asteriscos amarelos), HE (400x); **B:** Pele da orelha do cão 9 mostrando infiltrado inflamatório mostrando histiócitos intensamente parasitados (asteriscos), linfócitos (setas verde) e neutrófilos (setas vermelhas), HE (400x).

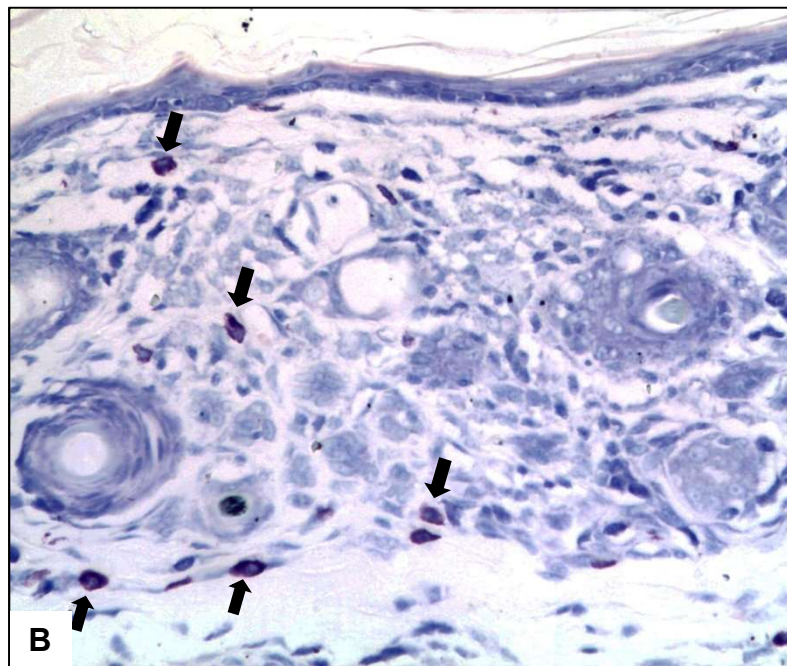
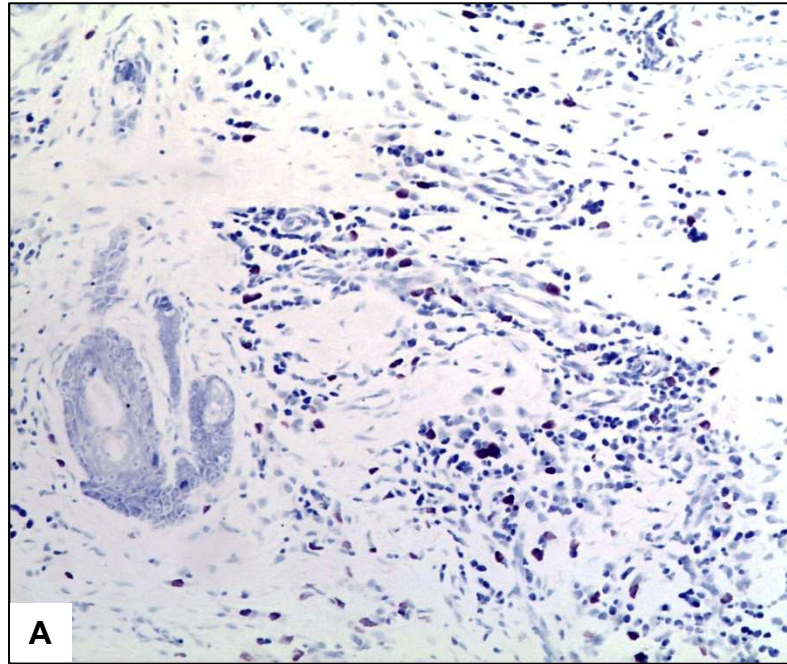


Figura 5.8 - Análise histopatológica de fragmentos cutâneos provenientes da orelha de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. A: Presença intensa de mastócitos na derme do cão 6, Azul de Toluidina (40x); **B:** Mastócitos em maior aumento no cão 10, (setas), Azul de Toluidina (400X).

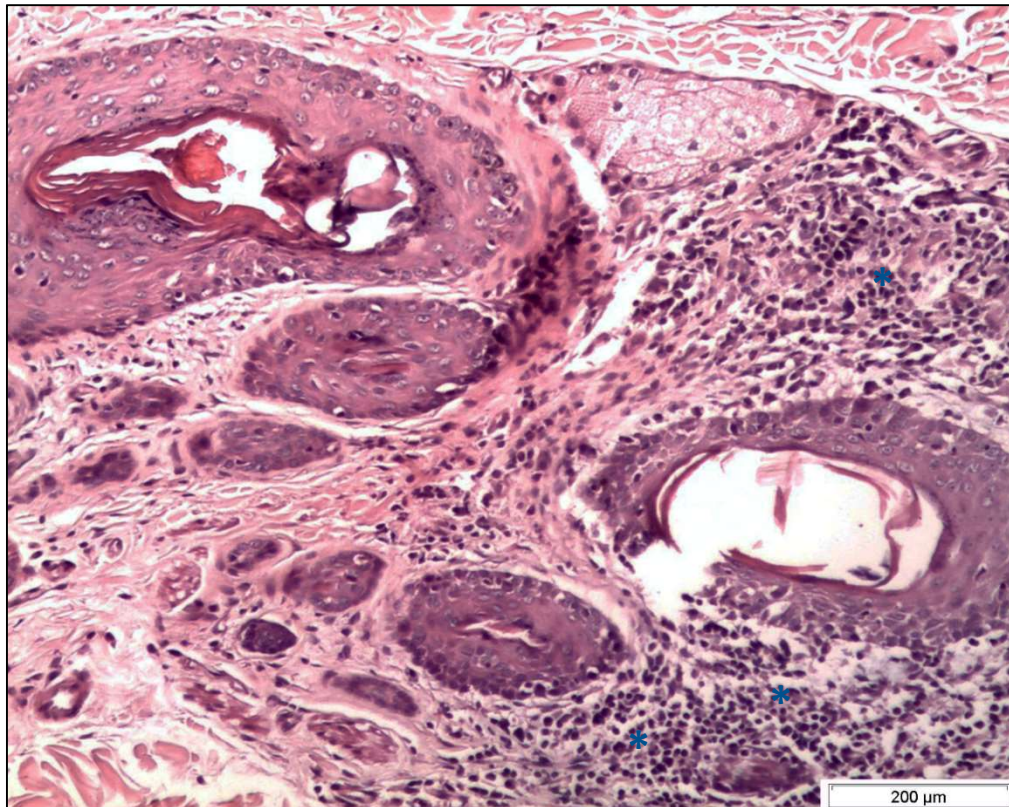


Figura 5.9 - Análise histopatológica de fragmentos cutâneos provenientes da coxa de cão com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. Área de infiltrado inflamatório perifolicular (asteriscos) presente no cão 12.

O mesmo padrão inflamatório observado nos animais soropositivos, foi notado nos 3 animais soronegativos incluídos neste estudo. O animal C1 (controle 1) apresentou, no fragmento de orelha, discreto infiltrado linfoplasmocitário, com raros histiócitos e neutrófilos, além da presença intensa de mastócitos. No fragmento de focinho observou-se apenas discreto infiltrado linfoplasmocitário; o tecido cutâneo da pele da coxa não apresentou alterações histopatológicas. No animal C2, registrou-se infiltrado inflamatório linfoplasmocitário de intensidade moderada, somente no fragmento de orelha, com presença discreta de histiócitos e intensa de neutrófilos. O animal C3 apresentou padrão inflamatório linfoplasmocitário moderado e presença discreta de histiócitos nos três segmentos de pele avaliados.

5.5.3 Avaliação da carga parasitária na histologia

A carga parasitária dos diferentes segmentos cutâneos analisados variou de discreta a intensa dependendo do segmento de pele avaliado. Foi possível observar formas amastigotas de *L. infantum* dentro e fora de macrófagos, em diferentes regiões da derme (Fig. 5.10).

Os fragmentos cutâneos provenientes da orelha foram os mais frequentemente parasitados. Formas amastigotas foram constatadas em 18/22 (82%) das amostras. Dessas, 3/22 (14%) apresentaram carga parasitária intensa, 1/22 (4,54%) acentuada, 1/22 (4,54%) moderada e 13/22 (59%) discreta. Em 4/22 (18%) das amostras não foram evidenciadas formas parasitárias. As amostras de tecido cutâneo do focinho apresentaram carga parasitária acentuada em 2/22 (9%); moderada em 1/22 (4,54%) e discreto também em 1/22 (4,54%). Em 18/22 (82%) das amostras não foram observadas amastigotas. A pele proveniente da região interna da coxa mostrou uma carga parasitária intensa em apenas 1/22 (4,54%), moderada também em 1/22 (4,54%) e discreta em 5/22 (23%) nos fragmentos examinados. 15/22 (68%) das amostras não mostraram a presença de amastigotas (Tabela 5.3).

