

Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Igor Melo Zimovski

Leishmaniose Visceral Canina em Cães Atendidos em  
Hospital Veterinário Particular do Distrito Federal, Brasil

Brasília

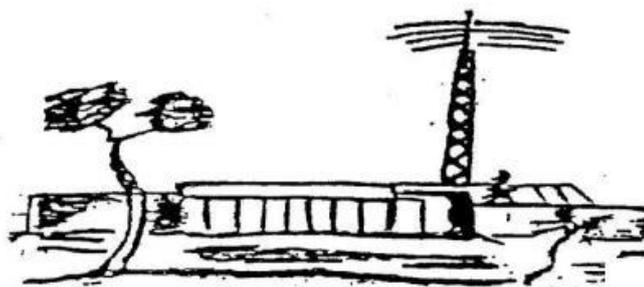
2016

# Leishmaniose Visceral Canina em Cães Atendidos em Hospital Veterinário Particular do Distrito Federal, Brasil

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília para a obtenção do título de mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aluno: Igor Melo Zimovski

Orientadora: Cecília Beatriz Fiuza Favali



Brasília

2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MZ761 Melo Zimovski, Igor  
Leishmaniose Visceral Canina em Cães Atendidos em  
Hospital Veterinário Particular do Distrito Federal,  
Brasil / Igor Melo Zimovski; orientador Cecília  
Beatriz Fiuza Favali. -- Brasília, 2016.  
83 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina  
Tropical) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Cães. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Leishmania  
infantum. 4. Diagnóstico. 5. PCR. I. Beatriz Fiuza  
Favali, Cecília, orient. II. Título.

## **COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

IGOR MELO ZIMOVSKI

### **UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

MEDICINA TROPICAL: BIOLOGIA DAS DOENÇAS INFECCIOSAS E  
PARASITÁRIAS

### **DATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO**

**19 de fevereiro de 2016**

### **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali – Universidade de Brasília  
(Presidente – Membro titular)

Profa. Dra. Eleuza Rodrigues Machado – Universidade de Brasília  
(Membro titular)

Profa. Dra. Flavia Nader Motta – Universidade de Brasília  
(Membro titular)

Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima – Universidade de Brasília  
(Membro suplente)

*Dedico este Trabalho a Iaroslau Zimosvki, Meire  
Henrique de Melo Zimovski, Cinara Tavares Carvalho  
e Ágata Ribeiro Zimovski.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades oferecidas, pelos obstáculos superados, pelas vitórias alcançadas, pelos aprendizados oferecidos.

Agradeço aos meus pais Meire e Iaroslau, pelo amor incondicional, pelos valores ensinados, pela educação que me deram, pelo carinho e incentivo que sempre me ofereceram.

Agradeço a Cinara Tavares, minha mulher e companheira, pelo incentivo que sempre me deu para continuar a crescer e progredir, pela paciência e companheirismo nas noites em claro estudando, pelo amor, carinho e felicidade de estar sempre ao seu lado.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Cecília Beatriz Fiuza Favali pela oportunidade e confiança ao me aceitar como orientado, pela atenção, tempo e experiências compartilhadas durante todo processo de orientação.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Beatriz Dolabela de Lima pelos ensinamentos em Biologia Molecular, pela paciência, pelo entusiasmo, e pela enorme ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a Fabiana Volkweis e Mário Viana pela compreensão, pela oportunidade, pelo incentivo, pela amizade, pela ajuda nos momentos difíceis, pela experiência de vida compartilhada e por permitir que esse trabalho fosse realizado nas dependências da sua empresa.

Agradeço a toda a Família Animax, desde o pessoal da limpeza, banho e tosa, recepção, até os enfermeiros e colegas veterinários que de alguma forma participaram dessa empreitada, sempre com muita amizade, companheirismo, alegria e bom humor. E agradeço em especial à aqueles que realizaram as coletas dos materiais biológicos utilizados neste estudo.

Agradeço ao Doutorando Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior pela ajuda, amizade, paciência e ensinamentos nas técnicas moleculares.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia do Gene que me receberam muito bem e com paciência compartilharam seus conhecimentos.

Agradeço a Ágata minha filha que mesmo sem saber foi um incentivo, e fonte de inspiração para meu aprimoramento.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo em 2013.....	17
Figura 2: Taxa de incidência de leishmaniose visceral 1/10.000habitantes, prevista para 2010 no Brasil com base em modelo geoestatístico. ....	18
Figura 3: <i>Lutzomia longipalpis</i> .....	21
Figura 4: Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral .....	22
Figura 5: Possíveis desfechos da infecção por <i>L. infantum</i> em cães.....	25
Figura 6: Fotomicrografia de esfregaço de Medula óssea de cão com LVC, corado por Panótico. ....	30
Figura 7: Mapa gênico da <i>L. infantum</i> .....	32
Figura 8: Micrografia electrónica de um segmento de uma rede de kDNA de <i>Crithidia fasciculata</i> . ....	33
Figura 9: Representação do cístron ribossômico de tripanossomatídeos....	35
Figura 10: Representação do locus gênico da HSP70.....	36
Figura 11: Desenho Esquemático do Estudo.....	40
Figura 12: Distribuição geográfica dos locais de residência dos cães amostrados. ....	51
Figura 13: Representação gráfica dos valores dos resultados dos exames parasitológicos organizados por sexo e sintomatologia .....	52
Figura 14: Fotomicrografia de amastigotas intracelulares em amostras teciduais caninas.....	53
Figura 15: Representação gráfica dos resultados das PCRs para as sequências ITS1 do <i>rDNA</i> e 3'UTR do gene <i>HSP70</i> .....	54
Figura 16: Representação gráfica dos resultados das PCRs relacionados com os padrões fenotípicos dos animais. ....	55
Figura 17: Géis utilizados para detecção e identificação por PCR-RFLP da região ITS1.....	57

Figura 18: Géis utilizados para detecção e identificação por PCR-RFLP da região 3'-UTR HSP70. ....	58
Figura 19: Gel utilizado para detecção por PCR do gene GAPDH de Cão. .	59
Figura 20: Representação gráfica dos resultados dos exames sorológicos de 25 cães. ....	60
Figura 21: Representação gráfica da frequência dos tipos de manifestações clínicas dos cães sintomáticos. ....	62
Figura 22: Cão adulto da raça Leão da Rodésia apresentando manifestações clínicas características da LVC. ....	62
Figura 23: Distribuição dos resultados das PCRs relacionados com a ocorrência de anemia.....	63
Figura 24: Distribuição dos resultados das PCRs relacionados com a contagem de leucócitos totais.....	64
Figura 25: Distribuição dos resultados das PCRs relacionados com a contagem de subpopulações de leucócitos. ....	65
Figura 26: Distribuição dos resultados das PCRs relacionados com a ocorrência de Trombocitopenia.....	66
Figura 27: Distribuição dos valores de creatinina sérica. ....	67
Figura 28: Distribuição dos valores de ureia sérica.....	68
Figura 29: Distribuição dos valores de Fosfatase Alcalina sérica. ....	69
Figura 30: Distribuição dos valores de enzima Alanina Aminotransferase (ALT) sérica.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das soluções utilizadas no processo de extração de DNA .....	43
Tabela 2: Sistema utilizado para a PCR da região ITS1 .....	44
Tabela 3: Ciclos utilizados para a amplificação da região ITS1 .....	44
Tabela 4: Sistema utilizado para a PCR da região 3' UTR do gene <i>HSP70</i> 45	
Tabela 5: Ciclos utilizados para amplificação da região 3' UTR do gene <i>HSP70</i> do DNA nuclear .....	45
Tabela 6: Reagentes utilizados para digestão dos produtos das PCRs.....	46
Tabela 7: Sistema utilizado para a PCR do gene <i>GAPDH</i> canino. ....	47
Tabela 8: Ciclos utilizados para amplificação do gene <i>GAPDH</i> canino. ....	47
Tabela 9: Resultados dos testes sorológicos, parasitológicos e moleculares dos 25 cães que possuíam resultados de exames sorológicos. ....	60

## LISTA DE ABREVIÇÕES

3'-UTR	Região 3' não traduzida
ALT	Alanina aminotransferase
DCs	Células dendríticas
DF	Distrito Federal
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ETS	Espaçador externo transcrito
FA	Fosfatase Alcalina
HIV	Vírus da imunodeficiência humano
HSP70	Proteína do choque térmico de 70 kb
Ig	Imunoglobulina
IGS	Espaçadores intergênicos
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon gama
ITS	Espaçadores internos transcritos
kb	Kilo bases
kDNA	DNA do cinetoplasto
LSU	Subunidade maior ribossomal
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
Mb	Mega bases
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RA	Região administrativa
RAPD	Amplificação aleatória de DNA polimórfico
rDNA	DNA ribossômico
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SSU	Subunidade menor ribossomal
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tumoral beta
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

# ÍNDICE

<b>COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA .....</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIações .....</b>	<b>9</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1. Características da Leishmaniose Visceral Humana .....	19
1.2. Ciclo da Doença.....	20
1.3. Leishmaniose Visceral Canina (LVC) .....	22
1.4. Imunopatogenia da LVC .....	24
1.5. Alterações Clínico-Patológicas da LVC .....	27
1.6. Diagnóstico da LVC.....	28
1.7. Métodos Parasitológicos .....	29
1.8. Métodos Sorológicos.....	30
1.9. Métodos Moleculares .....	31
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
3.1. Objetivo Geral .....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
<b>4. MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1. Local do estudo .....	39
4.2. Delineamento experimental.....	39
4.3. Amostras .....	40
4.4. Exame Parasitológico .....	41

4.5.	Extração do DNA .....	41
4.6.	Quantificação do DNA extraído .....	43
4.7.	Amplificação da Região ITS1 do DNA Ribossomal pela PCR .....	43
4.8.	Amplificação da Região 3' UTR do Gene <i>HSP70</i> pela PCR .....	44
4.9.	Análise do Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (RFLP) .....	45
4.10.	Análise da Integridade do DNA das amostras negativas .....	46
4.11.	Exames Sorológicos .....	47
4.12.	Hemograma e Bioquímica Sanguínea .....	48
4.13.	Ficha Epidemiológica .....	48
4.14.	Análise Estatística .....	49
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
5.1.	Distribuição Geográfica .....	50
5.2.	Exame Parasitológico .....	52
5.3.	Exames Moleculares .....	53
5.4.	Identificação das espécies de <i>Leishmania</i> por PCR-RFLP .....	56
5.5.	Análise da Integridade do DNA extraído das amostras negativas. ....	58
5.6.	Exames Sorológicos .....	59
5.7.	Manifestações Clínicas .....	61
5.8.	Exames Hematológicos .....	63
5.8.1.	Eritrograma .....	63
5.8.2.	Leucograma .....	64
5.8.3.	Trombocitograma .....	64
5.9.	Bioquímica Sanguínea .....	66
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
<b>9.</b>	<b>APENDICE 1 .....</b>	<b>83</b>

## RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença negligenciada que apresenta cerca de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos por ano em todo o mundo, sendo o Brasil um dos seis países com maior número de casos. O cão doméstico é considerado o principal reservatório urbano do agente *Leishmania infantum* que é transmitido principalmente pelo vetor flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. A leishmaniose visceral canina tem caráter crônico e cães infectados em área endêmica podem não apresentar sinais clínicos aparentes, dificultando detecção e o controle da doença. Os casos caninos podem estar associados aos casos humanos, pela proximidade entre homem e o cão doméstico. O Ministério da Saúde preconiza o uso de testes sorológicos para a detecção de cães positivos para a doença e eutanásia dos mesmos, porém estes apresentam limitações quanto à sensibilidade e a especificidade. Testes moleculares como a PCR-RFLP têm mostrado grandes vantagens em relação aos testes convencionais no diagnóstico e identificação da espécie do parasito. Assim, o presente estudo avaliou a detecção do DNA da região ITS1 do rDNA e da região 3'-UTR do gene *HSP70* de *Leishmania* em amostras de medula óssea de cães de um hospital veterinário particular no DF, seguidas de PCR-RFLP para identificar a espécie do parasito. Além disso, estudamos a associação do diagnóstico molecular com exames parasitológicos e sorológicos, bem como com perfil clínico, hematológico e de alguns parâmetros bioquímicos dos animais estudados. As reações de PCR do ITS1 e 3'-UTR do gene *HSP70* apresentaram 78,69% e 52,46% de positividade respectivamente. Os testes parasitológicos detectaram apenas 40,98% das amostras positivas, sendo a *L. infantum* a única espécie identificada pelo RFLP. Os sintomas incluíram perda de peso, alterações gastrointestinais, fraqueza, epistáxe e uveíte. Cães de orelhas caídas, pelagem curta e de grande porte estavam em maior proporção entre os

positivos. Observou-se também anemia, trombocitopenia e alterações dos valores normais do número de leucócitos nesses animais. No perfil bioquímico, apenas a ALT (alanina amino transferase) foi significativamente mais alta nos cães com detecção molecular positiva. Assim conclui-se que as ferramentas moleculares são potentes para a detecção e identificação de *Leishmania* em amostras de cães nas áreas endêmicas, permitindo também o diagnóstico em cães assintomáticos. Assim, tornam-se essenciais para a conclusão do diagnóstico na clínica veterinária, permitindo a decisão correta das medidas para o controle da doença.

#### Palavras-chave

Cães, leishmaniose visceral, *Leishmania infantum*, diagnóstico molecular, PCR.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a neglected disease with about 0.2 to 0.4 million of new cases per year worldwide, and Brazil is one of the six countries with the highest number of cases. The domestic dog is considered the main urban reservoir of the agent *Leishmania infantum* which is mainly transmitted by the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. Canine visceral leishmaniasis has chronic character and infected dogs in endemic areas can not show overt clinical signs, hindering detection and control of the disease. The canine cases may be associated with human cases, because of the proximity between man and the domestic dog. The Ministry of Health recommends the use of serological tests for the detection of positive dogs for the disease and their euthanasia, but these tests have limitations in terms of sensitivity and specificity. Molecular tests such as PCR-RFLP have shown great advantages over conventional assays in diagnosis and species identification of the parasite. In this way, the present report evaluate *Leishmania* DNA detection of ITS1 ribosomal DNA or 3'-UTR of the *HSP70* gene in bone marrow samples from dogs attended in a veterinary hospital in the Federal District (DF-Brazil). Parasite detection was followed by species identification through PCR-RFLP. Furthermore we compared the molecular testing with some parasitological, serological, clinical and biochemical characteristics of these animals. The ITS1 PCR reactions and 3'-UTR of HSP70 gene showed 78.69% and 52.46% of positivity respectively. Parasitological tests detected only 40.98% of the positive samples, and *L. infantum* was the only species identified by RFLP. Symptoms include weight loss, gastrointestinal disorders, weakness, epistaxis and uveitis. Dog-eared, short hair and large were in greater proportion of the positive dogs. It was also observed anemia, thrombocytopenia and alterations of the normal values of the number of leukocytes in these animals. In biochemical profile, only ALT (alanine transaminase) was significantly higher

in dogs with positive molecular detection. It was concluded that the molecular tools are potent for the *Leishmania* detection and identification of positive dogs in endemic areas, and allow diagnosis in asymptomatic dogs. Thus the molecular test becomes essential for the completion of diagnosis in veterinary clinic, allowing the correct actions to control this disease.

#### Keywords

Dogs, visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, molecular diagnosis, PCR.

# 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose atualmente é uma das doenças mais negligenciadas no mundo e tem mostrado uma tendência preocupante de aumento de mortalidade e morbidade, mesmo com as grandes descobertas feitas nos últimos 10 anos no seu tratamento, diagnóstico e prevenção (WHO, 2010). Estima-se que 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de Leishmaniose visceral em humanos (LV) ocorram por ano em todo mundo, onde a doença está presente em todos continentes com exceção da Antártida e Austrália (Alvar et al, 2012). Porém a distribuição do número de casos não é uniforme, sendo que 90% desses casos concentram-se em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão Sul, Brasil e Etiópia, como mostra a Figura 1 (WHO, 2013).

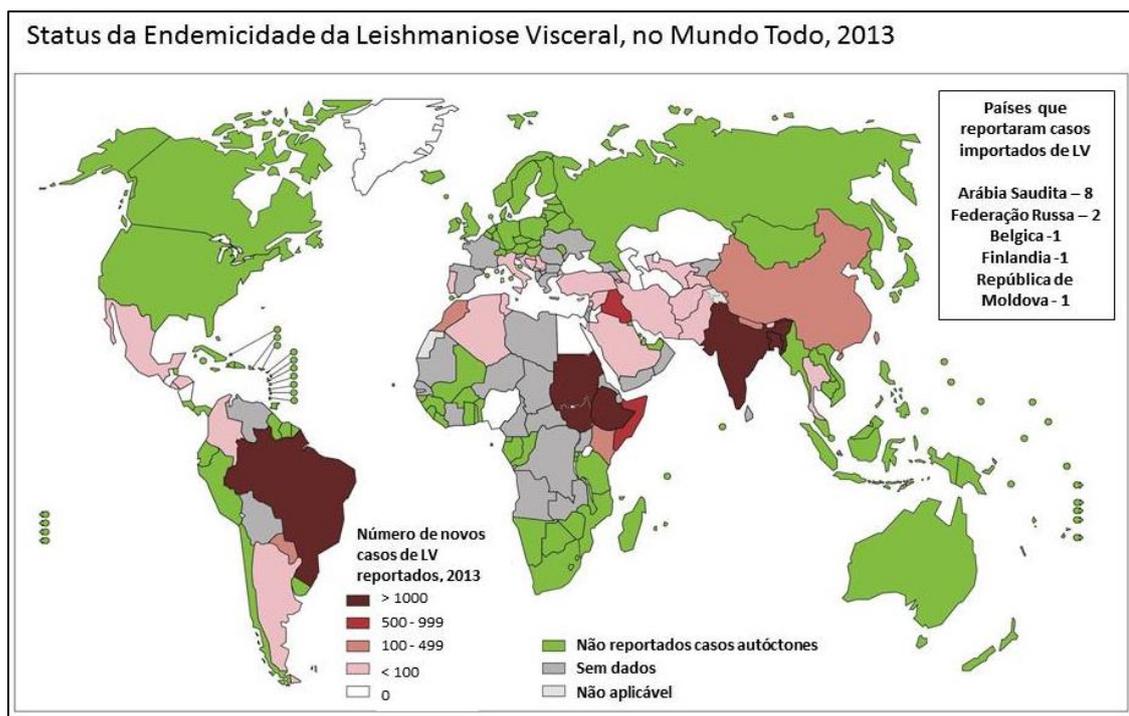


Figura 1: Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo em 2013 (adaptado de WHO, 2015).

Nas Américas a doença é autóctone em 12 países localizados entre o México e a Argentina, sendo que cerca de 90% dos casos americanos

ocorrem no Brasil (OPS/OMS, 2015), onde até a década de 1980, a LV era considerada uma zoonose rural, mas nas últimas décadas está se expandindo para os centros urbanos. Tal processo de urbanização iniciou-se na região Nordeste e Norte e posteriormente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste (Harhay et al, 2011). Em 2010, as maiores taxas de incidência previstas foram para os estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais e Pará; como observado na Figura 2 (Karagiannis-Voules et al, 2013).