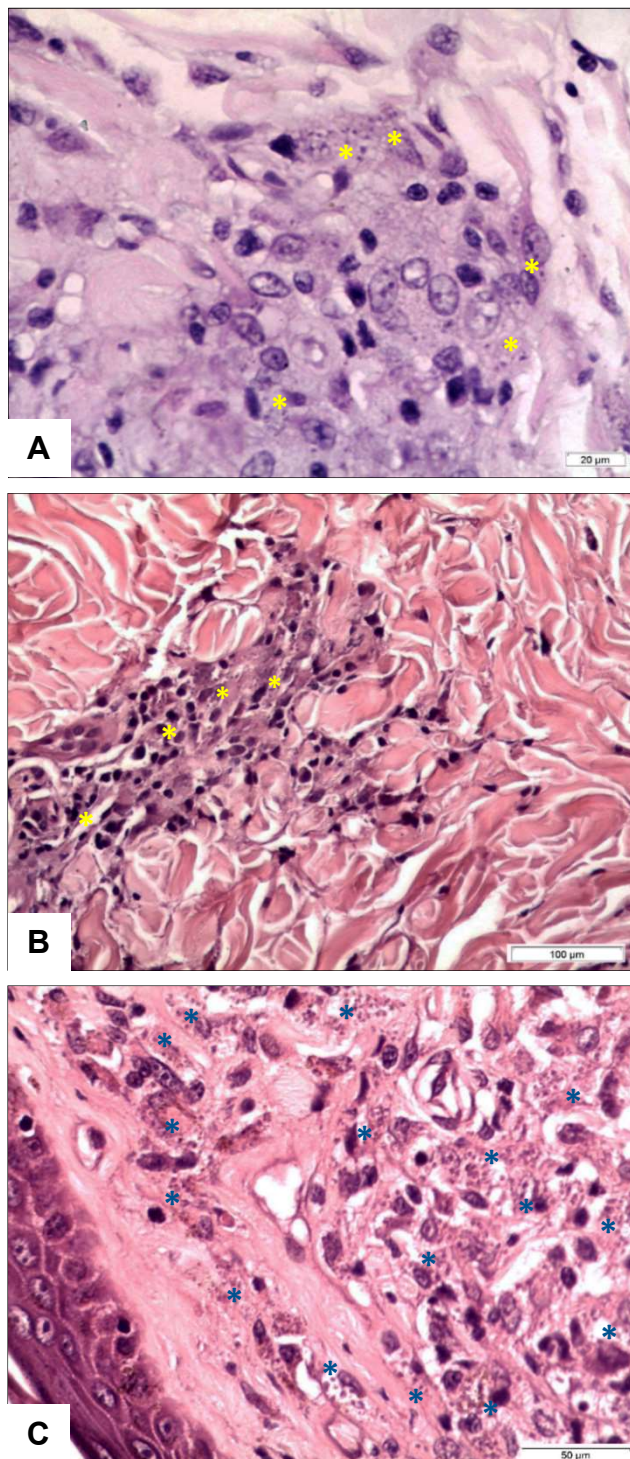


Figura 5.10 - Análise histopatológica de fragmentos cutâneos provenientes da orelha de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. A, B e C: Derme mostrando a presença de amastigotas (áreas com asteriscos) em intensidade diferente, HE. Em A, intensidade discreta (1000X), cão 8; B, moderada (200X), cão 16 e C, intensa (400X), cão 16.

Tabela 5.3 – Resultado da avaliação histológica quanto a presença de formas amastigotas e carga parasitária em segmentos de tecido cutâneo de 22 cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, no município de Nossa Senhora do Socorro, SE.

	Amastigotas		Carga Parasitária		
	Ausente	Presente	+	++	+++
Orelha	18% (4/22)	82% (18/22)	59% (13/22)	4,5% (1/22)	18% (4/22)
Focinho	82% (18/22)	18% (4/22)	4,5% (1/22)	4,5% (1/22)	9% (2/22)
Coxa	68% (15/22)	32% (7/22)	23% (5/22)	4,5% (1/22)	4,5% (1/22)

(+) = discreto; (++) = moderado; (+++) = acentuado

5.5.4 Alterações epidérmicas

As figuras 5.11, 5.12 e 5.13 mostram as alterações epidérmicas observadas nos segmentos cutâneos avaliados. Hiperkeratose foi a alteração de maior ocorrência nos fragmentos cutâneos avaliados, constatada em 23/66 (35%) das amostras. Destes, 18/22 (81,8%) de ocorrência foi observada em fragmentos de tecido cutâneo de narina; 4/22 (18%) de orelha e 1/22 (4,5%) em pele da parte interna da coxa. Incontinência pigmentar foi outra alteração bem frequente, entretanto, somente observada nos fragmentos provenientes dos focinhos dos animais, sendo registrada em 17/22 (77%) das amostras. Outra alteração frequente, também notada nos fragmentos provenientes do focinho, foi a acantose, ocorrendo em 11/22 (50%) das amostras. Formação de crostas estavam presentes em 15/66 (23%) das amostras, sendo, 8/22 (36%) nos tecidos das narinas e 7/22 (32%) na orelha. Duas alterações importantes registradas nos segmentos cutâneos foram ulceração e fibrose. Ulceração foi registrada em 7/66 (11%) das amostras, com 4/22 (18%) em orelha; 2/22 (9%) em narina; e 1/22 (4,5%) em coxa. Fibrose ocorreu em 5/66 (8%), com 2/22 (9%) em orelha; e 3/22 (14%) em coxa. Foliculite associada a presença de fungos foi uma

alteração epidérmica registrada em 6/66 (9%) dos fragmentos, com registros em segmentos de pele provenientes da orelha (2/22), focinho (2/22) e coxa (2/22).

Nos fragmentos cutâneos, exceto nos provenientes da parte interna da coxa, dos animais soronegativos utilizados nesse estudo também foram observadas alterações descritas anteriormente para os animais sororreagentes. O animal C1 apresentou, nos fragmentos de pele de orelha, um quadro de foliculite, provavelmente associada à sarna demodécica e mostrou incontinência pigmentar no focinho. No animal C2 foi possível registrar ulceração e formação de crosta no tecido proveniente da orelha e hiperqueratose, acantose epidérmica e incontinência pigmentar no focinho. O animal C3 apresentou alterações somente no tecido proveniente do focinho, onde foi possível registrar hiperqueratose, acantose epidérmica e incontinência pigmentar.

5.6 Comparação entre carga parasitária por qPCR e intensidade parasitária por análise histológica

Quando a carga parasitária obtida por PCR foi comparada com a intensidade parasitária observada nas avaliações histológicas, pode-se observar uma correlação positiva. Isto é, quanto maior a quantidade de parasitos visualizada na histologia, maior a carga parasitária estimada por qPCR (Fig. 5.14), mostrando que as duas técnicas são complementares.

5.7 Comparação entre a intensidade de infiltrado inflamatório e a intensidade parasitária por análise histológica

De forma semelhante, notamos que a intensidade do infiltrado inflamatório estava correlacionado positivamente com a carga parasitária observada na histopatologia (Fig. 5.15).

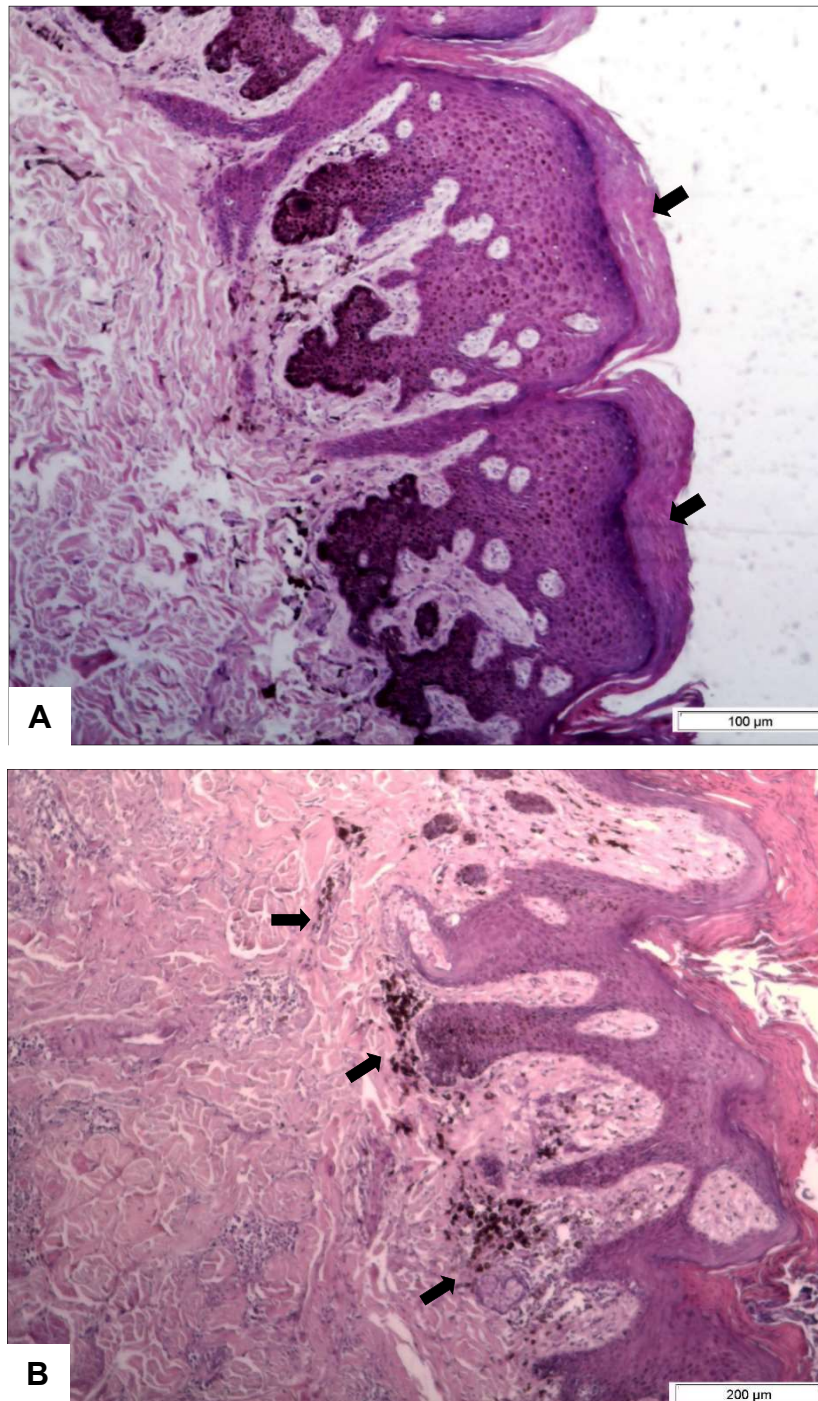


Figura 5.11 - Análise histopatológica de fragmentos cutâneos provenientes de focinho de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. A: Pele de focinho do cão 5, com hiperqueratose (setas), HE (40X); **B:** Pele de focinho do cão 7 mostrando incontinência pigmentar, HE (100X).

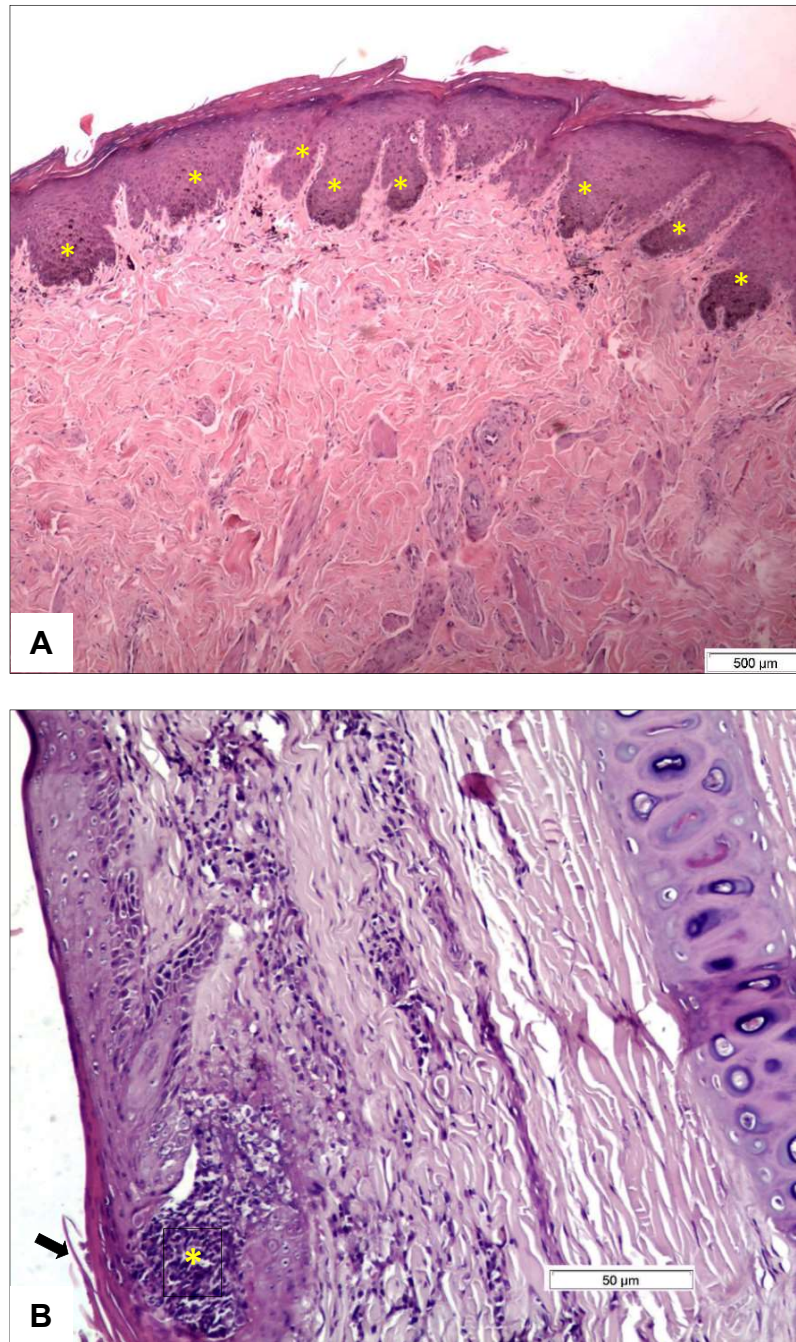


Figura 5.12 - Análise histopatológica de fragmentos cutâneos de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. A: Pele de focinho do cão 11 mostrando acantose (asteriscos), HE (40X); **B:** Pele de orelha do cão 6 com formação de crosta (seta) e erosão (asteriscos), HE (40X);

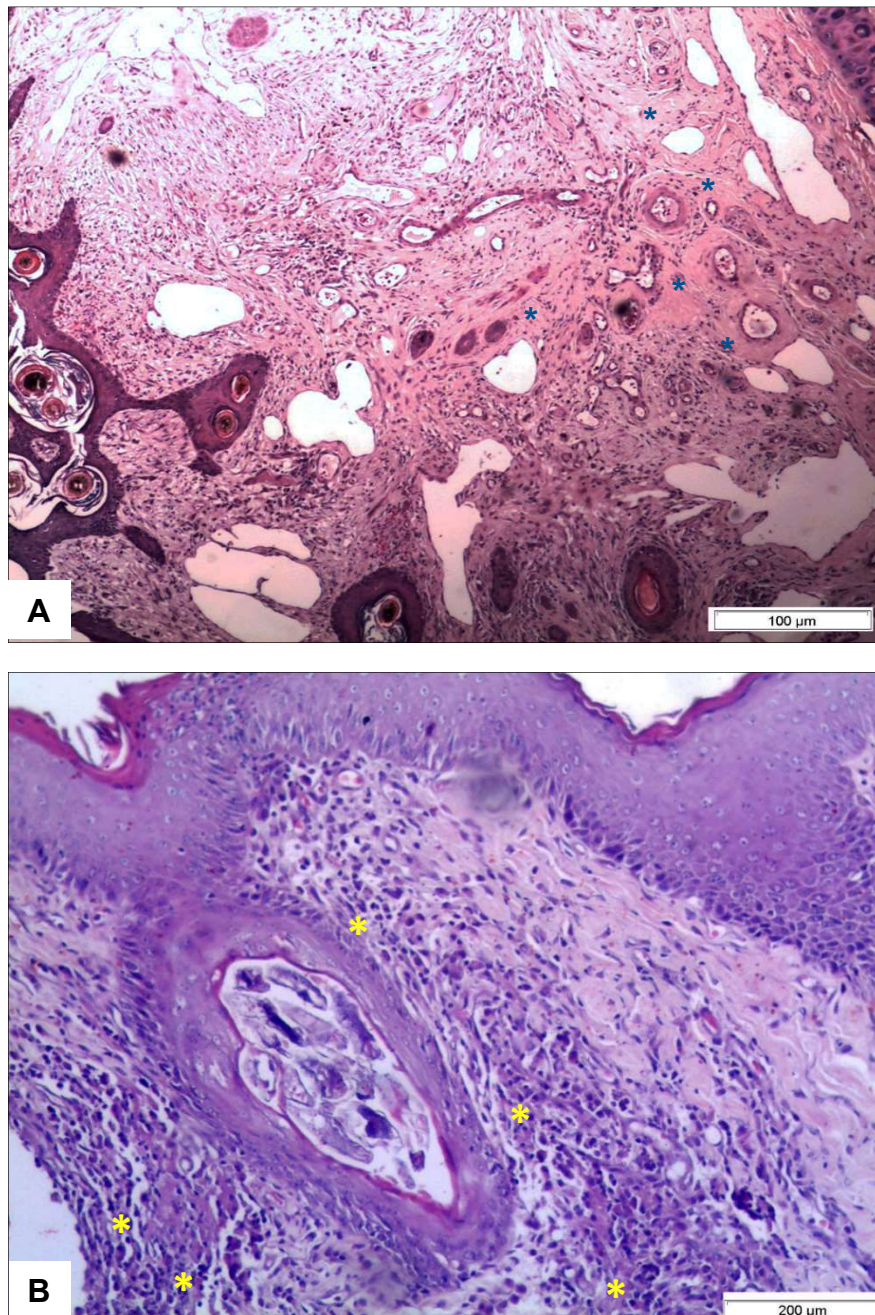


Figura 5.13 - Análise histopatológica de fragmentos cutâneos de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. A: Pele de orelha do cão 15 mostrando áreas de fibrose (asteriscos), HE (40X); **B:** Pele da parte interna da coxa do cão 01 com áreas de foliculite (asteriscos), HE (100X).