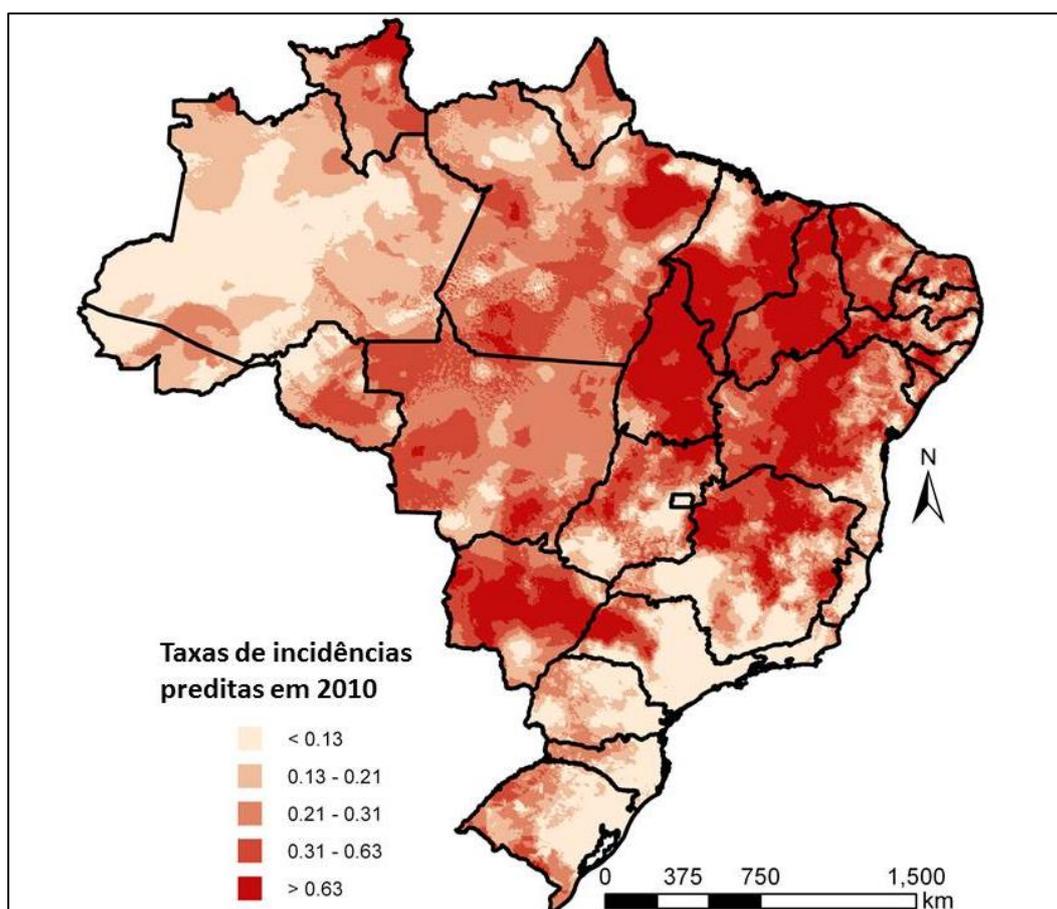


Figura 2: Taxa de incidência de leishmaniose visceral (1/10.000habitantes), prevista para 2010 no Brasil com base em modelo geostatístico (adaptado de Karagiannis-Voules et al, 2013).

No Distrito Federal (DF) essa doença vem se tornando um problema de saúde pública, principalmente após o ano de 2005, quando foram confirmados os primeiros casos humanos autóctones de LV na região de Sobradinho

(Carranza-Tamayo et al, 2010). Desde então, o DF vem sendo considerado uma região endêmica, com 35 casos autóctones notificados no período entre 2005 e 2012, sendo que um desses casos ocorreu na região do Lago Sul e outro na região do Jardim Botânico. Em 2013, foram confirmados mais dois casos autóctones nessas regiões administrativas (Secretaria de Estado de Saúde do DF, 2013).

### **1.1. Características da Leishmaniose Visceral Humana**

Após a exposição ao parasito, o período de incubação da doença pode variar de 10 dias a mais de 1 ano. As formas da doença variam desde assintomáticas, leves até a manifestação completa. A faixa etária mais acometida, nas Américas, é a de crianças até 10 anos de idade (WHO, 2010). Estima-se que para cada pessoa com a doença clínica em áreas endêmicas existam de 5 a 10 portadores assintomáticos, porém a evolução desses casos ainda não está clara (Saporito et al, 2013).

As manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral (LV) incluem febre, anorexia, perda de peso, distensão abdominal e fraqueza que pode progredir ao longo de semanas a meses. A disseminação dos parasitos induz o acúmulo de células fagocíticas mononucleares dentro dos órgãos invadidos e a hiperplasia secundária das células reticuloendoteliais manifesta-se clinicamente como esplenomegalia e hepatomegalia (Pace, 2014). A pancitopenia causada pela invasão dos parasitos na medula óssea causa palidez devido à anemia e posteriormente pode causar hemorragias devido a trombocitopenia e infecções oportunistas devido a leucopenia (Saporito et al, 2013).

A forma subclínica de LV é caracterizada por febre baixa, diarreia, retardo no crescimento, linfoadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia. Pode haver evolução para caquexia, doenças em múltiplos órgãos, diátese hemorrágica secundária a trombocitopenia, infecções secundárias e morte dentro de 2 a 3 anos quando não tratada (Pace, 2014).

Atualmente, a coinfeção com o vírus HIV tem chamado a atenção dos órgãos de saúde pública, pois estes agentes reforçam-se mutuamente de maneira prejudicial. Deste modo, a LV é mais propensa a se desenvolver em pacientes infectados pelo HIV e prejudica a resposta ao tratamento antiretroviral (WHO, 2010), sendo que em áreas endêmicas a infecção pelo vírus HIV aumenta o risco de desenvolver LV em 100 a 2.300 vezes, já que este vírus causa imunossupressão (Saporito et al, 2013).

## 1.2. Ciclo da Doença

A LV nas Américas é considerada uma zoonose, na qual a *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*) é o agente etiológico. O parasito é um eucarioto do filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, da família Trypanosomatidae, caracterizado pela presença do cinetoplasto, estrutura incomum a outros eucariotos que consiste em uma organela mitocondrial contendo DNA e associada à base do flagelo da célula (Berman, 2012; Lumsden & Evans, 1976).

Estes parasitos têm um ciclo de vida digenético complexo, exigindo um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor (Cecilio et al, 2014). O cão doméstico é considerado o principal reservatório do agente, no entanto outros canídeos como *Cerdocyon thous*, *Speothos venaticus*, mamíferos selvagens como *Panthera onca*, *Feli concolor*, *Didelphis marsupialis* e *D. albiventris* podem exercer esse papel na transmissão silvestre (Lainson, 2010).

Recentemente novos estudos demonstram que o gato doméstico também pode exercer um papel relativamente importante na epidemiologia da doença já que estes hospedeiros podem se infectar e transmitir o parasito para o vetor porém sua real importância na cadeia de transmissão da LV ainda requer mais investigação (Dantas-Torres et al, 2006; Oliveira et al, 2015; Paşa et al, 2015; Pennisi et al, 2015).



Figura 3: *Lutzomyia longipalpis* (VectorBase, 2016).

O parasito é transmitido para o hospedeiro por um vetor flebotomíneo infectado, onde a principal espécie transmissora no Novo Mundo é a *Lutzomyia longipalpis* (Figura 3), porém as espécies *Lu. cruzi* e *Lu. evansi* são consideradas vetores alternativos (Lainson, 2010). *Lu. longipalpis* tem hábitos domiciliares ou peridomiciliares e as fêmeas destas espécies são antropofílicas e necessitam ingerir sangue para realizar a postura de ovos, que é feita em matéria orgânica em decomposição. No momento do repasto sanguíneo formas promastigotas metacíclicas são injetadas juntamente com a saliva do inseto no tecido subcutâneo do hospedeiro mamífero (Romero & Boelaert, 2010). Nesse local as formas promastigotas flageladas são fagocitadas por células da linhagem dos monócitos-macrófagos e em seu interior se transformam morfológicamente em amastigotas, que vão se multiplicando no interior desses fagócitos até serem liberadas pela lise dessas células para infectar outros macrófagos. As amastigotas voltam a se transformar em promastigotas procíclicas no interior dos flebotomíneos após estes terem ingerido células infectadas no momento do repasto sanguíneo (Pace, 2014). No intestino do inseto as promastigotas procíclicas se

multiplicam por fissão binária tornando-se promastigotas metacíclicas que migram para a válvula faríngea do invertebrado, onde aguardam o momento de um novo repasto sanguíneo para serem injetadas em um novo hospedeiro mamífero (que pode ser homem ou cão) reiniciando o ciclo da doença como mostra a Figura 4 (Harhay et al, 2011).

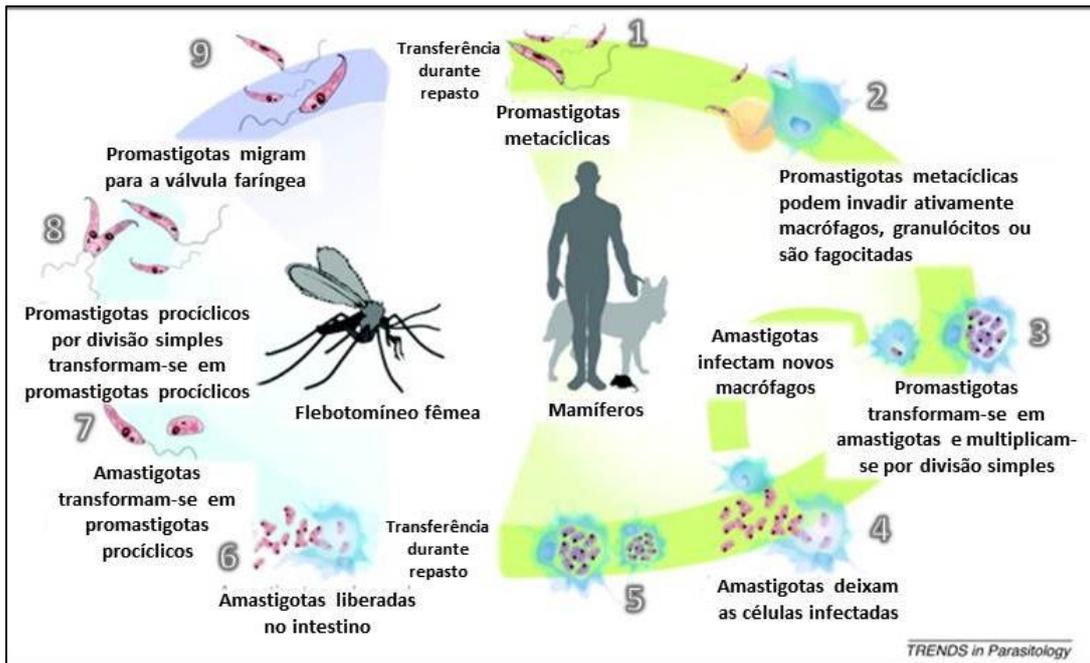


Figura 4: Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral (adaptado de Harhay et al, 2011).

Estudos em cães infectados demonstram que o parasito também pode ser transmitido verticalmente da cadela prenhe para a prole durante o período de gestação e parto, sendo mais um fator a ser considerado na transmissão do agente (Ben Slimane et al, 2014).

### 1.3. Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

No cão, a LVC possui um amplo espectro que varia entre infecção assintomática e doença grave, sendo que na maioria das vezes causa a morte do animal. Cães assintomáticos não apresentam nenhum sinal clínico aparentando serem saudáveis, podendo permanecer nessa fase da parasitose por um período variável, chegando até vários meses. Enquanto os cães oligossintomáticos apresentam alguns sinais como alopecia localizada, perda de peso e úlceras cutâneas que são frequentemente observadas nas pontas das orelhas e/ou na área periorbital (Reis et al, 2009).

Cães sintomáticos podem apresentar um ou mais sinais característicos da LVC como dermatite furfurácea, onicogrifose, alopecia generalizada, ulcerações por todo corpo, ceratoconjuntivite, cegueira, perda de peso severa, levando a morbidade progressiva e morte do animal.

Os sinais iniciais da doença são: linfadenomegalia localizada ou generalizada, dermatite periorbital e/ou nasal que pode se disseminar, frequentemente, mas não necessariamente pode ocorrer febre, apatia, diarreias, hemorragias intestinais, perda de peso, hepatoesplenomegalia, ceratoconjuntivite, hiperqueratose e úlceras cutâneas (Reis et al, 2009). Alguns animais também podem desenvolver alterações renais como glomerulonefrite e azotemia (Alves et al, 2013). Notavelmente existe um acometimento do tecido cutâneo nos cães sintomáticos, fator esse que normalmente não é observado na doença em humanos, no entanto, infelizmente ainda são poucos os estudos que abordam esse aspecto da LVC (Papadogiannakis & Koutinas, 2015).

Em áreas endêmicas 5 a 10% dos cães estão clinicamente doentes e 90 a 95% estão clinicamente saudáveis. O segundo grupo pode ser dividido entre 1/3 que não está infectado e 2/3 que estão infectados. Dos infectados 22% são considerados susceptíveis a desenvolver sinais clínicos devido à resposta celular deficiente e presença de resposta humoral. Desses 47% são considerados resistentes pela presença de uma resposta celular eficiente contra o parasito, sendo que 27% apresentam respostas celular e humoral e 18% apresentam apenas resposta celular. No entanto, este status não é permanente e pode evoluir rapidamente para doença clínica caso haja uma

quebra no equilíbrio devido à imunossupressão ou doenças concomitantes (Solano-Gallego et al, 2009).

#### **1.4. Imunopatogenia da LVC**

Após a inoculação dos parasitos pelo vetor, esses podem ser eliminados localmente (infecção autolimitada), ficarem restritos à pele e linfonodos regionais (infecção localizada geralmente sem sintomas), ou se disseminar por todo organismo (infecção disseminada) causando o aparecimento de sintomas ou não (Figura 5). Estes diferentes desfechos são dinâmicos e podem variar de acordo com diferentes fatores relacionados com o vetor, a virulência do agente e a genética do hospedeiro (Saridomichelakis, 2009).

A *Leishmania* sp. pode infectar uma grande variedade de células do hospedeiro canino como aquelas do sistema fagocítico mononuclear, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos, eosinófilos e até células neoplásicas. Elas invadem praticamente todos tecidos e órgãos do corpo, incluindo o sistema nervoso central. No entanto os fagócitos mononucleares, principalmente os macrófagos, são considerados as principais células hospedeiras desse parasito, sendo que as outras células apenas contribuem com a sobrevivência do patógeno a longo termo (Saridomichelakis, 2009).

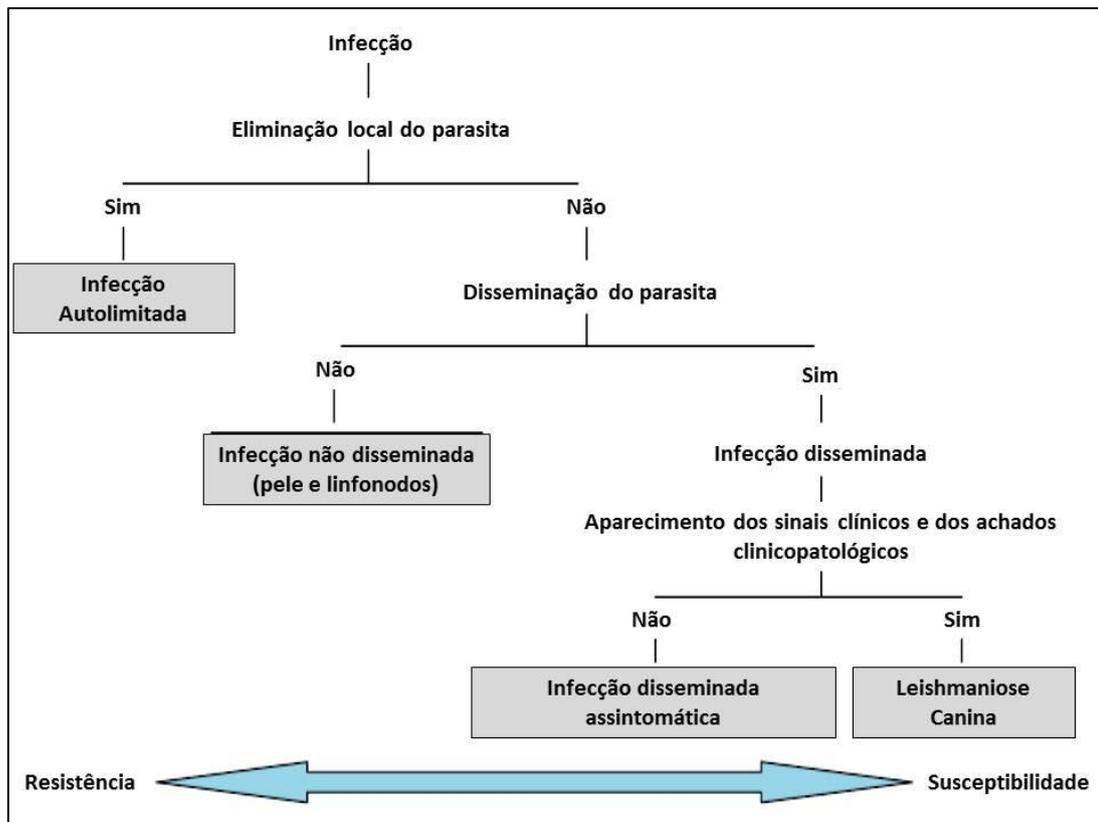


Figura 5: Patogênese da infecção por *L. infantum* em cães (adaptado de Saridomichelakis, 2009)

Apesar disso, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas no local da inoculação e são capazes de fagocitar e matar o agente, porém alguns estudos demonstram que as leishmanias são capazes de alterar o tempo de sobrevivência dos neutrófilos infectados, causando um atraso na apoptose dessas células que pode ser fundamental para a chegada de um número suficiente de células apresentadoras de antígenos (APCs) como macrófagos e células dendríticas (DCs). Além disso, os neutrófilos apoptóticos infectados secretam uma série de fatores quimiotáticos para macrófagos, que, ao fagocitarem essas células, secretam grande quantidade da citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  (fator de crescimento tumoral beta) e, juntamente com a presença de grandes concentrações de interleucina (IL)-10 e baixas concentrações de IL-12 no local, proporcionam uma entrada silenciosa do parasito nos macrófagos e células dendríticas prosseguindo com o processo de infecção. Esse processo também é chamado de estratégia do

“cavalo de Troia”, prevenindo a ativação de linfócitos TCD4+ (Cecilio et al, 2014).

Assim que as promastigotas adentram os macrófagos elas se diferenciam em formas amastigotas, que são adaptadas aos fagolisossomos da célula hospedeira. Nesse processo elas inibem a apoptose dos macrófagos e DCs, resistem à digestão dos fagolisossomos e se multiplicam em seu interior por fissão binária, proporcionando a disseminação do parasito pelo organismo do hospedeiro (Cecilio et al, 2014).

Como as leishmanias são parasitos intracelulares a resposta imune mediada por célula é de fundamental importância na resistência do hospedeiro. Assim as APCs processam e apresentam os antígenos do parasito, por meio das moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC), para as células T efectoras. Os linfócitos T CD8+ são considerados essenciais para a proteção do hospedeiro, pois podem causar a lise de macrófagos infectados e estão relacionados à resistência e a uma baixa carga parasitária nos hospedeiros (Saridomichelakis, 2009).

A resistência à infecção está associada a um perfil de secreção de citocinas do tipo Th1 como IL-12, interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-2 e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  que aumentam a eficiência das células fagocíticas e dos linfócitos citotóxicos. Por outro lado, a susceptibilidade à infecção está associada a um perfil do tipo Th2, com predominância de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  (de Almeida Leal et al, 2014). No entanto, ambos os perfis de respostas, Th1 e Th2, estão presentes, mas a primeira pode ser predominante em cães resistentes (Saridomichelakis, 2009).

Uma imunidade mediada por célula ineficaz resulta em uma proliferação maciça do parasito causando também uma ativação de linfócitos B (policlonal, monoclonal ou oligoclonal) com uma superprodução de imunoglobulinas. Esses anticorpos não são efetivos contra parasitos intracelulares e podem ser detectados antes do aparecimento dos sintomas da doença. Sua concentração pode ser positivamente associada à presença e severidade dos sintomas. São produzidos por cães resistentes, porém com

menor frequência e concentração. A classe de imunoglobulina predominante é a IgG, mas também podem ser produzidas IgM, IgE e IgA em menor frequência e concentração.

Esses anticorpos são produzidos contra uma gama de antígenos parasitários. Ao mesmo tempo podem ser produzidos autoanticorpos contra células sanguíneas, musculares e componentes do núcleo celular, que podem ser responsáveis por algumas manifestações clínicas da LVC, assim como a produção de imunocomplexos que vão causar uma diminuição da atividade fagocitária dos macrófagos, e colaborando com o agravamento da inflamação dos tecidos via ativação do sistema complemento, que tem um papel direto na imunopatologia de diversos órgãos e tecidos (Saridomichelakis, 2009).

### **1.5. Alterações Clínico-Patológicas da LVC**

A alteração clínico-patológica mais comum na LVC é a anemia, que geralmente se apresenta na forma normocítica e normocrômica com caráter não regenerativo. Essa característica pode ser consequente à invasão da medula óssea pelo parasito que induz inflamação que pode contribuir para a diminuição da produção de eritrócitos (da Costa-Val et al, 2007). Outras alterações comuns estão ligadas à contagem diferencial de leucócitos, onde frequentemente encontra-se eosinopenia, linfopenia e monocitopenia geralmente associados a doença clínica severa. A Linfocitose pode ser observada em cães assintomáticos. Trombocitopenia também é um achado comum na LVC (Nicolato et al, 2013; Solano-Gallego et al, 2009).

Aumentos significativos nos níveis de ureia e creatinina séricas também podem ser encontrados devido à deposição de imunocomplexos nos glomérulos e consequente inflamação resultando em glomerulonefrite (Nieto et al, 1992). Alterações hepáticas também são comumente observadas na LVC podendo ser detectadas pelo aumento da atividade das enzimas hepáticas como a Fosfatase Alcalina (FA) e a Alanina Aminotransferase (ALT) (Abreu-Silva et al, 2008; Rallis et al, 2005).

Outra alteração muito comum é o aumento dos níveis de proteínas plasmáticas devido ao aumento da produção de imunoglobulinas. Ocorre também uma diminuição da produção de albumina sérica, porém o aumento dos níveis de globulinas é muito expressivo fazendo que os níveis de proteínas plasmáticas totais aumentem significativamente durante a LVC (Giunchetti et al, 2008; Solano-Gallego et al, 2009).

## **1.6. Diagnóstico da LVC**

O diagnóstico da LVC é bastante complexo mesmo em cães sintomáticos e não existe um sinal ou sintoma patognomônico da doença. Os sinais clínicos são variáveis e se confundem com os de outras doenças que podem acometer esses animais. Assim testes laboratoriais são necessários para confirmar o diagnóstico (Faria et al, 2012). É importante considerar no diagnóstico que os animais na fase assintomática da LVC são capazes de transmitir o parasito ao vetor flebotomíneo. Assim, a detecção do parasito nesses animais antes do aparecimento dos sintomas é fundamental para o controle da doença. O diagnóstico preciso da LVC muitas vezes exige uma abordagem integrada, que consiste em diagnóstico clínico-patológico e exames laboratoriais específicos.

Uma história clínica pertinente, um exame físico completo e vários testes de diagnóstico de rotina, como hemograma completo, perfil bioquímico, urinálise podem ajudar a elevar o índice de suspeita para esta doença (Solano-Gallego et al, 2009).

Nos últimos anos foram desenvolvidas várias técnicas de diagnóstico específicas para facilitar o diagnóstico dessa doença, porém eles possuem diferentes valores de sensibilidade e especificidade, custo e facilidade de execução (Maia & Campino, 2008; Solano-Gallego et al, 2009). Atualmente, os principais métodos laboratoriais para o diagnóstico da LVC são: parasitológico, sorológico e molecular (Gomes et al, 2008).

## 1.7. Métodos Parasitológicos

Os métodos parasitológicos são métodos diretos de diagnóstico, sendo baseado na visualização do parasito intracelular presente nos órgãos e tecidos do hospedeiro, bem como sua detecção em meios de cultura. Para isso se faz necessário o exame citológico realizado por meio de análise de amostras obtidas por punção de órgãos como pele, linfonodos, medula óssea, baço ou fígado, o que torna o método invasivo. A punção de medula óssea e linfonodos são os métodos mais utilizados por clínicos veterinários (Maia & Campino, 2008). Do material coletado é feito um esfregaço, que é corado por Giemsa, Wright ou Panótico, e analisado em microscópio óptico, observando-se amastigotas livres ou no interior de monócitos, macrófagos ou neutrófilos. Essas formas se apresentam como corpos ovais ou arredondados medindo de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com citoplasma pálido, núcleo relativamente grande e denso, e o cinetoplasto que consiste em um corpo em formato de bastonete, em ângulo reto ao núcleo (Figura 6).

Esse método de diagnóstico possui especificidade que chega a 100%, porém a sensibilidade é variável, pois a distribuição do parasito nos tecidos não é homogênea, o que torna frequente a ocorrência de falsos-negativos (Faria et al, 2012; Maia & Campino, 2008). Resultados semelhantes ocorrem quando se usa análise de cortes histopatológicos de tecidos corados com hematoxilina e eosina (HE). Nesse caso a sensibilidade pode ser ainda mais baixa, sendo que a utilização de técnicas de imuno-histoquímica pode elevar a sensibilidade do método, porém a complexidade, o custo e o tempo de execução da técnica são aumentados (Gomes et al, 2008). A cultura *in vitro* de diferentes tecidos também é usada para aumentar a sensibilidade do exame parasitológico, porém possuem as mesmas desvantagens dos exames histopatológicos e o resultado final pode demorar até quatro semanas, tornando o método inviável (Gomes et al, 2008).



Figura 6: Fotomicrografia de esfregaço de Medula óssea de cão com LVC, corado por Panótico. Macrófago repleto de amastigotas de *Leishmania* (seta) observado em aumento de 1000x (Zimovski et al., 2015).

### 1.8. Métodos Sorológicos

Os métodos sorológicos são considerados métodos indiretos de diagnóstico, já que estes se baseiam em detectar anticorpos ou antígenos específicos de *Leishmania* sp. As técnicas mais usadas atualmente no Brasil são: a Reação de Imuno-Fluorescência Indireta (RIFI), o Ensaio Imuno-Enzimático (EIE) ou ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e Imunocromatográfico (Faria et al, 2012). O primeiro utiliza o parasito íntegro como antígeno e sua realização requer alto nível de habilidade, experiência e utilização de equipamentos de alto custo. Sua sensibilidade pode variar de 21,6% a 100% (Maia & Campino, 2008).

O método ELISA tem a vantagem de poder analisar um grande número de amostras em um curto período de tempo e pode ser adaptado para uso com diferentes antígenos como antígeno citoplasmático total, antígenos

purificados, peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes, sendo que a sensibilidade e especificidade podem variar de acordo com o antígeno utilizado e o estado clínico do animal testado (Maia & Campino, 2008).

O teste imunocromatográfico DPP (*Dual Path Platform*) tem sido muito explorado atualmente, pois é um teste rápido, prático e não requer grande experiência do aplicador, sendo bom para testes a campo, apresentando boa sensibilidade e especificidade (de Paiva-Cavalcanti et al, 2015). Existem outros métodos sorológicos para detecção de animais com LVC como *Western Blotting*, Reação de Fixação do Complemento e Reação de Hemoaglutinação Direta, que são menos utilizados nos serviços de saúde brasileiros (Faria et al, 2012).

O Ministério da Saúde brasileiro recomendava a utilização dos testes RIFI e ELISA para a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (2006). Com o intuito de melhorar a detecção de animais infectados atualmente o teste RIFI não está mais sendo utilizado e o teste imunocromatográfico DPP vem sendo utilizado como teste de triagem e o ELISA como confirmatório conforme preconizado na Nota Técnica Conjunta 01/2011- CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS.

## **1.9. Métodos Moleculares**

Para se fazer uso de ferramentas moleculares, é preciso conhecer a estrutura do DNA dos cinetoplastídeos, que apresenta algumas peculiaridades quando comparadas com a de outros membros dos eucariontes. *L. infantum* está incluída no complexo *L. donovani*, possui 36 pares de cromossomos, com tamanho variado, entre 200 e 4.000 kb, com o genoma completo totalizando 32 Mb (Figura 7). Os cromossomos são lineares e não condensados durante todas as fases do ciclo celular. Possuem telômeros, no entanto centrômeros não foram descritos. Os genes

codificadores de proteínas não possuem íntrons, o que facilita a identificação desses no DNA genômico. A ordem dos genes é altamente conservada quando comparada com outras espécies de *Leishmania*, mas a distância interloci pode variar (Bañuls et al, 2007; Ivens et al, 2005; NCBI.gov, 2016).

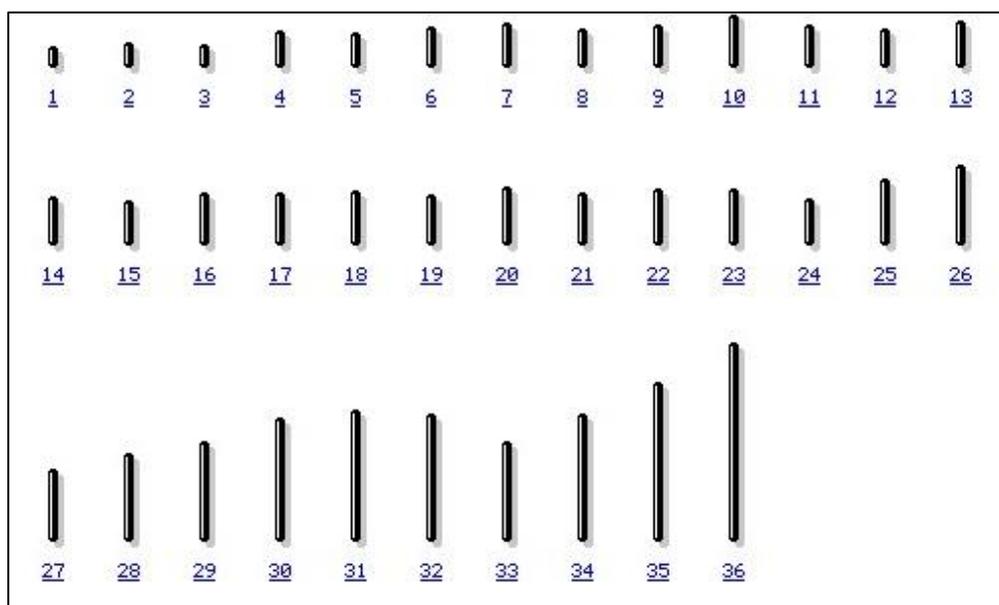


Figura 7: Mapa genômico da *L. infantum* (NCBI.gov, 2016).

Outra estrutura subcelular dos cinetoplastídeos que contém grande quantidade de DNA é o cinetoplasto, de formato discoide localizado geralmente no corpúsculo basal na base do flagelo, que é responsável pela produção de energia como as mitocôndrias e possui de 10 a 20% de todo DNA da célula. O DNA do cinetoplastos (kDNA) é constituído de uma rede de DNAs circulares concatenados, que são divididos em duas classes: os maxicírculos possuindo entre 20 e 50 moléculas que medem aproximadamente 20 kb, e os minicírculos possuindo 5.000 a 10.000 moléculas que apresentam cerca de 0,8 kb como mostrado na Figura 8 (de Paiva-Cavalcanti et al, 2015; Englund et al, 2005).

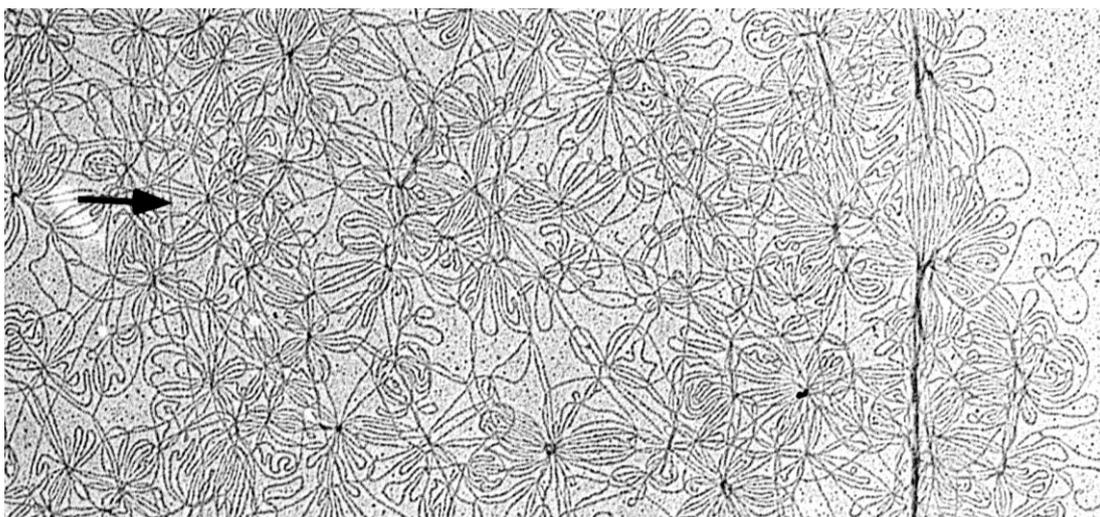


Figura 8: Micrografia electrónica de um segmento de uma rede de kDNA de *Crithidia fasciculata*. Pequenos laços são minicirculos e linhas mais longas (seta) são partes de maxicirculos (Englund et al, 2005).

Os métodos moleculares cada vez mais vêm sendo utilizados como alternativas aos métodos parasitológicos e sorológicos, uma vez que esses métodos tradicionais possuem grandes limitações e os testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm mostrado maiores sensibilidade e especificidade (Santos et al, 2014). Somando-se a isso, estas técnicas permitem a diferenciação das espécies de *Leishmania* de forma rápida e eficiente, ao passo que as técnicas classicamente utilizadas para esse fim necessitam de isolamento e cultivo em massa do parasito a ser identificado o que torna um procedimento trabalhoso e demorado (Rioux et al, 1990). A identificação da espécie do parasito que está infectando o cão é importante pois a espécie *L. infantum* não é a única do gênero a parasitar cães nas Américas. Outras espécies como, por exemplo, a *L. braziliensis* também causa infecção em cães e apresentam sinais clínicos cutâneos que podem se confundir com os sinais cutâneos da *L. infantum* (Dantas-Torres, 2009; Madeira et al, 2003).

A própria reação de PCR clássica pode diferenciar espécies ao utilizar a amplificação de certos genes, que produzem fragmentos de tamanhos diferentes para espécies como *L. tropica* e *L. donovani* (Khanra et al, 2012). Outra técnica usada para identificação de espécies do parasito é denominada

RAPD (Análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso), que consiste na amplificação de segmentos aleatórios de DNA, que formarão padrões de fragmentos de DNA de diferentes massas moleculares para diferentes espécies. No entanto, para realização dessa técnica necessita-se de uma amostra pura do DNA dos parasitos a serem analisados, que necessitam de isolamento e cultura dos mesmos, pois são utilizados iniciadores inespecíficos que poderão amplificar fragmentos de DNA do hospedeiro caso este esteja presente na amostra analisada, o que dificultaria a análise em amostras biológicas (de Oliveira et al, 2007; Manna et al, 2015). Existe também a técnica de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) que consiste na digestão do produto da PCR de alguns genes específicos com enzimas de restrição e comparação dos padrões de restrição que são diferentes para cada espécie de *Leishmania*. Essa técnica produz fragmentos de peso molecular diferente para cada espécie e tem se mostrado muito útil na identificação das espécies de parasitos encontrados em amostras biológicas, já que é uma técnica rápida e menos dispendiosa que o sequenciamento dos produtos da PCR (Khanra et al, 2012).

Existem diversos genes que têm sido usados como alvos para a PCR com o fim de detectar o DNA de *Leishmania* em amostras biológicas dos hospedeiros. Um desses alvos são os genes codificadores do RNA ribossômico (rRNA), que consistem em unidades de repetição compostas por unidades de transcrição (cistron ribossômico) que são intercaladas por espaçadores intergênicos (IGS) que se repetem em *tandem* mais de 100 vezes no genoma. Essas unidades são constituídas basicamente por três genes para RNA ribossomais: subunidade menor (*Small Subunit* – SSU), subunidade 5.8 S, e subunidade maior (*Large Subunit* – LSU), que são constituídas por sequências altamente conservadas. Estas subunidades são intercaladas por espaçadores internos transcritos (ITS) e espaçadores externos transcritos (ETS), que possuem sequências de conservação intermediária, e são flanqueados pelos IGSs que apresentam sequências altamente variáveis (Figura 9)(Cupolillo et al, 1995).