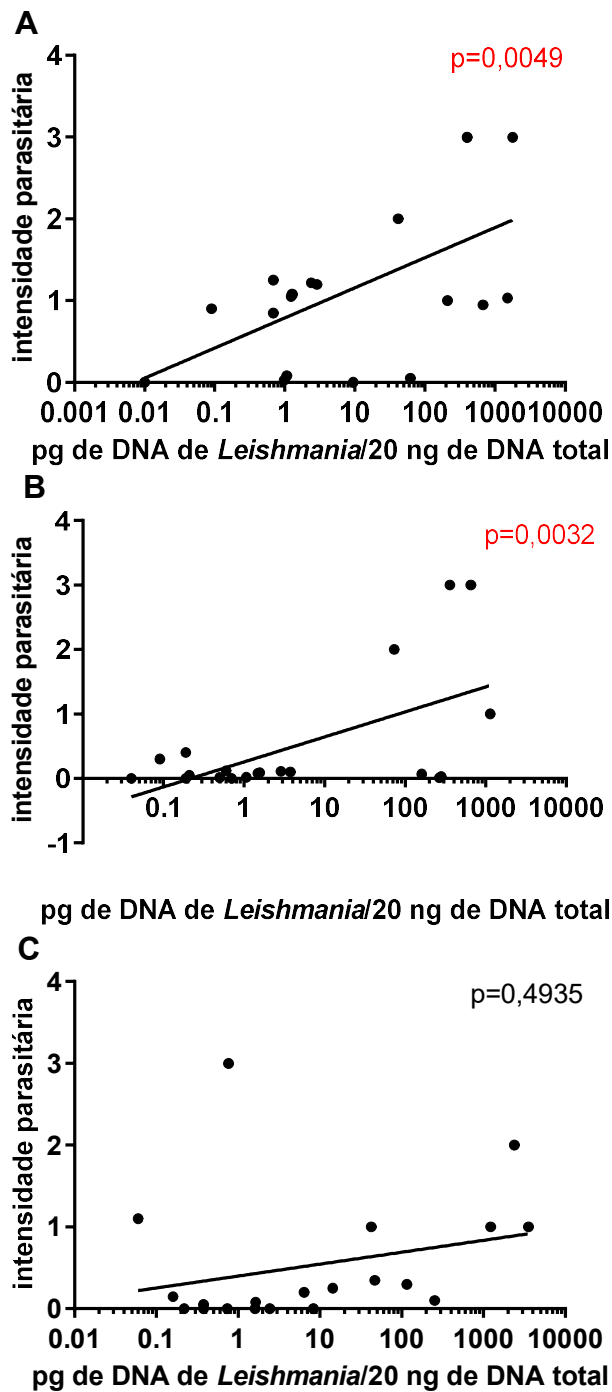


Figura 5.14 - Comparação entre a carga parasitária e a intensidade parasitária nos diferentes segmentos de pele de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. O eixo X mostra a carga parasitária avaliada por qPCR e o eixo Y a intensidade parasitária estimada por avaliação histológica. **A** - orelha; **B** - focinho e **C** - pele da coxa. Teste estatístico de correlação de Spearman, sendo considerados significativos valores de $p < 0.05$. Foi traçada também uma linha de tendência semilogarítmica.

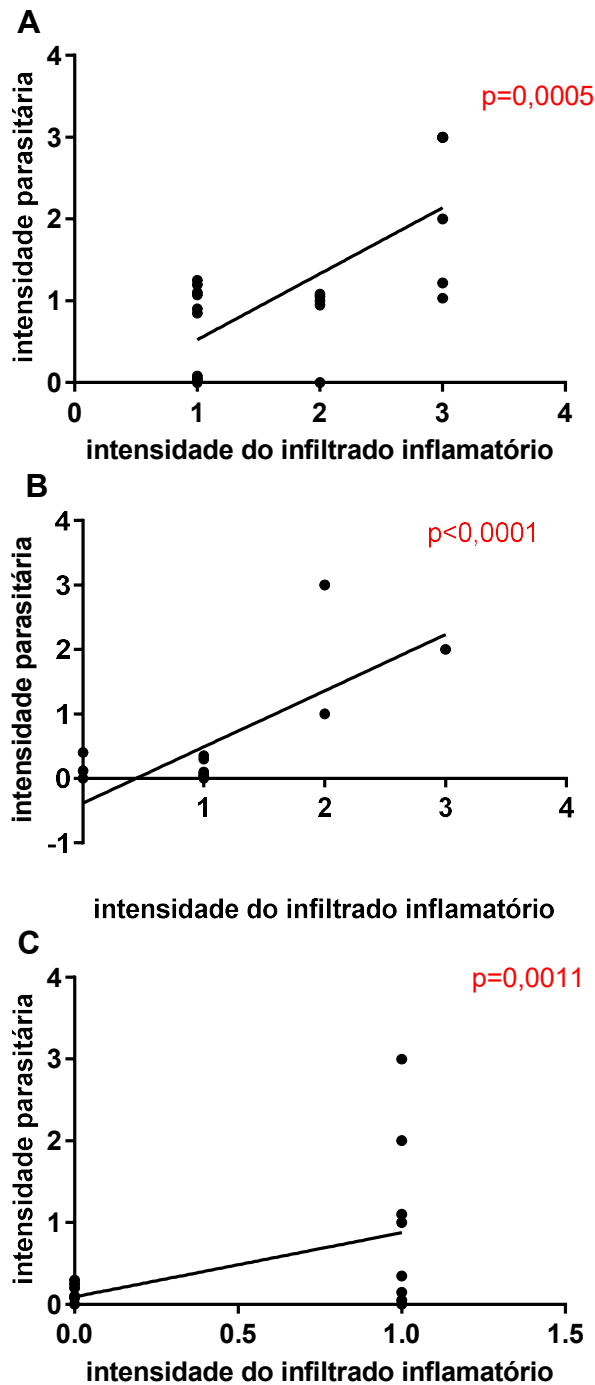


Figura 5.15 - Comparação entre a intensidade parasitária e a intensidade do infiltrado inflamatório nos diferentes segmentos de pele de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. O eixo X mostra a intensidade do infiltrado inflamatório e o eixo Y a intensidade parasitária ambos estimados por avaliação histológica. **A** - orelha; **B** - focinho e **C** - pele da coxa. Teste estatístico de correlação de Spearman, sendo considerados significativos valores de $p<0.05$. Foi traçada também uma linha de tendência linear.

5.8 Comparação entre a intensidade do infiltrado inflamatório por histologia e a carga parasitária por qPCR

Foi ainda observada correlação positiva entre a intensidade do infiltrado inflamatório, estimado por avaliação histológica, e a carga parasitária estimada por qPCR na pele da orelha e do focinho dos animais. A pele da coxa não apresentou correlação significativa com a intensidade do infiltrado inflamatório (Fig. 5.16).

5.9 Comparação entre a carga parasitária por qPCR e a quantidade de sinais clínicos

Finalmente, ao compararmos a quantidade de sinais clínicos observados com a carga parasitária, não foi vista correlação com nenhum dos segmentos cutâneos (Fig. 5.17), mostrando que a quantidade de parasitos na pele não tem relação com a sintomatologia.

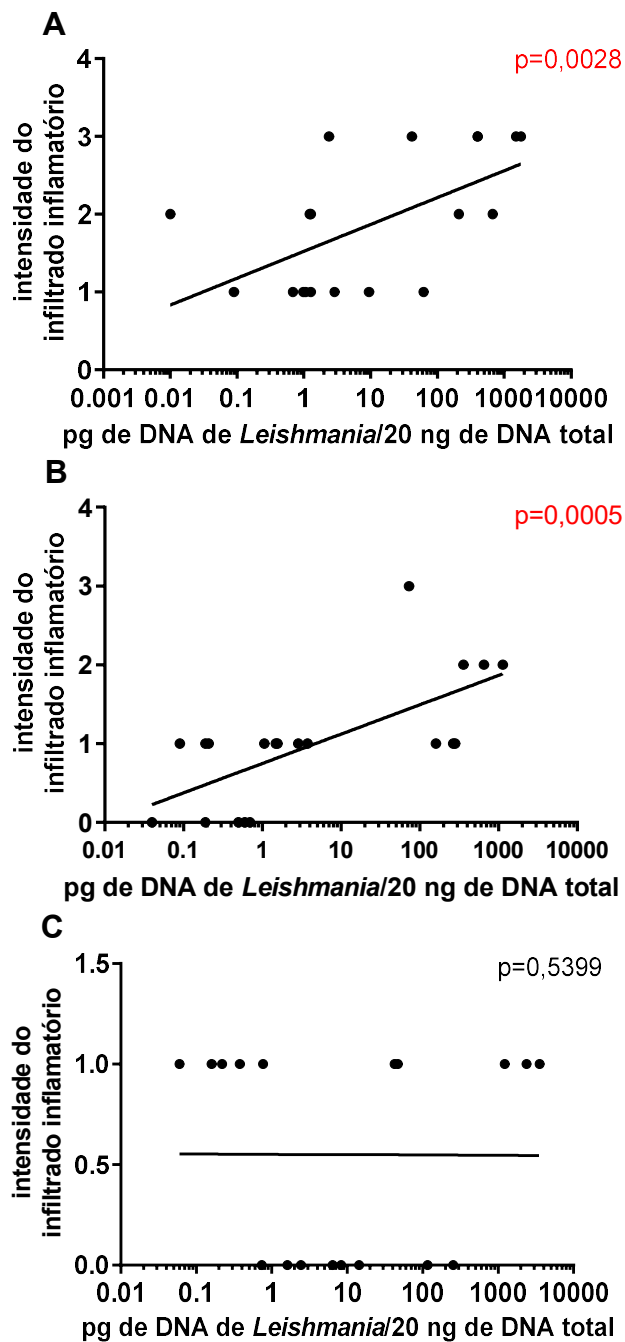


Figura 5.16 - Comparação entre a carga parasitária e a intensidade de infiltrado inflamatório nos diferentes segmentos de pele de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. O eixo X mostra a carga parasitária estimada por qPCR e o eixo Y a intensidade do infiltrado inflamatório por análise histológica. **A** - orelha; **B** - focinho e **C** - pele da coxa. Teste estatístico de correlação de Spearman, sendo considerados significativos valores de $p < 0.05$. Foi traçada também uma linha de tendência semilogarítmica.