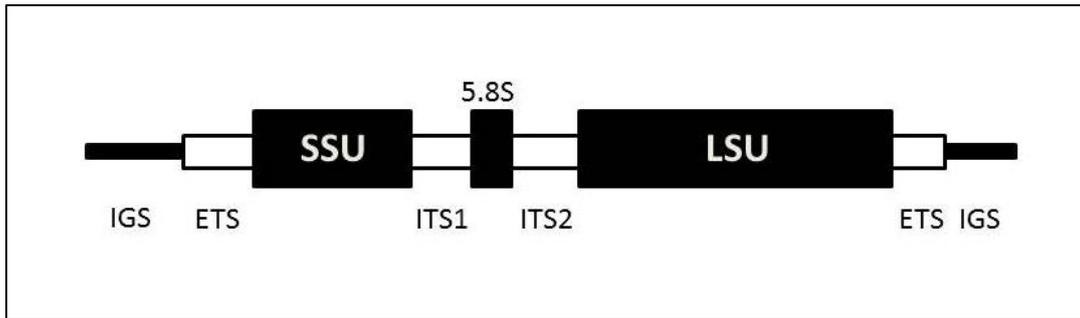


Figura 9: Representação do cístron ribossômico de tripanossomatídeos (adaptado de Cupolillo et al, 1995).

Por ser relativamente pequeno e ser flanqueado por segmentos altamente conservados, nos quais iniciadores de PCR podem ser desenhados, o ITS é muito utilizado para detecção de *Leishmania* e identificação da espécie pela técnica RFLP (Bensoussan et al, 2006; Cardoso et al, 2015; Cupolillo et al, 1995; Tojal da Silva et al, 2006).

Outros genes que são altamente conservados são os que codificam as proteínas do choque térmico (*Heat Shock Proteins* – HSPs) (Folgueira et al, 2007). Essas proteínas estão envolvidas na manutenção da homeostase das células dos parasitos principalmente durante um evento de estresse por aumento de temperatura, que ocorre na adaptação do microrganismo ao passar de um hospedeiro inseto com temperatura que varia de 22 a 28°C para um hospedeiro mamífero com temperatura média de 37°C (dos Santos Júnior et al, 2015; Shapira et al, 1988). O locus gênico da HSP70, uma HSP de 70 kDa, é bem conservado entre as *Leishmanias* e pode ser um marcador gênico utilizado na detecção e identificação de espécies do gênero. Esse foi um dos primeiros genes estudados em espécies de *Leishmania*, em especial *L. major* (Folgueira et al, 2007; Shapira et al, 1988), e tem sido muito utilizado para diagnóstico e identificação das espécies do parasito (Khanra et al, 2012; Paşa et al, 2015).

Requena e colaboradores (2012) analisaram as sequências da região 3' não traduzida (3'-UTR) do gene *HSP70* das espécies do gênero *Leishmania* e constataram que o locus desse gene consiste em várias cópias do gene *HSP70* que por sua vez possuem sequências altamente conservadas com

exceção da cópia localizada na porção 3' final do cluster, que possui uma região 3'-UTR diferente das demais, sendo assim esta foi denominada HSP70-II e as demais HSP70-I (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). o mesmo trabalho o grupo desenvolveu um par de oligonucleotídeos capazes de amplificar eficientemente uma sequência 3'-UTR de todas espécies de *Leishmania*. O comprimento desta região variou consideravelmente entre as espécies do gênero, porém entre cepas da mesma espécie essa variação foi mínima. Ao analisar o produto desta PCR com RFLP utilizando a enzima HaeIII os autores constataram padrões de restrição diferentes para as diferentes espécies do gênero. A partir dessas informações muitos autores têm usado a PCR da sequência 3'-UTR do gene HSP70 para detectar e identificar espécies de *Leishmania* com a técnica RFLP (Monteiro et al, 2014).

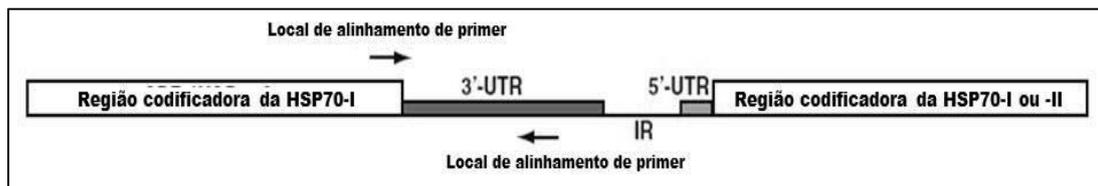


Figura 10: Representação do locus gênico da HSP70 (adaptada de Requena et al, 2012)

## 2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma doença negligenciada no mundo todo e representa um desafio para os órgãos de saúde pública, podendo levar a morte se não tratada adequadamente. Nas Américas é uma zoonose onde o principal reservatório do agente etiológico é o cão doméstico. No Brasil o Ministério da Saúde preconiza a eutanásia dos cães com sorologia positiva para *Leishmania* sp. Essa medida é muito polêmica, pois os proprietários desses animais muitas vezes são resistentes à realização desse procedimento devido ao apego a seus animais de estimação e evitam procurar os serviços públicos para realizar o diagnóstico da doença. Consequentemente os serviços veterinários particulares recebem frequentemente animais com sinais da doença, ou para realizar a vacinação contra este parasito, e precisam realizar o diagnóstico da doença nos cães de forma precisa e confiável. Para isso estudos sobre o diagnóstico da LVC em cães com essa origem são necessários, porém escassos. Tendo em vista esse cenário, levando em conta que o Distrito Federal é área endêmica da doença, a qual tem se expandido por diversas regiões administrativas, a presente dissertação foi desenvolvida.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Comparar os métodos de diagnósticos da Leishmaniose Visceral Canina explorando principalmente técnicas moleculares, assim como exames parasitológicos, sorológicos, hematológicos associando com dados epidemiológicos, de cães com suspeita de LVC atendidos em um hospital veterinário particular situado em região endêmica da doença.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Avaliar a PCR como uma ferramenta de diagnóstico precoce da LVC em animais atendidos em hospitais particulares.
2. Apontar as regiões de ocorrência desses casos.
3. Relatar as manifestações clínicas mais frequentes nestes animais.
4. Relatar as alterações em exames complementares observadas nesses animais.

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Local do estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Animax, localizado no Condomínio San Diego, Etapa 1, Rua 1, Lote 385, loja 2, Setor Habitacional Jardim Botânico, que faz parte da Região Administrativa XIV (São Sebastião) do Distrito Federal.

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia do Gene do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

### **4.2. Delineamento experimental**

Neste estudo foram utilizadas amostras criopreservadas de medula óssea de cães atendidos no hospital veterinário, encaminhadas para o laboratório de patologia clínica para a realização do exame parasitológico de LVC no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2015. As amostras foram então encaminhadas para o Laboratório de Biologia do Gene, onde foram descongeladas e os seus DNAs extraídos e purificados. Com esse material foi realizado PCR da região ITS1 do rDNA e da região 3'UTR do gene *HSP70*. Os produtos amplificados dessas PCRs foram submetidos ao RFLP. Para tentar correlacionar com os achados moleculares, as fichas epidemiológicas e prontuários foram analisados (Figura 11).

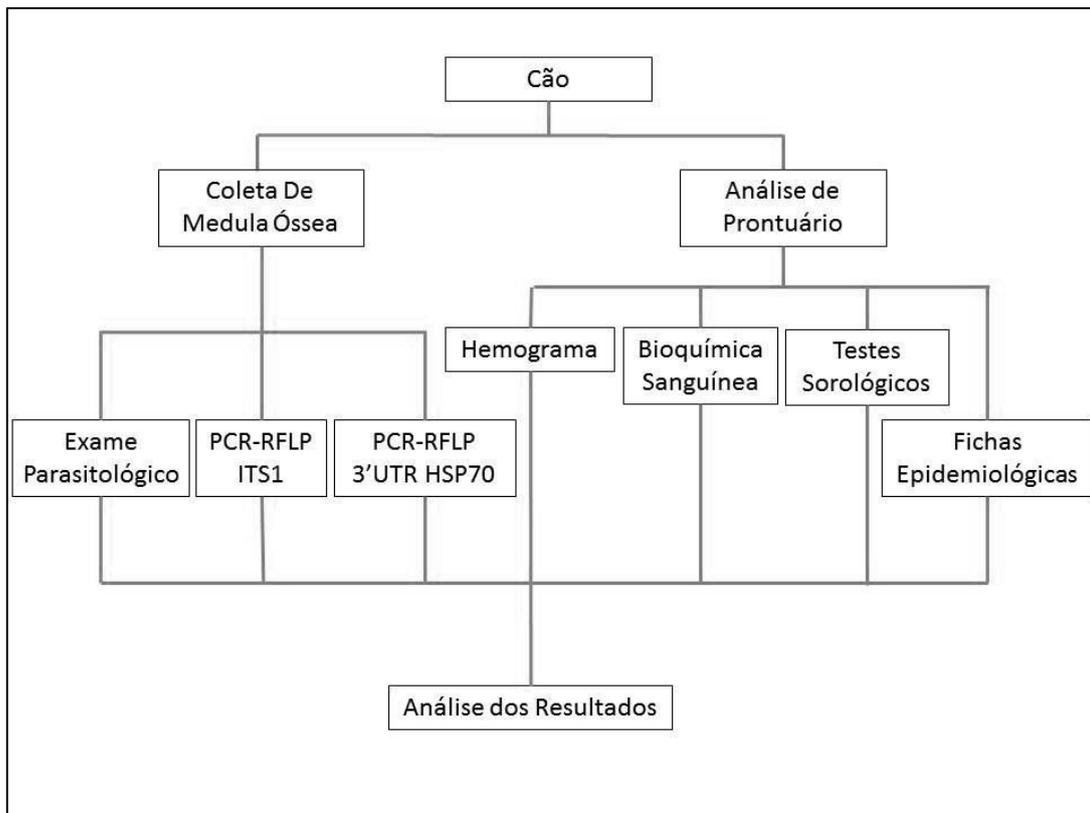


Figura 11: Desenho Esquemático do Estudo

### 4.3. Amostras

Foram utilizadas amostras de soro sanguíneo e aspirado de medula óssea congelados que foram enviados para o laboratório para exames de bioquímica sanguínea e pesquisa de amastigotas de *Leishmania* sp., respectivamente. Assim que os exames solicitados eram finalizados o material biológico excedente era congelado em temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , com a finalidade de conservar o material para uma posterior análise confirmatória e para realização de testes adicionais solicitados pelo veterinário responsável pelo animal em tratamento no hospital, ou para fins de pesquisa.

A coleta de medula óssea foi realizada por punção do osso esterno com agulha hipodérmica 40 x 1,2 e seringa de 5 mL, com o animal sob sedação e analgesia adequadas para o procedimento, conforme orientação e supervisão

do médico veterinário responsável pelo animal. Após autorização do tutor do animal, foi realizado exame parasitológico com finalidade de confirmar suspeitas de LVC de animais sintomáticos ou com sorologia positiva. Vale ressaltar que nenhuma amostra foi coletada exclusivamente para a realização desse trabalho.

Foram utilizadas 61 amostras de medula óssea, sendo 27 de fêmeas, e 34 de machos, todos adultos. Os animais pertenciam a 26 raças diferentes, sendo que 42 cães possuíam pelagem curta e 19 possuíam pelagem longa, 50 apresentavam orelhas caídas e 11 orelhas em pé. Quanto ao tamanho, os animais se dividiam da seguinte forma: 9 cães de porte pequeno, 18 de porte médio, 32 de porte grande e 2 de porte gigante.

#### **4.4. Exame Parasitológico**

Após coleta de medula óssea e solicitação do exame parasitológico pelo médico veterinário responsável pelo atendimento do animal suspeito, era realizada a confecção de esfregaços do material fresco ou coletado em tubos de coleta de sangue com EDTA, em lâminas de vidro para microscopia. Após secagem natural do esfregaço esse era corado com Panótico (Corante Hematológico Rápido, InstantProv, NewProv®). As lâminas coradas eram analisadas ao microscópio óptico com objetiva de 100x, para detecção de amastigotas de *Leishmania* sp. O exame era considerado positivo quando observadas uma ou mais formas amastigotas intra ou extracelulares, que se apresentavam como corpos ovais ou arredondados medindo de 2 a 4  $\mu$ m de diâmetro, citoplasma pálido, núcleo relativamente grande e denso e o cinetoplasto (Figura 14). O material excedente foi transferido para microtubo e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.5. Extração do DNA**

Inicialmente foram testados em cinco amostras, dois protocolos de extração de DNA, sendo o primeiro o Kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen), e o segundo o protocolo manual descrito a seguir, o qual demonstrou melhor desempenho devido a características das amostras, sendo então escolhido para realização em todas amostras.

Para a extração pelo método manual o primeiro passo foi a lise celular. As soluções utilizadas nesse processo estão descritas na Tabela 1. Nessa fase foram adicionados 0,3 ml de amostra a um tubo de 1,5 ml contendo 0,9 ml da solução de lise de hemácias, a mistura foi homogeneizada por inversão do tubo que foi incubado à temperatura ambiente por 10 minutos, com outra inversão do tubo aos 5 minutos de incubação. Após esse período os tubos foram centrifugados a 2.000 g por 10 minutos, o sobrenadante resultante foi dispensado e o *pellet* que ficou no tubo foi agitado para ressuspender as células brancas no sobrenadante residual. Foram adicionados 0,3 ml da solução de lise celular ao tubo e homogeneizado até não restar aglomerados celulares visíveis, quando necessário essa solução foi incubada a 37°C até a solução ficar homogênea.

Para precipitação das proteínas foi adicionado 0,1 ml da solução de precipitação de proteína ao lisado celular, agitado vigorosamente por 20 segundos e centrifugado a 2.000 g por 10 minutos. As proteínas formavam um *pellet* marrom compacto. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo de 1,5 ml contendo 0,3 ml de isopropanol a 100%, invertido lentamente 50 vezes até que aparecessem os “novelos” de DNA, e então centrifugado a 2.000 g por 3 minutos. O sobrenadante resultante era dispensado e então adicionado 0,3 ml de etanol a 70%, invertido o tubo algumas vezes e centrifugado a 2.000 g por 1 minuto. O sobrenadante foi dispensado e o tudo drenado em papel absorvente à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período foi adicionado 0,5 ml de água, e após 24 horas foi realizada a quantificação do DNA que foi armazenado em temperatura de 2 a 8° C.

Tabela 1: Composição das soluções utilizadas no processo de extração de DNA

Solução de Lise de Hemácias	0,5 mL de cloreto de magnésio 1M 0,2 mL EDTA pH 8,0 0,5M q.s.p. 100 mL de água destilada
Solução de Lise Celular	1 mL Tris pH 7,5 1M 0,1 mL EDTA pH 8,0 0,5 M 10 mL SDS 10% q.s.p. 100 mL de água destilada
Solução de Precipitação de Proteína	57,81g de acetato de amônia q.s.p. 100 mL de água destilada

#### 4.6. Quantificação do DNA extraído

Para a quantificação do DNA extraído foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific), com 2 µL de DNA ressuspenso.

#### 4.7. Amplificação da Região ITS1 do DNA Ribossomal pela PCR

Para a detecção de DNA nuclear de *Leishmania* spp., foi realizada em cada amostra a PCR para amplificação da região espaçadora ITS1 do DNA ribossomal (rDNA), onde foram utilizados os iniciadores (primers) PR280: 5'-AGCTGGATCATTTTCCGATG-3' e PR281: 5'-TATGTGAGCCGTTATCCACGC-3' que se anelam à sequências conservadas das subunidades SSU e 5.8S, respectivamente, gerando um produto esperado de 250 a 300 pares de bases (pb), dependendo da espécie de *Leishmania*.

A Tabela 2 apresenta os reagentes utilizados para esta reação e a Tabela 3 os ciclos utilizados na PCR. Ao término da reação uma alíquota de

10µL foi submetida à análise por eletroforese em gel de agarose 2% (80V, 50 min) corado com brometo de etídeo. Após a eletroforese os géis foram fotodocumentados (BioRad).

Tabela 2: Sistema utilizado para a PCR da região ITS1

Sistema	Volumes
Tampão Taq polimerase 10X	3,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,9 µL
dNTPs (10 mM)	0,6 µL
BSA (10 mg/mL)	0,3 µL
Taq Polimerase (5 U/µL)	0,4 µL
Primer PR280 (10 µM)	1,0µL
Primer PR281 (10 µM)	1,0µL
Água deionizada	12,8 µL
DNA purificado amostral (10 ng/µL)	10,0µL
Volume final	30µL

Tabela 3: Ciclos utilizados para a amplificação da região ITS1

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	1 min	1x
Desnaturação	94°C	30 s	35x
Anelamento	56°C	30 s	
Extensão	72°C	40 s	
Extensão final	72°C	1 min	1x

#### 4.8. Amplificação da Região 3' UTR do Gene *HSP70* pela PCR

Foi também realizada em cada amostra a amplificação da região 3' UTR do gene *HSP70*, utilizando-se os iniciadores PR513: 5'-CCAAGGTCGAGGAGGTCGACTA-3' e PR514: 5'-

ACGGGTAGGGGGAGGAAAGA-3. A Tabela 4 apresenta o sistema utilizado para essa reação e a Tabela 5, os ciclos utilizados nessa PCR.

Ao término da reação uma alíquota de 10µL foi submetida à análise por eletroforese em gel de agarose a 2% (80V, 50 min) corado com brometo de etídeo. Após a eletroforese os géis foram fotodocumentados (BioRad).

Tabela 4: Sistema utilizado para a PCR da região 3' UTR do gene *HSP70*

Sistema	Volumes
Tampão Taq polimerase 10X	3,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,9 µL
dNTPs (10 mM)	0,6 µL
BSA (10 mg/mL)	0,3 µL
Taq Polimerase (5 U/µL)	0,4 µL
Primer PR513 (10 µM)	1,0 µL
Primer PR514 (10 µM)	1,0 µL
Água deionizada	12,8 µL
DNA purificado amostral (10 ng/µL)	10,0 µL
Volume final	30µL

Tabela 5: Ciclos utilizados para amplificação da região 3' UTR do gene *HSP70* do DNA nuclear

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	1 min	1x
Desnaturação	95°C	30 s	
Anelamento	62°C	30 s	35x
Extensão	72°C	40 s	
Extensão final	72°C	1 min	1x

#### 4.9. Análise do Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (RFLP)

Para esta análise foram utilizados os produtos das PCRs tanto da região ITS1 como da região 3' UTR do gene *HSP70* que foram submetidos a digestão com a enzima de restrição Hae III. Essa enzima cliva as moléculas de DNA nas regiões GG<sup>↓</sup>CC. Os reagentes utilizados nesse sistema estão descritos na Tabela 6. O sistema foi incubado em banho maria por 2 h a 37°C. O produto final desse sistema foi analisado em gel de agarose a 2,5% (80V, 70 min) corados com brometo de etídeo. Os géis foram analisados no fotodocumentador (BioRad).

Tabela 6: Reagentes utilizados para digestão dos produtos das PCRs

Reagentes	Volumes
Produto amplificado (DNA)	20µL
Tampão NEB2 (New England Biolabs)10x	2,5µL
Enzima HaeIII (10 U/µL)	0,5µL
Água deionizada	2,0µL
Volume final	25 µL

#### 4.10. Análise da Integridade do DNA das amostras negativas.

As amostras que não apresentaram bandas detectáveis em nenhuma das reações de PCR foram submetidas a uma terceira reação de PCR para comprovar a existência de DNA na amostra e que este estava viável para as reações de PCR. Para isso utilizou-se a detecção da sequência gênica altamente conservada da enzima GAPDH de cães, utilizando os primers PR195 (5' AGTGAGCTTCCCGTTCAGC 3') e PR243 (5' CCTTCATTGACCTCAACTAC 3'). A Tabela 7 apresenta os reagentes utilizados para esta reação e a Tabela 8 os ciclos utilizados nessa PCR.

Ao término da reação uma alíquota de 10µL foi submetida à análise por eletroforese em gel de agarose 2% (80V, 50 min) corado com brometo de etídeo. Após a eletroforese os géis foram fotodocumentados (BioRad).

Tabela 7: Sistema utilizado para a PCR do gene *GAPDH* canino.

Reagentes	Volumes
TampãoTaq polimerase 10X	3,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,9 µL
dNTPs (10 mM)	0,6 µL
BSA (10 mg/mL)	0,3 µL
Taq Polimerase (5 U/µL)	0,4 µL
Primer PR195 (10 µM)	1,0 µL
Primer PR243 (10 µM)	1,0 µL
Água deionizada	12,8 µL
DNA purificado amostral (10 ng/µL)	10,0 µL
Volume final	30µL

Tabela 8: Ciclos utilizados para amplificação do gene *GAPDH* canino.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	1 min	1x
Desnaturação	95°C	30 s	35x
Anelamento	56°C	30 s	
Extensão	72°C	40 s	
Extensão final	72°C	1 min	1x

#### 4.11. Exames Sorológicos

Amostras de sangue total ou soro sanguíneo de animais suspeitos ou que iriam iniciar protocolo vacinal contra LVC foram encaminhados para o laboratório Tecsa<sup>®</sup>, localizado em Belo Horizonte, MG, onde foram realizados os exames de RIFI e ELISA utilizando-se kits com licença no Ministério da Agricultura (MAPA) numero 9347/2007 e 7434/2000, respectivamente,

segundo normas do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (Brasil, 2006).

#### **4.12. Hemograma e Bioquímica Sanguínea**

Foi realizada uma pesquisa nos prontuários dos animais cujo material biológico foi utilizado nessa dissertação. Foram coletados os resultados de hemograma e bioquímica sanguíneos para correlacionar as possíveis alterações com os resultados das PCRs, exames parasitológicos e sorológicos. Esses exames foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Animax. Para a contagem de células sanguíneas e aferição de hemoglobina utilizou-se o equipamento CC-530 Veterinário (Celm<sup>®</sup>), o volume globular foi aferido pela técnica do microhematócrito com tubos capilares centrifugados a uma velocidade de 10.000 a 12.000 rpm por 5 minutos, a contagem diferencial de leucócitos e plaquetas foi feita em lâminas de esfregaços sanguíneos coradas com corante hematológico rápido e analisadas em microscópio óptico com objetiva de 100x, e a proteína plasmática total determinada por refratômetro manual. Os testes de bioquímica sanguínea foram realizados no Analisador bioquímico semiautomático modelo Bio-200 (Bioplus<sup>®</sup>), e utilizando os kits ALT/GPT Liquiform, Fosfatase Alcalina Liquiform, Uréia UV Liquiform e Creatinina K (Labtest<sup>®</sup>) conforme instruções do fabricante.

#### **4.13. Ficha Epidemiológica**

Para todo animal incluído no estudo, foi preenchida uma ficha epidemiológica (Apêndice 1) que continha dados tais como endereço de residência, raça, sexo, características fenotípicas e dados sobre suas alterações clínicas.

#### **4.14. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no programa Graf PedPrism. As amostras das dosagens bioquímicas foram analisadas quanto à sua distribuição (normalidade). Assim, foram analisadas pelo teste t student e pós-teste de Wilcoxon. Os valores com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Distribuição Geográfica**

A maioria das amostras foi proveniente de cães que residiam nas proximidades do hospital veterinário, sendo assim os locais mais frequentes foram principalmente os condomínios pertencentes à Região Administrativa (RA) XIV (São Sebastião) com 26 amostras, seguido pela RA VII (Paranoá) com 13 amostras, RA XVI (Lago Sul) com 13 amostras, RA XIII (Santa Maria) com 3 amostras, RA XVIII (Lago Norte) com 2 amostras e RA XVII (Riacho Fundo) e RA XVI (Planaltina) ambas com apenas uma amostra cada, além de 2 amostras provenientes dos limites entre o DF o estado de Goiás (Figura 12).

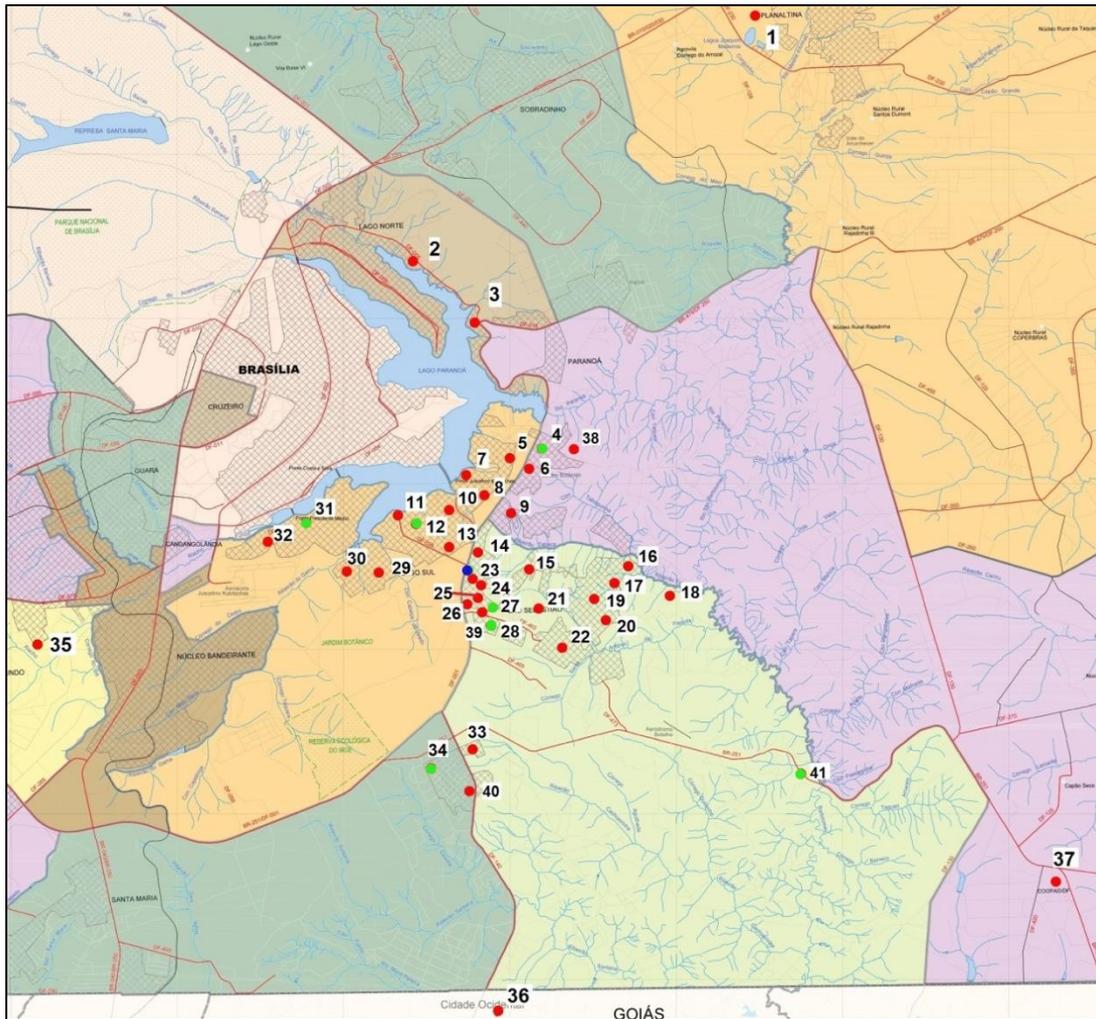


Figura 12: Distribuição geográfica dos locais de residência dos cães amostrados (Adaptado de IBGE, 2010).

● Hospital Veterinário

● Localidades onde residiam cães positivos para LVC

● Localidades onde residiam apenas cães negativos para LVC

- |   |   |
|---|---|
| 1. Planaltina (1 pos.)                      | 22. São Sebastião (1pos. e 1 neg.)            |
| 2. SMLN MI 3 (1 pos.)                       | 23. Cond. Jardim do Lago (1pos.)              |
| 3. SMLN MI 7 (1 pos.)                       | 24. Cond. Jd. Botânico V (1pos.)              |
| 4. SMLN.Minichacas do Lago Sul (1 neg.)     | 25. Cond. Estância Jd. Botânico (1pos.)       |
| 5. SHIS QI 29 (1pos.)                       | 26. Cond. Pq. Jd.das Paineiras (2 pos.)       |
| 6. Co. Estância Quintas da Alvorada (5pos.) | 27. Cond.Jardim Botânico VI (1 neg.)          |
| 7. SHIS QL 26 (1pos.)                       | 28. Jd Mangueiral (2pos.)                     |
| 8. SHIS QI 27 (1pos.)                       | 29. SHIS QI 19 (1pos.)                        |
| 9. Cond.Ville de Montagne (3pos. e 2 neg.)  | 30. SHIS QI 17 (2pos.)                        |
| 10. SHIS QI 25 (1pos.)                      | 31. SHIS QL 08 (1 neg.)                       |
| 11. SHIS QL 22 (1pos.)                      | 32. SHIS QI 05 (1pos.)                        |
| 12. SHIS QI 23 (1 neg.)                     | 33. Cond. Residencial Mênaco (1pos.)          |
| 13. SMDB CJ 12 (1pos.)                      | 34. Cond. Jardim Atlântico Sul (1 neg.)       |
| 14. Cond. Solar de Brasília (2pos.)         | 35. Riacho Fundo 1 (1 pos.)                   |
| 15. Cond. Quintas do Sol (1pos.)            | 36. Cond. Quintas do Itapuã (2pos.)           |
| 16. Cond. Belvedere Green (4 pos.)          | 37. PAD/DF (1pos.)                            |
| 17. Cond. Verde (1 pos.)                    | 38. Atilplano Leste (1pos.)                   |
| 18. Fazenda Taboquinha (1pos.)              | 39. SH Jardim Botânico III (1 neg.)           |
| 19. Cond. Ouro Vermelho I (1pos.)           | 40. Cond. Ecol.Pq do Mirante (1pos. e 1 neg.) |
| 20. Cond. Ouro Vermelho II (2pos.)          | 41. BR 251 Km 25 (1 neg.)                     |
| 21. Vila do Boa (São Sebastião) (1 pos.)    |   |

## 5.2. Exame Parasitológico

Das 61 amostras de medula óssea, 25 (40,98%) foram positivas no exame parasitológico. Dos cães que tiveram resultados positivos, 22/25 (88%) apresentavam pelo menos um sintoma de LVC. Dos positivos, 18/25 (72%) foram machos e 7/25 (28%) foram fêmeas. Dos cães negativos no exame parasitológico 21/36 (58,33%) foram fêmeas e 15/36 (41,66%) machos, e 20/36 (55,56%) apresentavam sintomas de LVC (Figura 13).

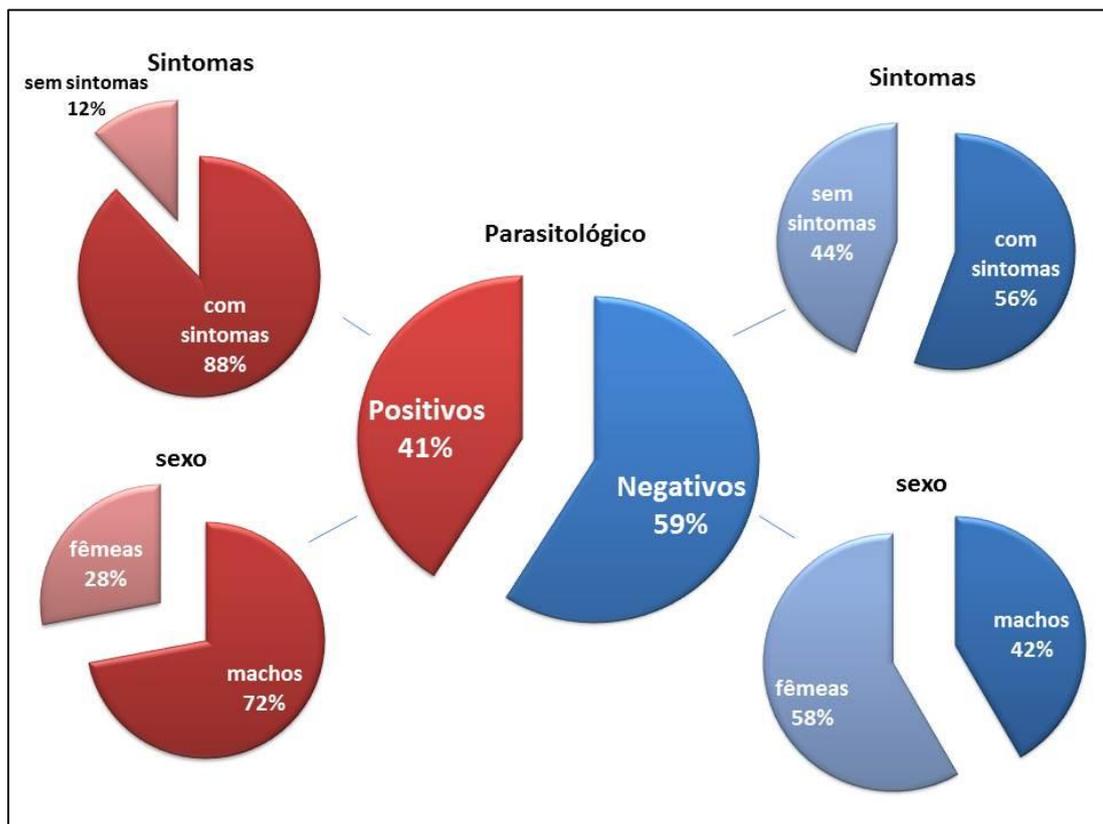


Figura 13: Representação gráfica dos valores dos resultados dos exames parasitológicos organizados por sexo e sintomatologia

A Figura 14-A, B e C apresenta fotomicrografias de esfregaços de medula óssea com imagens de amastigotas no interior de macrófagos de cães positivos no exame parasitológico, onde foi possível visualizar o cinetoplasto (seta) no interior da célula do parasito, e a Figura 14-D, amastigotas no citoplasma de um neutrófilo de sangue periférico.

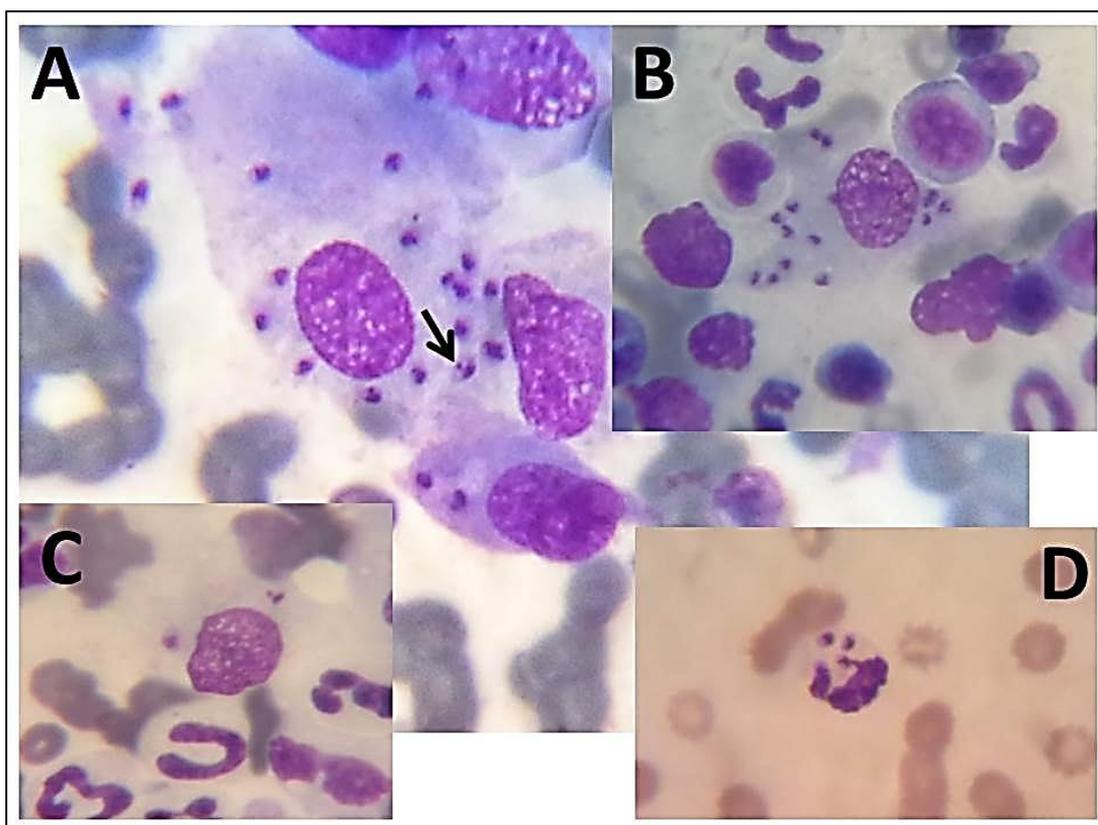


Figura 14: Fotomicrografia de amastigotas intracelulares em amostras teciduais caninas. A, B, C = Macrófagos de medula óssea repletos de amastigotas em seus citoplasmas, com visualização do cinetoplasto (seta). D = Neutrófilo segmentado de sangue periférico com três amastigotas em seu citoplasma. Material corado com corante hematológico rápido (aumento de 1000x) (Zimovski et al., 2016).

### 5.3. Exames Moleculares

Quarenta e oito das 61 amostras (78,69%) foram positivas na PCR da sequência ITS1 e 32 (52,46%) foram positivas na PCR da sequência 3'-UTR do gene *HSP70* (Figura 15).