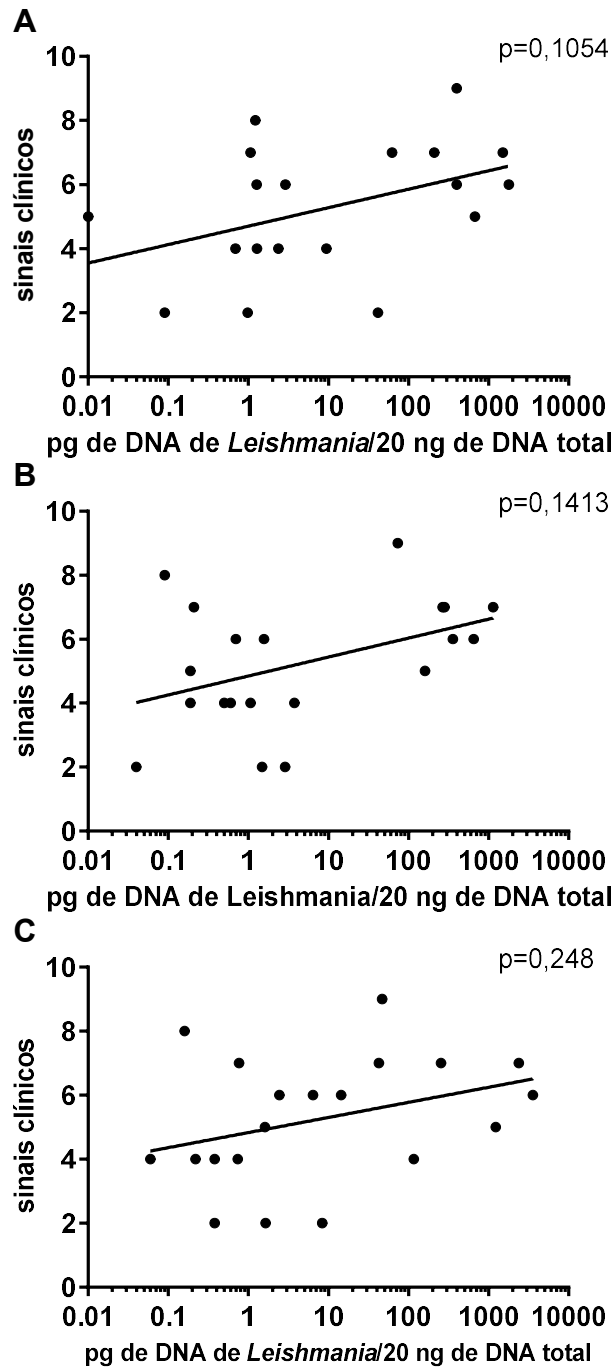


Figura 5.17 - Comparação entre a carga parasitária e a quantidade de sinais clínicos nos diferentes segmentos de pele de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral, naturalmente infectados e domiciliados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. O eixo X mostra a carga parasitária estimada por qPCR e o eixo Y o número de sinais clínicos apresentados individualmente por cada animal. **A** - orelha; **B** - focinho e **C** - pele da coxa. Teste estatístico de correlação de Spearman, sendo considerados significativos valores de $p < 0.05$. Foi traçada também uma linha de tendência semilogarítmica.

6 Discussão

A leishmaniose visceral canina, causada por *L. infantum*, é uma zoonose com ampla distribuição geográfica no mundo. Desde os primeiros estudos o cão tem sido considerado o principal reservatório da *L. infantum* nas áreas urbanas, principalmente por apresentar parasitos na pele e também por compartilhar o mesmo ambiente com o homem (Baneth et al., 2008; Calabrese et al., 2010). A doença no cão é lenta e de início insidioso, é caracterizada por apresentar evolução crônica com envolvimento sistêmico que, pela sintomatologia inespecífica, torna o diagnóstico clínico difícil (Brasil, 2014). O grau de manifestações clínicas apresentadas pelo animal vai depender de sua resposta imunológica. O espectro de manifestações clínicas pode variar de aparente estado sadio a um severo estágio final (Baneth et al., 2008; Solano-Galego et al., 2009; Brasil, 2014), assim como observado em humanos (Michel et al., 2011). Essa variedade de sinais clínicos presentes na LVC se deve principalmente a deposição de imunocomplexos que podem ocorrer em vários órgãos e tecidos, como pele, vasos sanguíneos, tecidos oculares e em articulações, resultante da reação inflamatória gerada contra o parasito (Koutinas et al., 1993; Ciaramella; Corona, 2003; Trotz-Williams; Gradoni, 2003). A relação entre carga parasitária, inflamação, apoptose e estado clínico do hospedeiro na leishmaniose visceral pode determinar o curso da infecção e o grau de manifestações clínicas, estando relacionado com a resposta imunológica desenvolvida pelo mesmo (Verçosa et al., 2012). Essa resposta dependerá dos estímulos e receptores envolvidos e da ativação de macrófagos, gerando uma resposta anti-inflamatória ou pró-inflamatória (Krysko et al., 2006).

Na maioria dos cães do presente estudo a carga parasitária apresentou correlação positiva com a intensidade de infiltrado inflamatório, ou seja, quanto maior a carga parasitária maior a resposta inflamatória.

Não houve correlação entre a carga parasitária, determinada pela técnica de qPCR, e a quantidade de sinais clínicos apresentada pelos animais, individualmente, diferindo do encontrado por Verçosa e colaboradores (2012). Esses autores mostraram associação entre a carga parasitária, manifestações clínicas e o infiltrado inflamatório em fragmentos de pele com LVC. Além disso, observaram que nos animais sintomáticos o grau de infiltrado inflamatório alternou entre intenso e/ ou

moderado, com distribuição multifocal, enquanto nos assintomáticos esse infiltrado era discreto e/ou insignificante com distribuição difusa.

No presente estudo a análise histopatológica mostrou a presença de infiltrado inflamatório em 78,8% das amostras de pele estudada com distribuição difusa em diferentes intensidades. Corroborando com os resultados encontrados por Rossi e colaboradores (2016), os quais analisaram histologicamente 38 amostras de cães com LVC e constataram a presença de infiltrado inflamatório em diferentes níveis de intensidade e distribuição difusa. Por outro lado, nas análises histológicas das amostras de pele dos cães soronegativos para leishmaniose, o infiltrado inflamatório foi discreto, provavelmente associado a outras infecções.

O infiltrado inflamatório no presente estudo foi misto, com predomínio de células linfoplasmocitárias (33%), linfohistioplasmocitárias (41%), além da presença de neutrófilos (13,63%) e mastócitos (25,75%). Corroborando com dados da literatura que mostram que a presença de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas na pele de cães com leishmaniose visceral é comum (Ordeix et al., 2017; Rossi et al., 2016; Figueiredo et al. 2010). No presente estudo, mastócitos foram observados apenas em segmentos da pele onde a intensidade da inflamação variou de moderada e acentuada. Da mesma forma, Calabrese e colaboradores (2010), em estudo com cães naturalmente infectados em uma área endêmica para leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul, descreveram infiltrado com predomínio de mastócitos degranulados, demonstrando assim o papel dessas células no sistema de defesa do hospedeiro modulando a resposta imunológica contra o agente invasor.

Outra célula descrita em alguns estudos de histologia de LVC é o eosinófilo. Cardoso e colaboradores (2017) mostraram uma reação inflamatória crônica com infiltrado mononuclear difuso na derme e rara presença de neutrófilos e eosinófilos, entretanto, no presente estudo não observamos a presença de eosinófilos nos fragmentos de pele analisados.

Parasitas do gênero *Leishmania* induzem um processo imunológico cutâneo cuja intensidade e distribuição são variáveis, embora em animais sintomáticos há uma tendência a uma resposta inflamatória mais intensa. Essa relação parasito e processo inflamatório, independentemente do animal ser sintomático ou assintomático, pode ser um meio para compreender a interação entre o parasito e o hospedeiro (Verçosa

et al., 2012). Uma resposta imunológica eficiente contra a *Leishmania* é fundamental para o controle da infecção e a pele exerce uma função essencial na imunopatogenia da doença em cães (Papadogiannakis e Koutinas, 2015). Segundo esses autores, a leishmaniose por *L. infantum* é caracterizada por diversas manifestações cutâneas que podem refletir diretamente na relação parasito-hospedeiro. Além disso, diferentes tipos de lesões de pele podem ocorrer, em um mesmo cão. Em nosso estudo, contudo, observamos que alterações cutâneas estavam presentes em todos os animais avaliados, com intensidade que variou de acordo com o segmento de pele estudado, mesmo os cães assintomáticos. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores os quais mostram que alterações epiteliais como hiperkeratose, hiperplasia epidérmica, exocitose, crostas, acantose, etc, têm sido descritas na leishmaniose visceral canina e são observadas tanto na pele aparentemente normal quanto na pele com lesões macroscópicas (Barros, 2011).