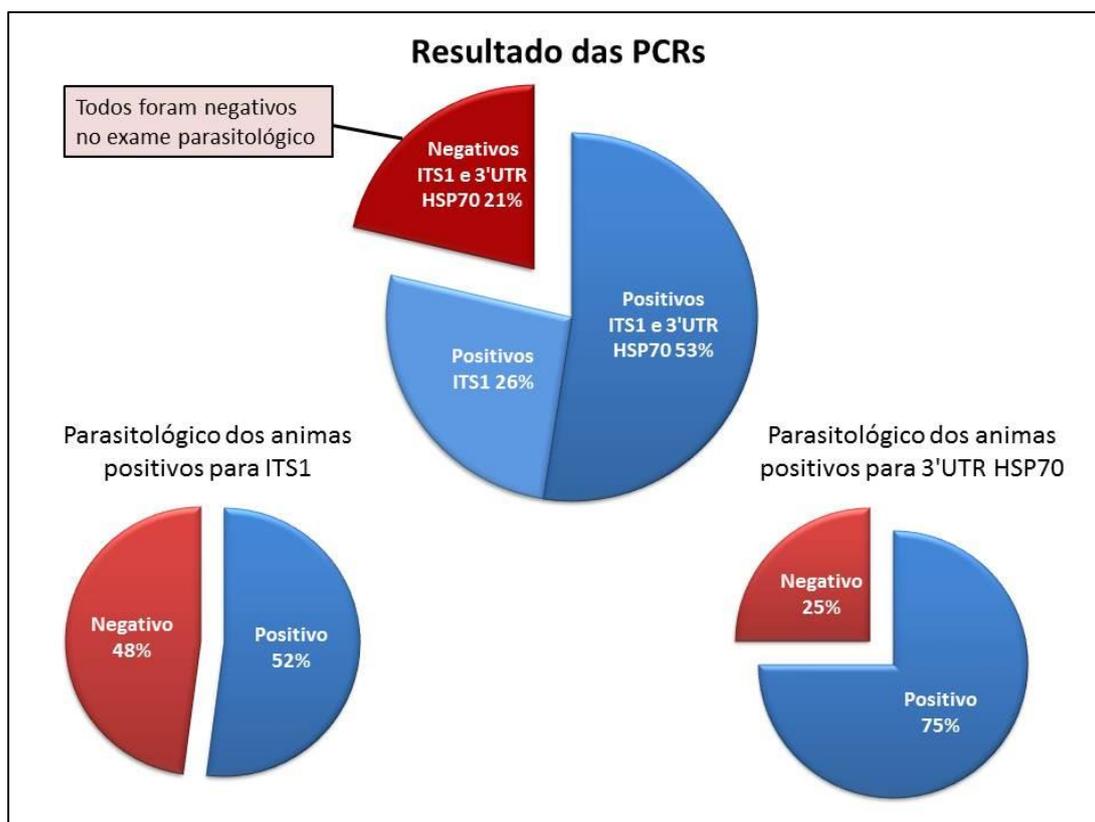


Figura 15: Representação gráfica dos resultados das PCRs para as sequências ITS1 do *rDNA* e 3'UTR do gene *HSP70*.

Os 25 animais que foram positivos no exame parasitológico foram positivos no PCR da sequência ITS1, e destes, apenas um foi negativo no PCR da sequência 3'-UTR do gene *HSP70*.

Dos 36 animais que tiveram o exame parasitológico negativo, 22/36 (61,11%) apresentaram PCR positivo para a sequência ITS1, e 8/36 (22,22%) também foram positivos para a sequência 3'UTR do gene *HSP70*.

Nenhuma amostra foi positiva apenas na PCR para a sequência 3'-UTR do gene *HSP70*, ou seja, todas as amostras positivas para esta sequência também foram positivas para sequência ITS1. No entanto 16 amostras foram positivas apenas para a sequência ITS1.

Dos animais positivos em ao menos uma PCR, 28/48 (58,33%) foram machos e 20/48 (41,67%) foram fêmeas. Do ponto de vista da sintomatologia, 31/48 (64,58%) foram sintomáticos, e 17/48 (36,42%) foram assintomáticos.

A Figura 16 apresenta a distribuição entre os diferentes fenótipos dos cães e o resultado dos testes moleculares.

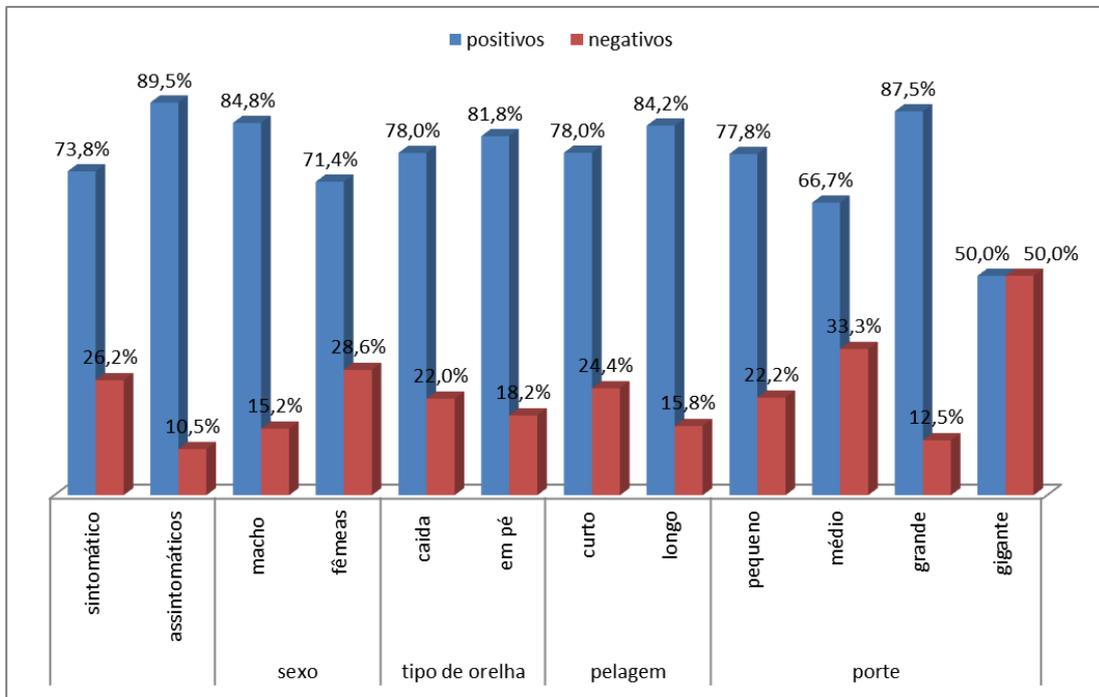


Figura 16: Representação gráfica dos resultados das PCRs relacionados com os padrões fenotípicos dos animais.

Exemplo de gel para a detecção de *Leishmania* sp. por PCR da região ITS1 do *rDNA* na Figura 17-A, que as amostras 57, 58, 25, 37, 44, 45, 46, 51, 52 e 55 representam amostras positivas onde foi detectado o produto de PCR de aproximadamente 240 pb, as amostras 28 e 59 representam amostras negativas, a coluna 13 representa o controle negativo (neg), a coluna 14 o controle positivo (Li), e a coluna 15 o marcador de peso molecular de 100 pb *ladder*. A Figura 18-A é um exemplo de gel para detecção de *Leishmania* sp. por PCR da sequência 3'-UTR do gene *HSP70*, onde as 59, 60, 61, 66 e 67 representam amostras negativas que não demonstraram produtos de PCR, as amostras 62, 63, 64 e 65 representam amostras positivas onde foi detectado o produto de PCR de aproximadamente 770 pb, a coluna 10

representa o controle negativo (neg), a coluna 11 o controle positivo (Li), e a coluna 12 o marcador de peso molecular de 100 pb *ladder*.

#### 5.4. Identificação das espécies de *Leishmania* por PCR-RFLP

Todos os produtos das PCRs positivas, tanto para a sequência ITS1 como para a sequência 3'-UTR do gene *HSP70*, foram submetidos ao processo de digestão com a enzima HaeIII. Das 48 PCRs positivas para a região ITS1, 30 apresentaram padrão de bandejamento compatível com a espécie *Leishmania infantum*, como exemplificado na Figura 17-B, representado pelas amostras 57, 58, 25, 44, 45, 52 e 55, onde foram detectados 3 fragmentos de aproximadamente 120, 70 e 55 pb, compatíveis com o controle de *L. infantum* (Li) representado pela coluna 11, e diferentes do padrão de restrição do controle de *L. braziliensis* (Lb), representado pela coluna 12. Dessas 48 PCRs positivas para a região ITS1, 18 não apresentaram bandas detectáveis e estão representadas nas amostras 37, 46 e 51 da Figura 17-B.

Dos 32 PCRs positivos para a sequência 3'-UTR do gene *HSP70*, 21 apresentaram padrão compatível com a espécie *L. infantum*, como exemplificado na Figura 18-B, representado pelas amostras 62, 63, 64 e 65, onde foram detectados 3 bandas de aproximadamente 440, 180, 120 pb, compatíveis com o controle de *L. infantum* (Li) representado pela coluna 6, e diferentes dos padrões de restrição dos controles de *L. amazonensis* (La), representada pela coluna 5, e *L. major* (Lm), representados pela coluna 8.

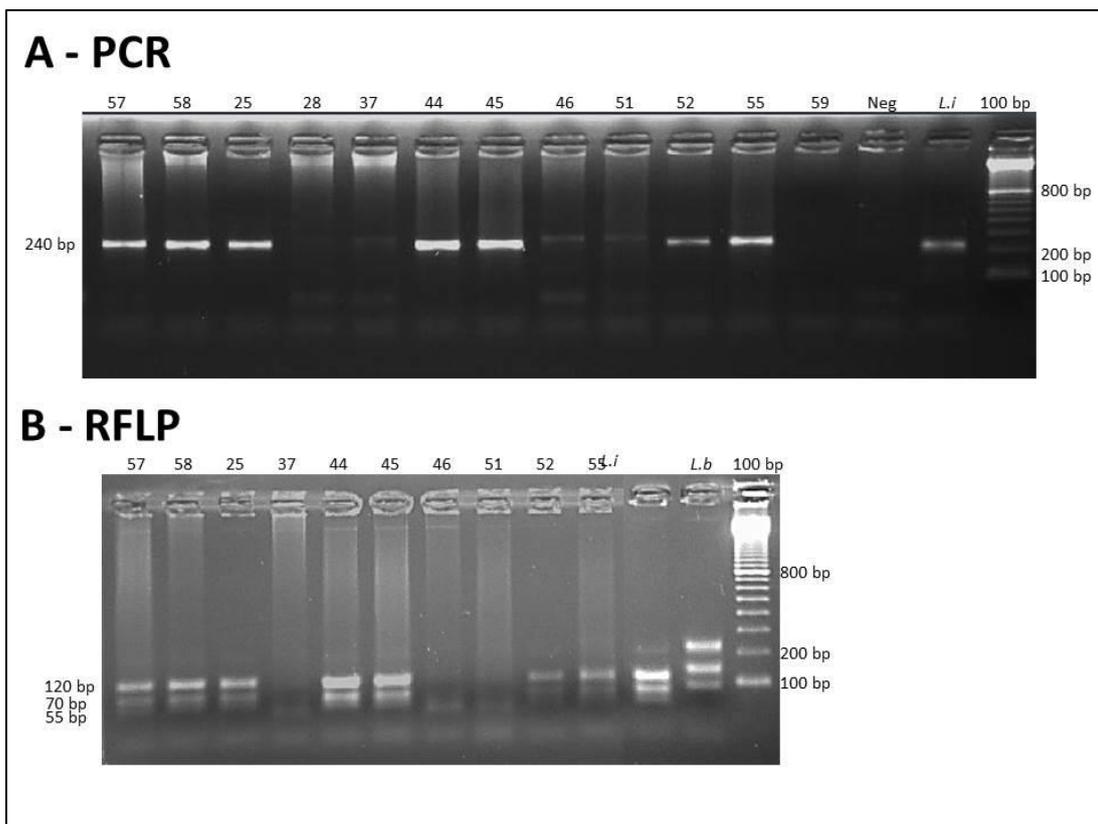


Figura 17: Géis utilizados para detecção e identificação por PCR-RFLP da região ITS1. Produtos amplificados por PCR da região ITS1 do rDNA de *Leishmania* (A) antes e (B) após digestão pela enzima HaeIII. Amostras: 57, 58, 25, 28, 37, 44, 45, 46, 51, 52, 55, 59, neg. = controle negativo, *Li* = *Leishmania infantum*, *Lb* = *Leishmania braziliensis*.

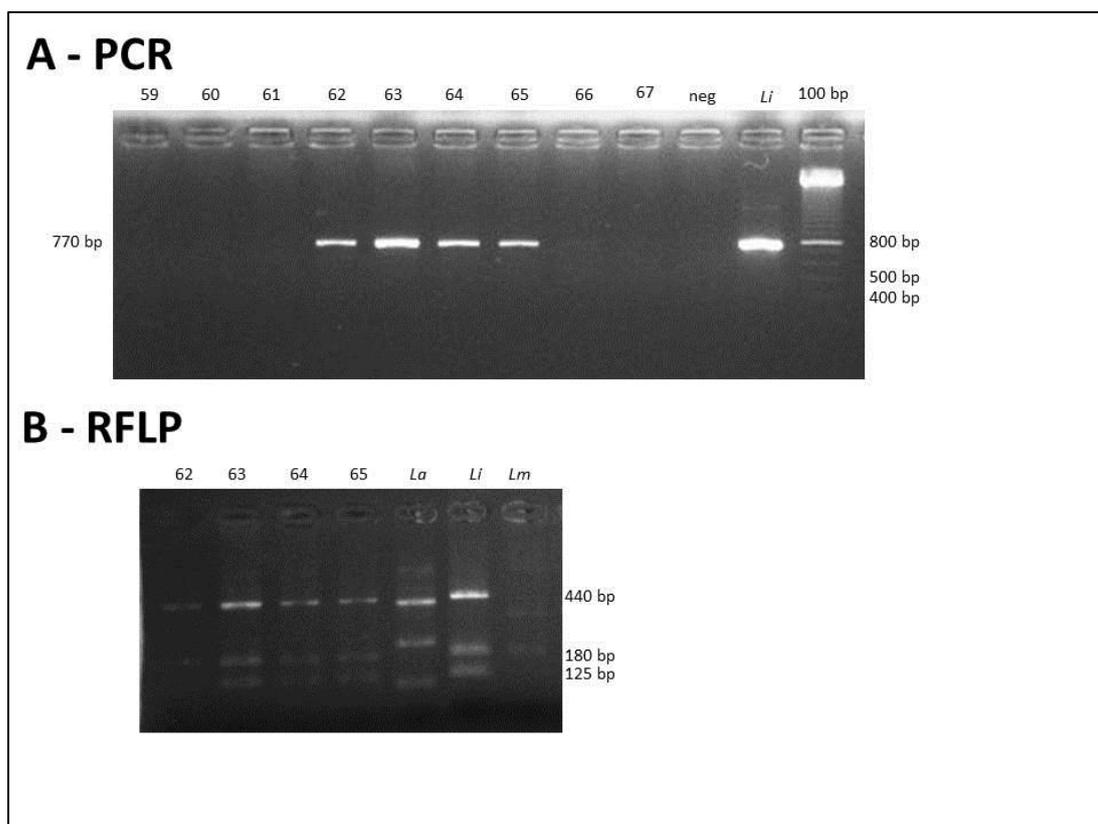


Figura 18: Géis utilizados para detecção e identificação por PCR-RFLP da região 3'-UTR HSP70. Produtos amplificados por PCR da região 3'-UTR do gene *HSP70* de *Leishmania* (A) antes e (B) após digestão pela enzima *HaeIII*. Amostras: 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, neg. = controle negativo, *Li* = *Leishmania infantum*, *La* = *Leishmania amazonensis*, *Lm* = *Leishmania major*. 100 pb ladder = marcador de massa molecular.

### 5.5. Análise da Integridade do DNA extraído das amostras negativas.

Treze amostras que não apresentaram bandas detectáveis em nenhuma das duas PCRs realizadas foram submetidas à PCR para detecção do gene *GAPDH* de cães para comprovar a existência e a integridade do DNA da amostra. Todas as 13 amostras apresentaram fragmentos detectáveis nesta reação conforme exemplo na Figura 19, onde observamos nas colunas 1, 2 e 3, bandas de aproximadamente 580 pb, das amostra 53, 56 e 59, na

coluna 4 o controle negativo, na coluna 5 controle positivo, e na coluna 6 o marcador de massa molecular de 100 pb *ladder*.

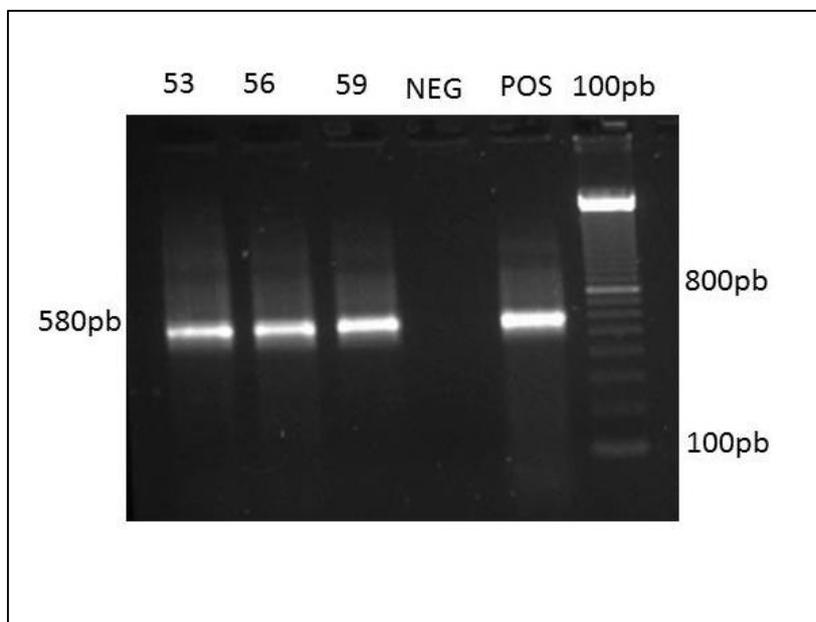


Figura 19: Gel utilizado para detecção por PCR do gene GAPDH de Cão. Amostras: 53, 56, 59, NEG = controle negativo, POS = controle positivo, 100pb *ladder* = marcador de massa molecular.

## 5.6. Exames Sorológicos

Foi possível recuperar resultados de exames sorológicos para LVC de 25 dos 61 cães participantes do estudo. Destes 25 resultados, 13 (52%) foram reagentes, 7 (28%) foram não reagentes e 5 (20%) foram indeterminados no teste de ELISA, e 18 (72%) foram reagentes (6 com titulação 1/40, e 12 com titulação 1/80) e 7 (28%) foram não reagentes no teste RIFI (Figura 20). Os resultados dos testes sorológicos, parasitológicos e moleculares destes 25 cães estão representados na Tabela 9.

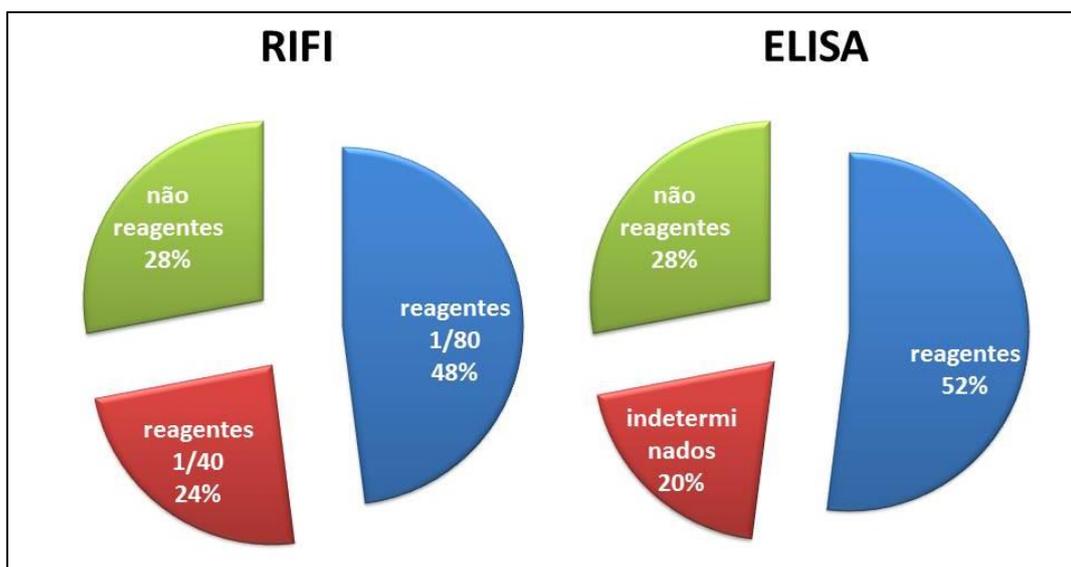


Figura 20: Representação gráfica dos resultados dos exames sorológicos de 25 cães.

Tabela 9: Resultados dos testes sorológicos, parasitológicos e moleculares dos 25 cães que possuíam resultados de exames sorológicos.

r = reagente, i = indeterminado, n = negativo, p = positivo, nd = não detectável.

Numero do Cão	ELISA	RIFI resultado e titulação	Parasitológico	PCR ITS1	PCR 3'-UTR HSP70
4	r	r 1/40	p	detectável	nd
7	r	r 1/40	n	nd	nd
9	r	r 1/80	p	detectável	detectável
11	r	n	n	detectável	detectável
15	i	n	n	detectável	nd
20	n	n	n	nd	nd
25	n	n	p	detectável	detectável
26	i	r 1/80	p	detectável	detectável
27	n	n	n	detectável	detectável
28	n	n	n	detectável	nd
29	r	r 1/40	n	detectável	nd
32	n	r 1/40	n	detectável	nd
33	n	r 1/40	n	detectável	nd
34	r	r 1/80	p	detectável	detectável
38	i	r 1/40	n	nd	nd
46	i	r 1/80	n	detectável	nd
47	r	r 1/80	n	detectável	nd
53	n	n	n	nd	nd
54	r	r 1/80	p	detectável	detectável
55	r	r 1/80	p	detectável	detectável
56	i	r 1/80	n	nd	nd
57	r	r 1/80	n	detectável	detectável
60	r	r 1/80	n	detectável	detectável
61	r	r 1/80	n	detectável	nd
66	r	r 1/80	n	detectável	detectável

## 5.7. Manifestações Clínicas

Quarenta e dois cães (68,85%) do estudo apresentaram um ou mais sintomas característicos de LVC, sendo que o grupo de manifestações clínicas viscerais foi o mais frequente entre os sintomáticos com 36/41 (87,8%) animais, estas incluíam: perda de peso, alterações gastrointestinais, fraqueza, epistáxe e uveíte. O segundo grupo de alterações mais frequentes foi o de Linfadenopatias, que incluía as linfadenomegalias generalizadas e localizadas, com 22/42 (52,38%) cães. O grupo de manifestações cutâneas apresentou 20/42 (47,62%), estas incluíam: alopecia, descamação, hiperqueratose, eritema, prurido, úlceras, nódulos, pústulas, onicogribose e lesões perioculares. O grupo das alterações locomotoras apresentou a menor frequência, com 9/42 (21,43%) de animais que apresentaram claudicações, paresias e/ou paralisias (Figura 21).

A Figura 22 apresenta exemplos de manifestações clínicas LVC observadas em um cão adulto da raça Leão da Rodésia que apresentou perda de peso, fraqueza, sinais gastrointestinais (diarreia), linfadenomegalia generalizada, alopecia, descamação, hiperqueratose, úlceras, onicogribose discreta e leões perioculares.

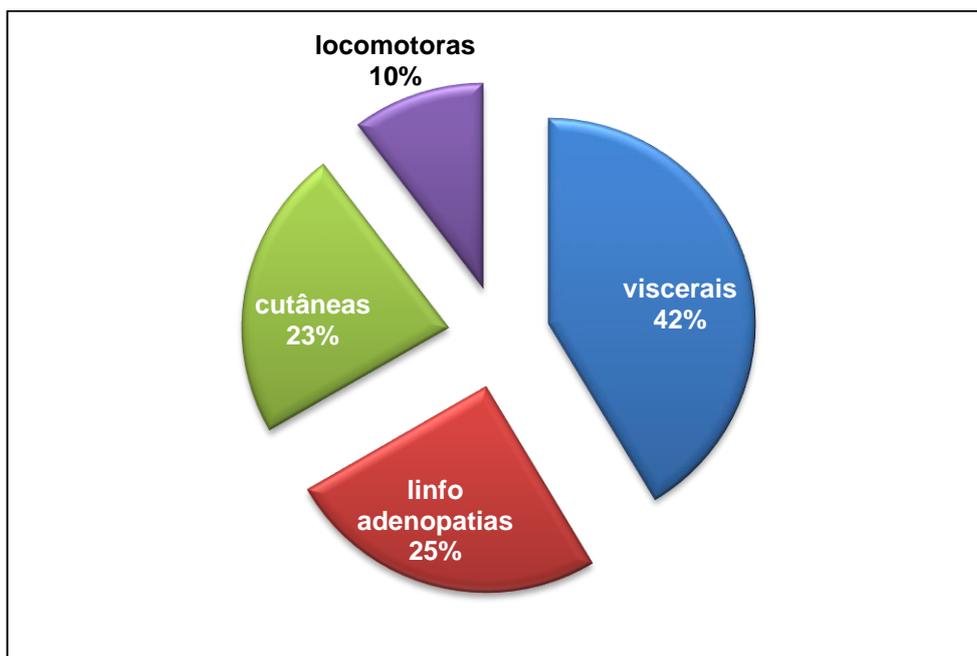


Figura 21: Representação gráfica da frequência dos tipos de manifestações clínicas dos cães sintomáticos.



Figura 22: Cão adulto da raça Leão da Rodésia apresentando manifestações clínicas características da LVC (Zimovski et al., 2015).

## 5.8. Exames Hematológicos

### 5.8.1. Eritrograma

Dos 61 animais que tiveram medula óssea utilizadas neste trabalho, 56 possuíam, em seus prontuários, resultados de hemogramas que foram analisados, esses exames foram realizados na mesma época da coleta da medula óssea. Desses 56 hemogramas, 30 (53,57%) apresentaram anemia, dos quais 16 (53,33% dos anêmicos) foram positivos para LVC no exame parasitológico. No entanto quando comparamos esses resultados com os animais que foram positivos no exame de PCR observamos que 25/30 (83,33% dos anêmicos) foram positivos (Figura 23).

Dos 43 animais positivos na PCR que possuíam hemograma em seus prontuários, 25/43 (58,14%) estavam anêmicos. Dos 13 negativos na PCR que possuíam hemograma, apenas 5/13 (38,46%) estavam anêmicos.

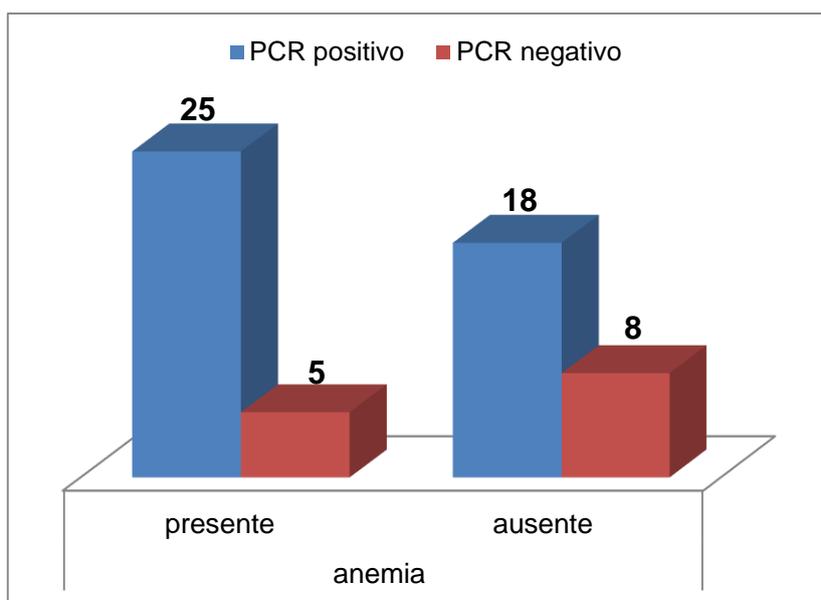


Figura 23: Distribuição dos resultados das PCRs relacionados com a ocorrência de anemia.

### 5.8.2. Leucograma

Dos 56 hemogramas analisados 24 não apresentavam alterações nos valores normais da contagem de leucócitos totais (LT), 16 apresentavam leucocitose e 16 leucopenia. Dos animais com contagem de LT normais, 18/24 (75%) foram positivos na PCR para LVC. De 16 cães que apresentaram leucocitose 12 (75%) foram positivos na PCR, e de 16 que apresentaram leucopenia 13 (81,25%) foram positivos na PCR (Figura 24). A Figura 25 apresenta as alterações observadas nas subpopulações de leucócitos.

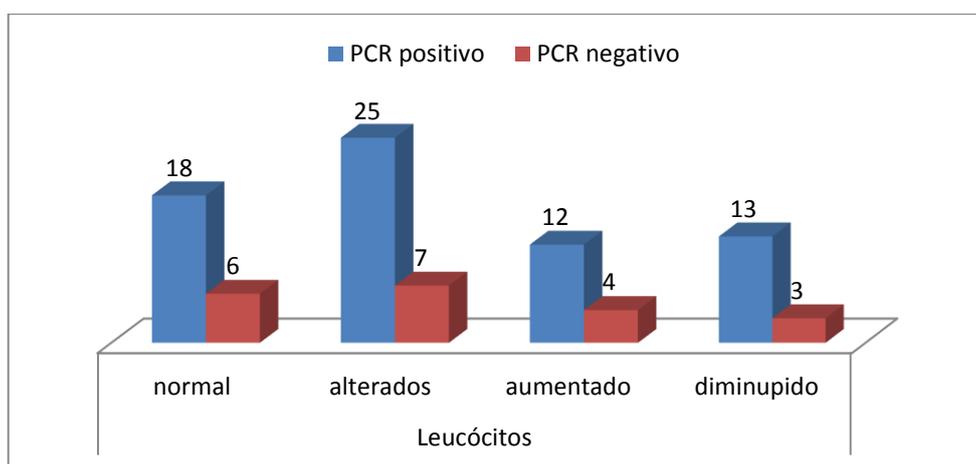


Figura 24: Distribuição dos resultados das PCRs relacionados com a contagem de leucócitos totais.

### 5.8.3. Trombocitograma

Ao analisar os 56 hemogramas constatou-se que apenas um deles não apresentava a contagem de plaquetas, pois estas se apresentavam agregadas, impossibilitando sua contagem. Das 55 contagens analisadas, 23/55 (41,82%) apresentavam trombocitopenia, sendo que destas 19/23 (82,61%) eram de animais positivos em ao menos uma PCR (Figura 26).

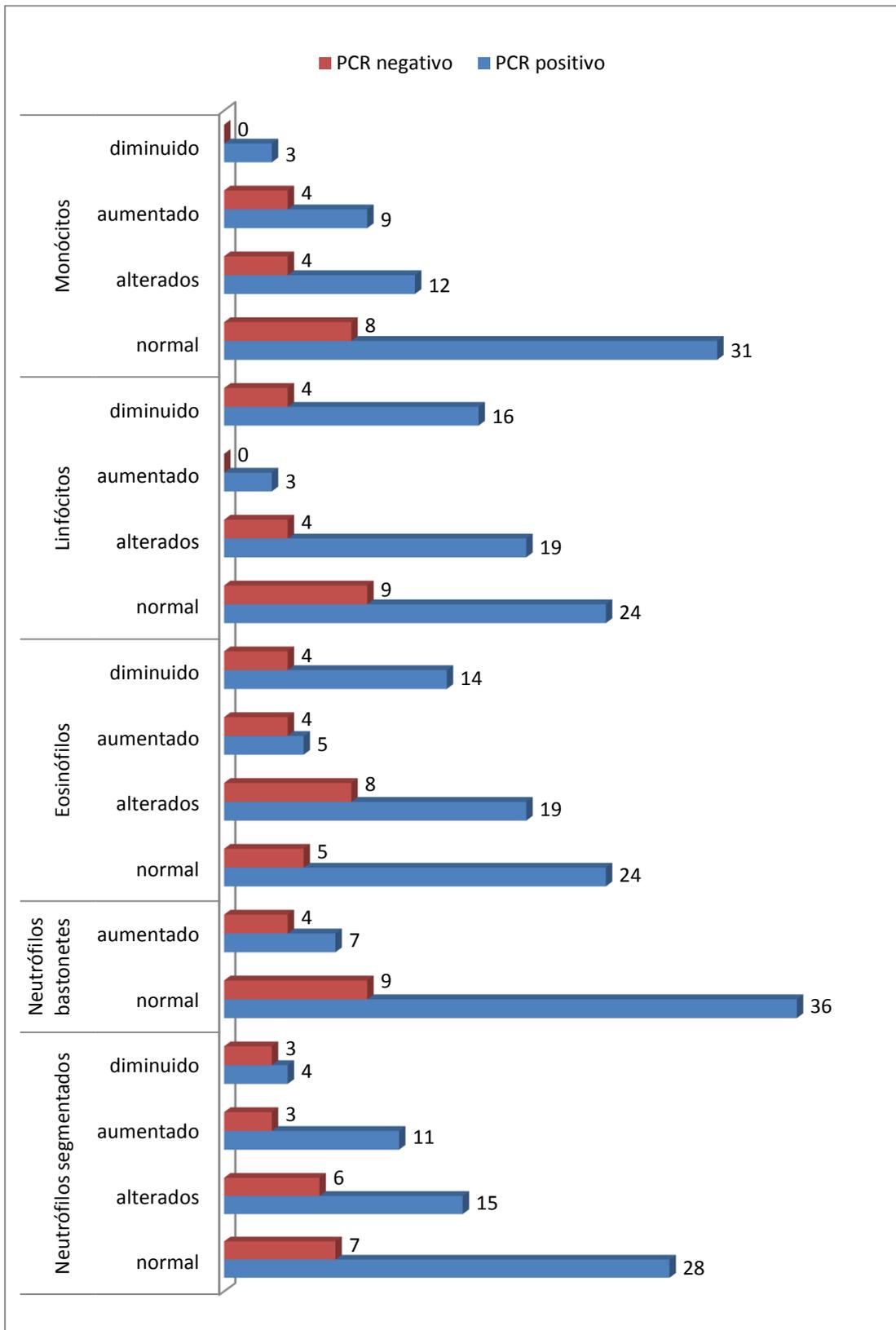


Figura 25: Distribuição dos resultados das PCRs relacionados com a contagem de subpopulações de leucócitos.

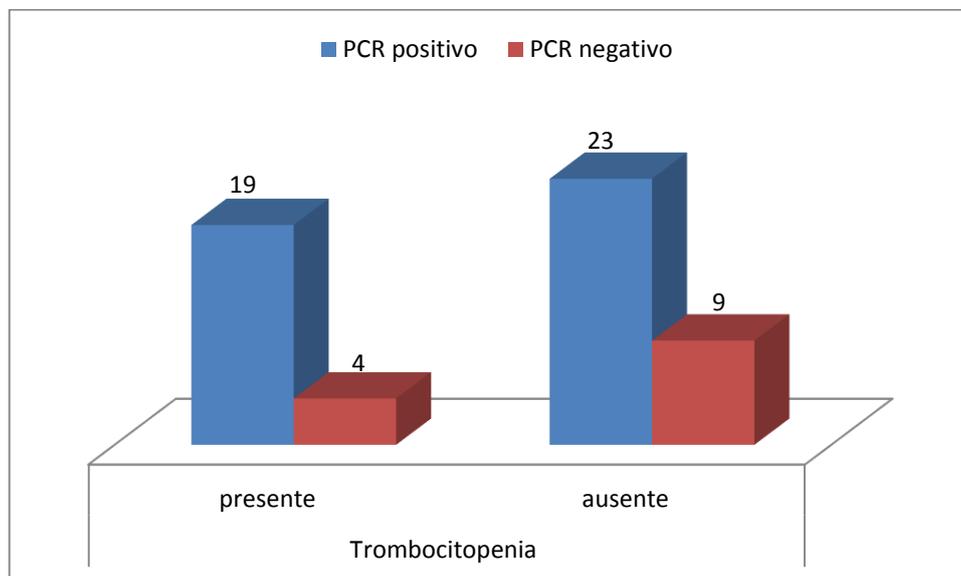


Figura 26: Distribuição dos resultados das PCRs relacionados com a ocorrência de Trombocitopenia.

## 5.9. Bioquímica Sanguínea

Dos 61 animais estudados, 54 apresentaram em seus prontuários resultados de dosagem de creatinina e Alanina aminotransferase (ALT) plasmáticas, e 50 resultados de ureia e Fosfatase Alcalina (FA) plasmáticas. Ao comparar as médias das dosagens de creatinina sérica destes cães, nota-se que a média das dosagens nos cães positivos na PCR para a região ITS1 foi maior (1.922mg/dl,  $\pm 1.925$ ) que a média dos negativos (1.233 mg/dl,  $\pm 1.421$ ), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. A Figura 27 representa a distribuição dos valores da creatinina sérica dos cães positivos e negativos na PCR para a região ITS1.

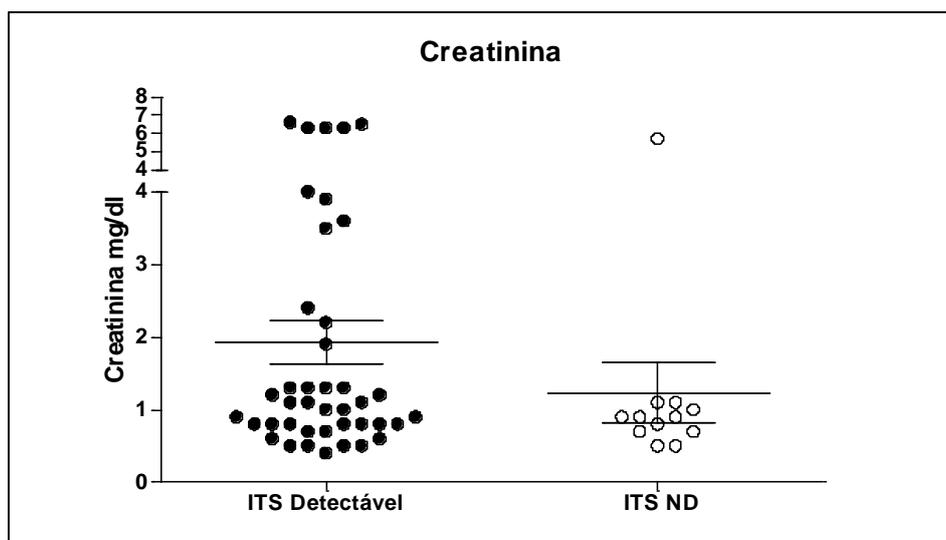


Figura 27: Distribuição dos valores de creatinina sérica. Cada ponto representa o valor de um indivíduo analisado. Comparação entre cães positivos na PCR para a sequência ITS1 (ITS Detectável) e cães negativos (ITS ND).