É comum, na literatura, o relato da ocorrência de mais de um sinal clínico em cães com leishmaniose (Freitas et al, 2012, Cunha, 2015, França, 2019), como também verificado no presente estudo. Os sinais clínicos mais frequentes observados em nosso estudo foram hepatoesplenomegalia e caquexia, entretanto, é sabido que a ocorrência desses sinais clínicos não segue um padrão. Um estudo desenvolvido por Meléndez-Lazo e colaboradores (2018), com cães naturalmente infectados em Barcelona, mostrou que a maioria desses animais apresentou como principais sinais clínicos, alterações cutâneas, linfadenomegalia e alterações oculares, enquanto a hepatoesplenomegalia, mais frequente nos cães do nosso estudo, foi o achado menos comum. Além disso, esses autores descreveram um pequeno número de cães com onicogribose, dados corroborados por nosso estudo, no qual somente 18% dos cães apresentaram este sinal clínico. Cunha (2015), estudando cães naturalmente infectados por *L. infantum* em São Luís do Maranhão, descreveu linfadenopatia, caquexia e lesão de pele como os sinais clínicos mais frequentemente. Dados estes que foram confirmados posteriormente por França (2019) em estudos com cães da mesma área endêmica. Freitas e colaboradores (2012), no entanto, em estudos com cães naturalmente infectados em Fortaleza, observaram vômito e caquexia como sinais clínicos mais frequentes. Esses resultados demonstram que as manifestações clínicas predominantes diferem de região para região e, portanto, o diagnóstico não

deve ser unicamente baseado nas manifestações clínicas apresentadas e sim em um conjunto de parâmetros.

Nossos resultados mostraram que em 54,5% das amostras de esfregaços da medula óssea analisadas foi possível detectar formas amastigotas de *L. infantum*, entretanto, em somente 9% das amostras foi possível o isolamento de parasitos em meio de cultura. Apesar da técnica de isolamento ser bastante específica para análise de amostras provenientes de áreas endêmicas é fundamental que haja condições apropriadas para a coleta e transporte dessas amostras (Menezes et al. 2016). Devido à baixa sensibilidade deste exame, é importante que a coleta seja realizada de forma adequada, por profissional habilitado, evitando assim o comprometimento da amostra. No nosso estudo, as condições inadequadas de coleta e transporte, além da escassez das amostras, por terem sido obtidas dos animais já eutanasiados, podem ter contribuído para o insucesso do isolamento parasitário.

No presente estudo todas as avaliações histológicas foram realizadas em amostras de pele aparentemente íntegras, sem ulceração, provenientes de ponta da orelha, focinho e parte interna da coxa de 22 cães sororreagentes para leishmaniose visceral, naturalmente infectados no município de N. Sra. do Socorro, Sergipe. A escolha da pele como objeto do estudo teve como fator decisório a demonstração, por inúmeros estudos, da presença de amastigotas neste tecido. Assim como, os resultados obtidos no presente estudo poderão ser úteis para substituir a obtenção de amostras através de punção de medula óssea e baço, métodos de escolha para o diagnóstico da LVC (Tafari et al., 2004).

No presente trabalho apenas um animal foi assintomático, entretanto, sabe-se que mesmo os cães assintomáticos podem atuar como fontes de infecções para os flebotomíneos (Madeira et al., 2009; Laurenti et al, 2014; Saridomichelakis e Kotinas, 2014), o que se confirmou neste estudo. O animal apresentou infiltrado inflamatório linfoplasmocitário discreto no fragmento de pele, aparentemente normal, da orelha e do focinho com a presença de histiócitos e raras formas amastigotas na orelha. Segundo Saridomichelakis e Kotinas (2014) tais achados sugerem que a presença de parasitos na pele sadia precede o aparecimento de lesões macroscópicas.

A utilização da pele como amostra para diagnóstico na leishmaniose canina vem sendo utilizada por muitos autores com resultados promissores. Xavier e

colaboradores (2006) demonstraram a presença de parasitos em amostras de tecidos de orelha, nariz e abdômen de cães e descreveram que, particularmente, a pele da orelha e nariz são potencialmente úteis para diagnosticar a LVC, independentemente do estado clínico do animal. Ordeix e colaboradores (2017) mostraram que pele normal de cães com leishmaniose visceral (56%) comumente mostram lesões microscópicas e abrigam formas amastigotas do parasito.

Doehl e colaboradores (2017) descreveram que a capacidade de infecção do vetor, em cães com leishmaniose visceral, está relacionada ao encontro de parasitos na pele e comprovaram isso através de um modelo murino infectado por *Leishmania donovani*. Através de análises espaciais em escalas macro (PCR quantitativo) e micro (microscopia confocal) mostraram que a distribuição dos parasitos é marcadamente distorcida. Modelos matemáticos demonstram que, embora uma distribuição irregular reduza o número esperado de flebotomíneos que adquirem os parasitos, aumenta a carga de infecção para os flebotomíneos que se alimentam de um fragmento, aumentando seu potencial de transmissão subsequente. Conclui-se assim que a pele é um local crítico na avaliação da competência de transmissão e no impacto das campanhas de eliminação da leishmaniose visceral. Esses dados corroboraram aos observados por Courtenay e colaboradores (2014) os quais mostraram que a infectividade do flebótomo está associada a carga parasitária na pele do hospedeiro e este é o melhor preditor de infectividade. Somado a isso, dados publicados por cientistas da Universidade de Nova York em 2017 mostraram que a infecção de flebotomíneos se dá mais através da pele que do sangue infectados, apoiando a literatura quanto a importância da pele na transmissão da leishmaniose (University of York, 2017).

No presente trabalho, a quantificação da carga parasitária por qPCR foi realizada em fragmentos cutâneos do focinho, ponta de orelha e parte interna da coxa de 22 cães e constatou-se a presença de DNA do parasito em ao menos um dos segmentos cutâneos avaliados. Resultados encontrados por Ordeix e colaboradores. (2017) que confirmaram a presença de DNA do parasito pela técnica da qPCR em 72% das 25 amostras de pele aparentemente saudável de cães com leishmaniose e em 100% das amostras de pele clinicamente lesionadas. Reis e colaboradores (2013) também descreveram a detecção da presença de DNA de *Leishmania* em 93,3% das amostras de pele de cães infectados. Corroborando com esses estudos

demonstramos que a pele normal de cães com leishmaniose frequentemente abriga formas amastigotas do parasito, como demonstrado pela coloração de Hematoxilina e Eosina e pelo qPCR.

O fragmento da orelha foi o mais frequentemente parasitado. Formas amastigotas de *Leishmania*, estavam presentes em 82% das amostras, corroborando com os estudos de Moura e colaboradores (2008), seguido dos fragmentos de pele da coxa com 32% e do focinho com 18%. Lembrando que todas as análises foram realizadas em fragmentos de pele aparentemente saudáveis, tanto nos cães sintomáticos como no cão assintomático. O infiltrado inflamatório foi variável quanto ao tipo celular podendo estar associado a presença de formas amastigotas. A observação de maior parasitismo na orelha, pode advir do fato da mesma ser alvo frequente de injúrias e traumatismos, que podem estimular o prurido, e assim promover o acúmulo de células inflamatórias o que facilitaria a manutenção do parasitismo local (Barros, 2011; Murray et al., 1982). Somado a isso, podemos considerar a possibilidade de áreas mais frias do corpo, como a orelha, por exemplo, serem mais predispostas ao desenvolvimento do parasito (Travi et al, 2001).

Estudos de Rossi e colaboradores (2016) observaram infiltrado inflamatório na pele de 38 cães com leishmaniose, que apresentavam ou não sinais clínicos, mas só detectaram a forma amastigota de *Leishmania* em 46% dos animais sintomáticos e 36% dos animais assintomáticos. Mostrando que apesar de se observar processos inflamatórios na maioria das amostras nem sempre é possível a visualização do parasito.

Diante dos resultados observados em nosso estudo, concluímos que a pele é um importante sítio de infecção e deve ser levada em consideração para fins de diagnóstico, sugerindo então, sua utilização como órgão de escolha para o diagnóstico da leishmaniose, principalmente a região da orelha. Reforçamos que, como observado em nosso estudo e também por outros autores (Moura et al., 2008), por haver uma distribuição desigual do parasitismo na pele, a escolha do local de coleta da pele é importante. Os resultados aqui apresentados reforçam a ideia do papel epidemiológico dos cães na transmissão da *Leishmania*, remetendo a sua importância no ciclo da leishmaniose visceral, como discutido por vários autores no Brasil (Lima et al., 2004;

Xavier et al., 2006; Calabrese et al., 2010; Barros, 2011) e em outros países (Abranches et al., 1998; Solano-Gallego et al., 2011).

7 Conclusões

1. Nas amostras avaliadas no presente estudo, *Leishmania infatum* é a espécie responsável pela infecção canina em Nossa Senhora do Socorro, Sergipe;
2. A pele da orelha pode ser o tecido de escolha para o diagnóstico, uma vez que se mostrou mais frequentemente parasitada quando comparada com a pele do focinho e da coxa;
3. A expressiva carga parasitária na pele dos cães naturalmente infectados, residentes em Nossa Senhora do Socorro, reforça seu potencial papel na epidemiologia da leishmaniose visceral;
4. A correlação entre os infiltrados inflamatórios observados na pele e a presença de formas amastigotas não está relacionada ao número de sinais clínicos apresentados pelos cães;
5. A carga parasitária observada nos diferentes segmentos de pele de um mesmo animal foi homogênea;
6. A técnica de qPCR mostrou ser o método mais sensível para a detecção de amastigotas na pele que o método histopatológico.

8 Referência Bibliográfica

Abranches PL. Leishmaniose visceral canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. *Acta Médica Portuguesa* 1998;11:871-875.

Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 2005; 127:227–32.

Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol.* 2003;17(1):1-18.

Araújo DC. Análise espacial dos casos humanos de leishmaniose visceral. *Arq Ciênc Saúde* 2017; 24(2):71-75.

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Derm* 1996;14:523-532.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.*2008;24:324–30.

Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, Paula KM, Dias ES. Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in state of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(5):421-5.

Barão SC, Camargo-Neves VLF, Resende MR, Silva LJ. Human asymptomatic infection in visceral leishmaniasis: a seroprevalence study in an urban area of low endemicity. Preliminary results. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77:1051-3.

Barros RM. Caracterização histopatológica da Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal. Brasília. Dissertação [Mestrado em Saúde Animal] - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

Barros MP, Innocente AM, Silva GNS, Duarte M, Vunda SLL, Tasca T. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*,

Leishmania spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp. Revista Liberato 2012;13(20): 1-20.

Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. J. Clin. Microbiol 2008;46:1897–1900.

Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Curr. Mol. Med 2004;4:601–9.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 2007;37:1097-106.

Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. Curr Opin Microbiol 2008;11:340-4.

Belo VS, Struchiner CJ, Werneck GL, Barbosa DS, Oliveira RB, Neto RGT, et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. Vet Parasitol 2013;195:1-13.

Brasil. Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

Calabrese KM, Cortada VMCL, Dorval MEC, Souza-Lima MAA, Oshiro ET, Souza CFS, et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. Exp. Parasitol 2010;124:253–7.

Camargo-Neves VLF, Glasser CM, Cruz LL, Almeida RG. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2006.

Cardoso JMOC, Ker HG, Aguiar-Soares RDO, Moreira ND, Mathias FAS, Reis LES, et al. Association between mast cells, tissue remodeling and parasite burden in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. Vet Parasitol 2017;243:260–266.

Centers for disease control and prevention (2016). Epidemiology & Risk Factors. [publicação online]; 2018 [Acesso em 20 out 2018]. Parasites – Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>

Centers for disease control and prevention (2018). Disease. [publicação online]; 2018 [Acesso em 20 out 2018]. Parasites-leishmaniasis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>

Chamizo C, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;103(1-2):67-75.

Ciaramella P, Corona M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *compendium on continuing education for the practicing veterinarian* 2003;25(5):358-368.

Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez LM, Quinnell RJ. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(1):e2583.

Cortada VMC, Doval MEC, Souza Lima MA, Oshiro ET, Meneses CRV, Abreu-Silva A. Canine visceral leishmaniasis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Research Communications* 2004;28(5):365-374.

Costa CHN. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34(2): 223-228.

Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública* 2008;24(12):2959-63.

Costa DNCC, Blangiardo M, Rodas LAC, Nunes CM, Hiramoto RM, Tolezano JE, Bonfietti LX, Bermudi PMM, Cipriano RS, Cardoso GCD, Codeço CT, Chiaravalloti-Neto F. Canine visceral leishmaniasis in Araçatuba, state of São Paulo, Brazil, and its relationship with characteristics of dogs and their owners: a cross-sectional and spatial analysis using a geostatistical approach. *BMC Vet Res*. 2018;14(1): 229.

Cunha CM. Alterações clínicas e oculares em cães naturalmente infectados POR *Leishmania infantum*. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical] – Fundação Oswaldo Cruz; 2015.

Cunha S, Freire M, Eulalio C, Critosvãõ J, Netto E, Johnson Junior WD, et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans Roy Soc trop Med Hyg* 1995;89:155-8.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med trop* 2006;48(3):151-6.

Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil, estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro. Tese [Serviço Nacional de Educação Sanitária]. 1956.

Doehl JSP, Bright Z, Dey S, Davies H, Magson J, Brown N, Romano A, Dalton JE, Pinto AI, Pitchford JW, Kaye PM. Skin parasite landscape determines host infectiousness in visceral leishmaniasis. *Nat communications* 2017; 8: 57.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MVR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose no Município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clín Vet* 2000;28: 36-44.

Feitosa MM. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: Anais do 1. Fórum sobre leishmaniose visceral canina; Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2006. p. 6-9.

Fernandes AP; Andrade HM; Melo MN, Coelho EAF, Avelar D, Gazzinelli RT. Leishmaniose visceral canina: Novos antígenos para diagnóstico e vacinas. *Revista de Saúde Pública do SUS/MG* 2011;1(1):49-50.

Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 2001;99(2):105-11.

Figueiredo MM, Moura EP, Costa MM, Ribeiro VM, Michalick MS, Tafuri WL. Et al. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Histol Histopathol* 2010; 25: 877-887.

França LT. Leishmaniose visceral canina: perfis clínico, hematológico, bioquímico e humoral de cães naturalmente infectados, tratados ou vacinados. São Luís.

Dissertação [Mestrado em Ciência Animal] – Universidade Estadual do Maranhão; 2019.

Freitas JC, Nunes-Pinheiro DC, Lopes Neto BE, Santos GJ, Abreu CR, Braga RR, et al. clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *leishmania chagasi*. Rev soc bras med trop.2012;45(1):24-29.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa Oliveira R, Martins Filho AO, et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. J Comp Pathol 2006; 135 (2-3): 100-107

Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. Res Vet Sci 2008(a); 84:269–77.

Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol 2008(b);121(1-2):23–33.

Góes MADO, Melo CM De, Jeraldo VDLS. Time series of visceral leishmaniasis in Aracaju, state of Sergipe, Brazil (1999 to 2008): human and canine aspects. Rev Bras Epidemiol. 2012;15(2):298–307.

Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances 2008. Vet J;175(1):45-52.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol 2004;7(3):338-349.

Graça GC, Volpinil AC, Romero GAS, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, Boité MC, Cupolillo E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2012;107(5).

- Gradoni L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Veterinary Parasitology* 2015;208:94–100
- Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* 2002;18:332-334.
- Hargis AM, Ginn PE. In: McGavin MD, Zachary JF(ed), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4. ed. St Louis: Mosby Elsevier, 2007. p. 1107-1261.
- Ikeda-Garcia FA, Marcondes M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clin Vet* 2007;12(71):34-42.
- Ikeda-Garcia FA., Feitosa MM. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clí Vet* 2006;11(1):32-38.
- Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *TRENDS in Parasitol* 2006; 22(9):439-445.
- Koutinas AF, Scott DW, Kontos V, Lekkas S. Skin lesions in canine leishmaniasis (kala-azar): a clinical and histopatological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Vet.Dermatology* 1993;3(3):121-130.
- Krysko DV, Denecker G., Festjens N. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ* 2006; 18:781–795.
- Lara-Silva FO, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Fiuza VOP, Pessanha JEM, Regina-Silva S, et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Tropica* 2015;148:128–36.
- Laurenti MD, Leandro Jr MVS, Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF, et al. Comparative evaluation of the DPP@CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2014; 205:444–50.
- Lima WG, Michalik MSM, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica* 2004;92:43-53.

Lima ÁLM, Lima ID, Coutinho JFV, Sousa UPST, Rodrigues MAG, Wilson ME, et al. Changing epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: a 25-year follow-up of an urban outbreak. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2017;111(10):440-447.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? *Res Vet Sci* 2009;87:260–262.

Maia CS, Pimentel DS, Santana MA, Oliveira GM, Pedrosa NA, Nascimento LA, et al. Análise espacial da leishmaniose visceral americana no município de Petrolina, Pernambuco, Brasil. *Hygeia* 2014;10(18):167-76.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2004;125(3-4):251-62.

Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Caracappa S, Gravino AE. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet parasitol* 2006;142(3-4):271-80.

Marcondes M, Rossi CN. Leishmaniose visceral no Brasil. *Visceral leishmaniasis in Brazil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, 2013;50(5):341-352.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1997–1983). *Mem. Inst.Oswaldo Cruz* 1985;80:349–357.

Meléndez-Lazo A, Ordeix L, Planellas M, Pastor J, Solano-Gallego L. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Res Vet Sci* 2018; 117:18–27.

Mendes JMF. Produção e Avaliação de antígenos recombinantes candidatos a componente de uma vacina contra leishmaniose visceral canina. Salvador. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz; 2016.

Menezes RC, Madeira MF, Ferreira LC, Barbosa Filho CJ, Miranda LH, Figueiredo FB. Cell-block immunohistochemistry of bone marrow aspirates: a novel tool to improve the diagnosis of *Leishmania* infection in dogs. J Comp Pathol 2016;154(2-3):157-60.

Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. Acta Trop. 2011;119:69–75.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil). Nota técnica n° 001/2016. Informa sobre o tratamento de cães com leishmaniose visceral e sua implicação nas ações de vigilância e controle dessa doença em humanos em consonância com a Portaria Interministerial n°1.426, de 11 de julho de 2008.

Moura EP, Ribeiro RR, Sampaio WM, Lima WG, Alves CF, Melo FA, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL, Michalick MSM. Histopathological and parasitological analysis of skin tissues biopsies from two distinct anatomical areas of the ears of dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Braz J Vet Pathol. 2008;1(1)10–15.

Murray HW, Masur H, Keithly JS. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. J Immunol. 1982; 129(1):344-50.

Nicolle GL. Culture du parasite du Bouton d'Orient. C.R. Acad. Sci 1908; 146:842-843.

Novy FG, MacNeal WJ. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. J. Infect. Dis 1904,1:1-30.

Nogueira JL, Silva MVM, Passos CC, Ambrósio CEA. Importância da leishmaniose visceral canina para a saúde pública: Uma zoonose reemergente. Rev Cient Eletronica med vet 2009;7(13):12

Nunes JB, Laurenti MD, Kanamura HY, Pereira AAC, Colombo FA, Marques MJ. *Leishmania infantum* infection in dogs from the southern region of Minas Gerais state, Brazil. Rev Inst Med trop São Paulo 2016;58:75.

Ordeix L, Dalmau A, Osso M, Llull J, Montserrat-Sangrà S, Solano-Gallego L. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. Parasites & Vectors 2017;10:121.

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondatl A, Lubas G, Gradoni L, Castagno M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. J Am Vet Med Assoc 2010; 236(11):1184-91.

Papadogiannakis EI, Koutinas AF. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniasis due to *Leishmania Infantum*. Vet Immunol Immunopathol 2015;163:94–102

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clin Infect Dis 1996;22(1):1-13.

Pimenta PFP, Turco SJ, McConville M, Lawyer PG., Perkins PV, Sacks D. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midgut. Science 1992; 256:1812-15.

Pimenta PFP, Freitas VCF, Secundino NFC. A interação do protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM – 2012;12:2-12.

Pinho R. Dermatologia Veterinária em Animais de Companhia: A pele e seus aspetos relevantes na prática clínica. E-book: Série de Dermatologia Veterinária 2013;5(1-2):e2 [acesso em 2 nov 2018]. Disponível em: http://veterinaria.com.pt/media//DIR_27001/VCP5-1-2-e2.pdf.

Pinto AJW, Figueiredo MM, Ferreira RA, Caliari MV, Tafuri WL. Unusual small intestine inflammatory lesions in a dog with visceral leishmaniasis. Braz J Vet Pathol. 2013;6(1):19-25.

Prasad R, Kumar R, Jaiswal BP, Singh UK. Miltefosine: An oral drug for visceral leishmaniasis. Indian J Pediatr 2004; 71:143-144.

Reis LES, Coura-Vital W, Roatt BM, Bouillet LEM, Ker HG, Brito RCF, et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. Vet Parasitol 2013;197:498– 503

Reis LL, Balieiro AAS, Fonseca FR, Gonçalves MJF. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017; 50(5):638-645.

Ribeiro VM, Silva SM, Menz I, Tabanez P, Nogueira FS, Werkhauser M, et al. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. *Parasite Vectors* 2013;6:8.

Rivitti EA. *Manual de Dermatologia Clínica de Sampaio e Rivitti*. São Paulo: Artes medicas; 2014. p. 1-16.

Rock KS, le Rutte EA, Vlas SJ, Adams ER, Medley GF, Hollingsworth TD. Uniting mathematics and biology for control of visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2015;31: 251–9.

Rogers KA, Dekrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus R. Type 1 and Type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiology Letters* 2002; 209:1-7.

Rosales JT, Yang HM. Mathematical modeling of the risk factors for canine leishmaniosis in human leishmaniosis in western regions of the state of São Paulo, Brazil, and in the Northeastern of the Province of Salta, Argentina. *BEPA* 2206. *Parasites & Vectors* 2014; 7:485.

Ross MH, Pawlina W. *Histologia - Texto e Atlas* .6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p. 514, 521, 528.

Rossi CN, Tomokane TY, Batista LFS, Marcondes M, Larsson CE, Laurenti MD. In situ cutaneous cellular immune response in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop* 2016;58:48

Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 2002;3(11):1041-1047.

Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;88:21–30.

Saraiva EM, Pimenta PF, Brodin TN, Rowton E, Modi GB, Sacks DL. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* on *Phelebotomus papatasi*. *Parasitology* 1995;111(3):275-87.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet Dermatol* 2014; 25(2):61-71.

Schimming BC. Leishmaniose visceral canina. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária* 2012;10(9).

Scott DW, Miller DH, Griffin CE. Muller and Kirk's. *Small animal dermatology*. 6 ed. Philadelphia: Saunders; 2001. p 1528.

Secundino NFC, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PFP. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. *J Med Entomol* 2005;42:928-38.

Silva FS. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *R Trop Ci Agr Biol* 2007;1(1):20-31.

Silva DA, Madeira MF, Abrantes TR, Filho CJ, Figueiredo FB. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet J* 2013; 195:252-3.

Sistema de informação de agravos de notificação (2017). Dados Epidemiológicos Sinan [publicação online]; 2017 [Acesso em 21 out 2018]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvse.def>

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2009;165:1-18.

Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila P, Alberola J, Ramis A, et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J. Comp. Pathol* 2004;130:7-12.

Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., & Baneth, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*, 2011;4(1), 86.

Tafuri WL, Oliveira MR, Melo MN. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*. 2001;96(3):203-12.

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Goncalves R, Melo MN, Michalick MS: An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods* 2004; 292:17-23.

Tauber AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature Reviews* 2003;4:897-901.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res* 2017;6:750.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64(3-4):119-24.

Trotz-Williams, L. & Gradoni, L. Disease risks for the travelling pet: Leishmaniasis, *In Practice* 2003;190-197.

University of York. Skin plays significant role in spread of leishmaniasis. Disponível em: < <https://www.sciencedaily.com/releases/2017/07/170705113125.html>>. Acesso em: 24/10/2018.

Vannier-Santos MA, MARTINY A, SOUZA W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design* 2002; 8:297-318.

Verçosa BLA, Melo MN, Puerto HL, Mendonça IL, Vasconcelos AC. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: A histomorphometric analysis. *Vet Parasit* 2012;189:162-170.

Viñuelas J, Garcia-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Mirón C, et al. Menigial leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasit* 2001;101:23-27.

Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. Rev Saude Publica 2014;48:851-6.

Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? Cad. Saúde Pública 2016;32(6):eED010616.

World health organization (2018). Epidemiological situation. [publicação online]; 2018 [Acesso em 22 out 2018]. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

World health organization (2019). Visceral Leishmaniasis. [publicação online]; 2019 [Acesso em 05 jan 2019]. Leishmaniasis. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/.

Xavier SC, Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MS, et al. Comparison of paraffin embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. BMC veterinary research 2006;2:17.



SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
COORDENAÇÃO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

TERMO DE DOAÇÃO

Eu, Anderson Kleber Silva Ramos, médico veterinário CRMV/SE nº 0188, declaro ter doado ao Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ a carcaça de 25 cães para obtenção de amostras de tecidos que serão utilizadas em pesquisa. Os cães foram recolhidos e eutanasiados pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde do município de Nossa Senhora de Socorro, Sergipe, com parte do Programa de Controle de Leishmaniose Visceral.

Nossa Senhora do Socorro, 28 de agosto de 2018.


Anderson K. S. Ramos
Médico Veterinário
CRMV-SE 0188

27/09/2018

Gmail - Fwd: Novo Documento 2018-09-21 11.59.26_20180921120604.pdf



Kátia Calabrese <kscalabrese@gmail.com>

Fwd: Novo Documento 2018-09-21 11.59.26_20180921120604.pdf

CEUA IOC <ceua.ioc@ioc.fiocruz.br>
Para: calabrese@ioc.fiocruz.br
Cc: Cecilia Jaques de Almeida <calmeidaioc@gmail.com>

27 de setembro de 2018 16:3

Prezada Dra. Kátia Calabrese,

A aluna Mariana Nobuco dos Santos não precisa submeter pedido de licença para utilização de carcaças de cães já eutanasiados pela vigilância sanitária local, visto que esta situação está devidamente documentada.

Atenciosamente,

Cecília Almeida
Coordenadora da CEUA/IOC
[Texto das mensagens anteriores oculto]

de permanência dos animais no projeto, os procedimentos realizados, o manejo dos animais e as medidas para promoção do bem-estar animal empregadas.

6.1.8. Quando animais de produção ou de companhia, domésticos ou silvestres forem utilizados em atividades de ensino ou de pesquisa científica a descrição das responsabilidades dos pesquisadores ou professores, assim como as do responsável(s) pelo(s) animal(is) devem estar claramente definidas na proposta.

6.1.9. Quando animais de produção ou de companhia forem incluídos no estudo, o modelo do Termo de Consentimento (TC) a ser assinado pelos responsáveis deve ser anexado.

6.1.10. Quando cadáveres, partes deles ou amostras biológicas forem usadas em atividades de ensino ou de pesquisa científica os responsáveis pela atividade devem:

a. Quando o material for obtido de animais incluídos em uma atividade de ensino ou de pesquisa científica - Exigir, previamente ao recebimento da amostra, evidência formal de que a atividade que originou a amostra era autorizada pela CEUA pertinente;

b. Quando o material não for oriundo de uma atividade de ensino ou de pesquisa científica, por exemplo: i) cadáveres de animais atropelados em rodovias; ii) sobras de amostras biológicas colhidas a bem do tratamento de animais que deles necessitavam; iii) cadáveres ou partes deles oriundos das atividades de matadouros, frigoríficos, abatedouros ou produtores rurais para consumo; iv) cadáveres ou partes deles oriundos de animais mortos por serviços de vigilância sanitária; v) cadáveres ou partes deles obtidos em estabelecimentos comerciais como mercados ou feiras livres ou; vi) sobras de amostras biológicas colhidas pelos serviços de vigilância sanitária - Manter documentação que evidencie a origem do material de forma inequívoca. A evidência poderá ser nota fiscal de compra, recibo, fotografias ou documentos oficiais dos serviços de vigilância, dentre outros aplicáveis.

c. A responsabilidade no caso de eventual violação de normas ou de princípios éticos para a obtenção dos materiais descritos nos sub-itens *a.* e *b.* é do responsável pela atividade, compartilhada por sua equipe, nunca da CEUA institucional.

VI.2. PLANEJAMENTO DE PROJETOS

6.2.1. Antes de enviar uma proposta à CEUA, pesquisadores e professores devem considerar as seguintes questões no planejamento do projeto:

- (a) os benefícios obtidos com o uso dos animais serão potencialmente maiores do que os impactos negativos sobre o seu bem-estar?
- (b) os objetivos do estudo podem ser atingidos sem a utilização dos animais?
- (c) as espécies de animais selecionadas são as mais apropriadas?
- (d) o estado biológico (incluindo genético, gestacional, nutricional, microbiológico e