As médias das dosagens de ureia plasmática também foram diferentes, sendo maior nos animais positivos na PCR para a região ITS1 (94,58mg/dl,  $\pm 108,4$ ), comparada com a média dos cães negativos nesta PCR (30,82mg/dl,  $\pm 13,58$ ), como podemos observar na Figura 28, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.

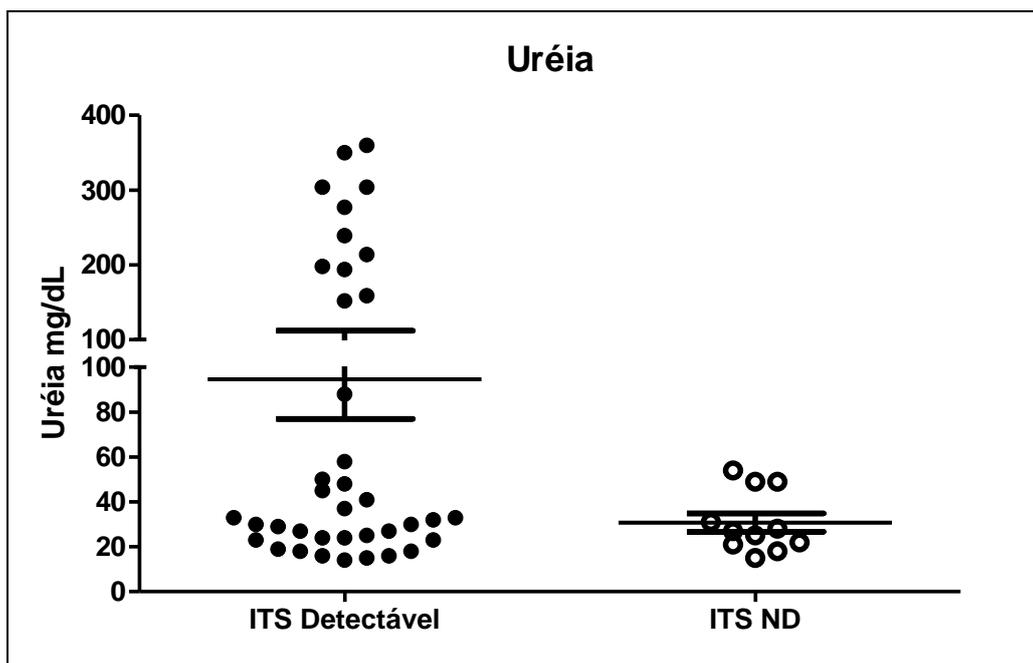


Figura 28: Distribuição dos valores de ureia sérica. Cada ponto representa o valor de um indivíduo analisados. Comparação entre cães positivos na PCR para a sequência ITS1 (ITS Detectável) e cães negativos (ITS ND).

A média das dosagens da enzima Fosfatase alcalina foi maior nos animais positivos na PCR para a região ITS (114,9 U/L,  $\pm 83,82$ ), quando comparada com a média dos cães negativos (88,27U/L,  $\pm 54,59$ ). Essa diferença também não foi estatisticamente significativa (Figura 29).

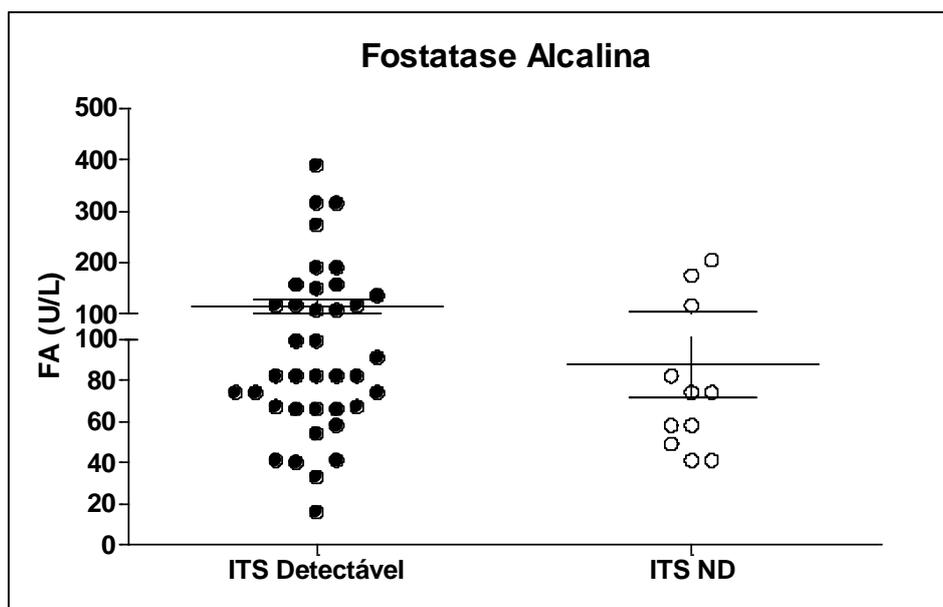


Figura 29: Distribuição dos valores de Fosfatase Alcalina sérica. Cada ponto representa o valor de um indivíduo analisados. Comparação entre cães positivos na PCR para a sequência ITS1 (ITS Detectável) e cães negativos (ITS ND).

Na comparação entre as médias das dosagens da enzima Alanina Aminotransferase (ALT) séricas, observamos que estas foram maiores em animais positivos na PCR da região ITS1 (62,83U/L,  $\pm 56,29$ ), do que em animais negativos (36,58U/L,  $\pm 16,01$ ), e esta diferença foi estatisticamente significativa com valor de  $p < 0,0001$  (Figura 30).

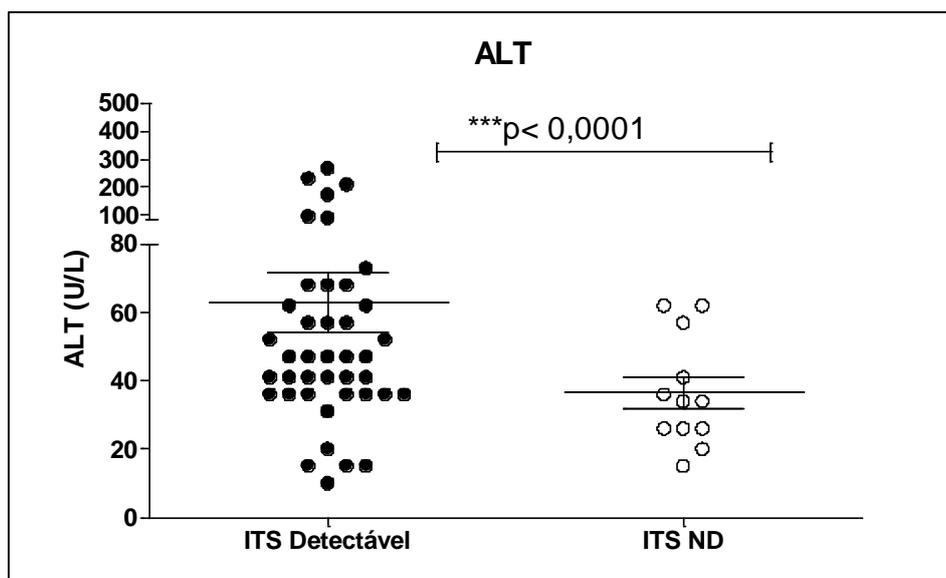


Figura 30: Distribuição dos valores de enzima Alanina Aminotransferase (ALT) sérica. Cada ponto representa o valor de um indivíduo analisados. Comparação entre cães positivos na PCR para a sequência ITS1 (ITS Detectável) e cães negativos (ITS ND).

## 6. DISCUSSÃO

A técnica de PCR, tanto para detecção da região ITS1 do rDNA como para detecção da sequência 3'-UTR do gene *HSP70* de *Leishmania*, se mostrou mais eficiente do que o exame parasitológico no diagnóstico de cães positivos para LVC, detectando a presença do DNA do parasito em amostras nas quais não se observou diretamente formas amastigotas do parasito. Todo animal que foi positivo no exame parasitológico foi positivo em pelo menos uma das PCRs. Isso pode ser explicado por diferenças na carga parasitária desses animais. Esse dado soma-se a outros estudos, nos quais as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas com o mesmo fim (Santos et al, 2014). Alguns animais que foram negativos no exame parasitológico e eram assintomáticos foram positivos para a PCR, mais uma vez a carga parasitária pode explicar esse fato, já que quando ela é baixa o exame parasitológico frequentemente resulta em falso negativo, o que reforça a importância de ferramentas moleculares no diagnóstico precoce da leishmaniose.

A técnica de PCR-RFLP com digestão dos produtos de PCRs pela enzima HaeIII foi eficiente na determinação da espécie de *Leishmania* na maioria das amostras positivas, nas quais só foi observado o perfil da espécie *Leishmania infantum*, aumentando a credibilidade das PCRs como meio diagnóstico.

A PCR para a detecção da sequência ITS1 do rDNA mostrou-se mais sensível que a PCR para a sequência 3'-UTR do gene *HSP70*, pois a primeira apresentou um número maior de amostras positivas em comparação com a segunda, diferentemente dos resultados obtidos por Monteiro et al. (2014) que obteve o mesmo resultado nas duas PCRs seguindo os mesmos protocolos, mas de amostras de linfonodo de cães eutanasiados. Essa diferença na sensibilidade das PCRs pode ser atribuída a diversos fatores, um deles pode ser o número de cópias de cada sequência no genoma da *Leishmania*, sendo

que a unidade de transcrição do DNA ribossômico repete-se mais de 100 vezes no genoma, e as unidades que codificam as proteínas HSP70 não possuem mais que 10 repetições (Cupolillo et al, 1995; Folgueira et al, 2007). Para entendermos melhor a causa dessas diferenças se faz necessário a realização de maiores estudos.

Quando analisados os exames sorológicos que estavam presentes nos prontuários dos animais, percebemos que na maioria dos animais que apresentaram exames reagentes esses animais também foram positivos na PCR, porém 3 cães apresentaram sorologia positiva para LVC, mas não foi detectado DNA de *Leishmania* sp. em nenhuma das duas PCRs e nem observado formas amastigotas do parasito no exame parasitológico da medula óssea. Esse fato pode ter ocorrido devido ao parasito estar restrito à pele e linfonodos dos animais, ou até mesmo não estar presente naquela amostra coletada ao acaso. Porém, outra hipótese seria a ocorrência de reação cruzada dos testes sorológicos com outros agentes infecciosos como outros tripanossomatídeos que infectam cães, *Ehrlichia canis*, entre outros agentes (Gomes et al, 2008). Uma terceira hipótese seria a detecção de anticorpos vacinais pelos testes sorológicos (WHO, 2010). Caso a segunda ou a terceira explicação seja verdadeira esses animais teriam sido eutanasiados mesmo não sendo portadores do parasito.

Dentre os animais positivos na PCR da região ITS1, observamos uma discreta predominância de cães do sexo masculino. No caso das características fenotípicas dos cães estudados, houve uma maior proporção de animais positivos entre os cães de orelhas caídas, pelagem curta, e de porte grande.

Quase 70% dos animais apresentaram ao menos uma manifestação clínica da LVC. Isso indica que a observação dos sinais clínicos foi o maior motivador para o clínico veterinário realizar a coleta de material biológico para diagnóstico de LVC, mesmo que a suspeita clínica da doença possa ser levantada por diversos fatores como exames sorológicos preventivos e alterações em exames complementares. A maioria dos cães apresentaram manifestações clínicas viscerais, confirmando o caráter de acometimento

sistêmico da doença. Alguns cães apresentaram sintomas, mas não foram confirmados como portadores do parasito em nenhum dos métodos realizados. Como a LVC é uma doença que não possui um sinal ou sintoma patognomônico, muitos desses podem ser atribuídos a outras doenças.

A análise dos exames complementares realizados nos cães desse estudo mostrou que houve uma maior proporção de cães anêmicos entre os animais positivos na PCR da região ITS1, quando comparada com a proporção de anêmicos entre os negativos, mostrando que esse achado clinicopatológico é um importante sinal da doença em cães corroborando com estudos anteriores (Nicolato et al, 2013).

Estudos mostram uma grande variabilidade nos valores das contagens de leucócitos totais em cães com LVC (da Costa-Val et al, 2007), esse fato vai de encontro com os resultados encontrados nas contagens de leucócitos realizadas, onde observamos que a proporção de animais que apresentaram leucocitose foi próxima da proporção dos animais que apresentaram leucopenia, e essas individualmente foram inferiores à proporção de animais com contagens consideradas normais. Mas ao somarmos as proporções das alterações, essa soma é superior à proporção de animais normais. Isso provavelmente ocorre devido às alterações que o parasito causa na medula óssea e nos órgãos do sistema imune dos animais infectados.

Cães positivos na PCR também apresentaram uma maior proporção de ocorrência de trombocitopenia, assim como cães infectados experimentalmente com *L. infantum* (Valladares et al, 1998), confirmando que esse parâmetro é um bom indicativo de suspeita da doença canina.

Nieto et al. (1992) demonstrou que cães com LVC podem apresentar lesões renais devido ao acúmulo de imunocomplexos no rim, provocando uma glomerulonefrite, o que leva a um acúmulo de ureia e creatinina no sangue periférico. Nesse estudo observamos que a média dos níveis de ureia e creatinina dos animais positivos para PCR foi maior em comparação com as médias dos animais negativos, no entanto essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Alterações no parênquima hepático assim como na função desse órgão vital podem ocorrer durante a infecção por *L. infantum* em cães (Giunchetti et al, 2008), essas alterações podem levar a um aumento das atividades das enzimas hepáticas como, por exemplo, a FA e a ALT. A média da atividade dessas enzimas apresentou-se maior em animais que foram positivos na PCR em relação a animais negativos, sendo que a diferença das médias das dosagens de FA não foram estatisticamente significantes, mas a diferença das dosagens de ALT foi. Esse aumento nas atividades das enzimas hepáticas também foi observado por outros estudos em animais infectados (Heidarpour et al, 2012; Rallis et al, 2005)

A localização geográfica das residências dos cães positivos na PCR mostra que a LVC está presente em diversas regiões do DF, e mesmo que o estudo tenha sido realizado com amostras de apenas um hospital veterinário, podemos ter uma ideia da extensão e do alcance que a doença está atingindo.

## 7. CONCLUSÕES

As técnicas moleculares utilizadas mostraram-se mais eficientes na detecção de cães infectados por *L. infantum*, tanto em animais sintomáticos como em animais assintomáticos.

A PCR para detecção da sequência ITS1 foi mais sensível que a PCR para detecção da sequência 3'-UTR do gene *HSP70*.

Os resultados dos testes sorológicos apresentaram algumas divergências com alguns resultados dos testes parasitológicos e moleculares.

A anemia e a trombocitopenia foram mais frequentes em animais positivos na PCR e a contagem de leucócitos apresentou grande variação nos seus valores.

As médias das dosagens de ureia, creatinina, FA e ALT foram maiores em animais positivos, sendo que no caso da ALT esta diferença foi estatisticamente significativa.

Apesar dos avanços científicos dos últimos anos, o diagnóstico da LVC continua sendo um desafio para o médico veterinário, mas com as novas ferramentas que vêm sendo utilizadas, principalmente no campo da biologia molecular, esse desafio tende a ser atenuado.

## 8. REFERÊNCIAS

Abreu-Silva, A. L., Lima, T. B., De Macedo, A. A., Moraes-Júnior, F. e. J., Dias, E. L., Batista, Z. a. S., Calabrese, K. S., Moraes, J. L., Rebêlo, J. M. & Guerra, R. M. (2008) Seroprevalence, clinical and biochemical data of dogs naturally infected by *Leishmania* and phlebotominae sandfly fauna in an endemic area in São Luis Island, Maranhão State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 17 Suppl 1, 197-203.

Acosta, L., Díaz, R., Torres, P., Silva, G., Ramos, M., Fattore, G., Deschutter, E. J. & Bornay-Llinares, F. J. (2015) Identification of *Leishmania infantum* in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 57(2), 175-6.

Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. & Team, W. L. C. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5), e35671.

Alves, G. B., Silva Ldos, S., Batista, J. F., Campos, A. P., Prianti, M. & Costa, F. A. (2013) The sero-conversion and evaluation of renal alterations in dogs infected by *Leishmania (Infantum) chagasi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 55(2), 105-12.

Bañuls, A. L., Hide, M. & Prugnolle, F. (2007) *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*, 64, 1-109.

Ben Slimane, T., Chouihi, E., Ben Hadj Ahmed, S., Chelbi, I., Barhoumi, W., Cherni, S., Zoghlami, Z., Gharbi, M. & Zhioua, E. (2014) An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected dogs and assessment of offspring's infectiousness potential by xenodiagnosis. *Vet Parasitol*, 206(3-4), 282-6.

Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F. & Jaffe, C. L. (2006) Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 44(4), 1435-9.

Berman, J. J. (2012) *Taxonomic Guide to Infectious Diseases: Understanding the Biologic Classes of Pathogenic Organisms* Elsevier/Academic Press.

Brasil, M. S. (2006) *Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral*, 1ª Edição edition.

Brasil, M. S., Secretaria Vigilância Saúde (2014) *Guia de Vigilância em Saúde*.

Cardoso, R. M., de Araújo, N. N., Romero, G. A., Souza, T. T., Dietrich, A. G., Mendes, J. D., Reis, M. L., Ferreira, J. B., Hecht, M. M. & Gurgel-Gonçalves, R. (2015) Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. *Parasit Vectors*, 8, 171.

Carranza-Tamayo, C. O., Carvalho, M. o. S., Bredt, A., Bofil, M. I., Rodrigues, R. M., Silva, A. D., Cortez, S. M. & Romero, G. A. (2010) Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43(4), 396-9.

Carvalho, F. S., Wenceslau, A. A., Albuquerque, G. R., Munhoz, A. D., Gross, E., Carneiro, P. L., Oliveira, H. C., Rocha, J. M., Santos, I. A. & Rezende, R. P. (2015) *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in dogs in Brazil: epidemiology, co-infection, and clinical aspects. *Genet Mol Res*, 14(4), 12062-73.

Cecilio, P., Perez-Cabezas, B., Santarem, N., Maciel, J., Rodrigues, V. & Cordeiro da Silva, A. (2014) Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. *Front Immunol*, 5, 480.

Cupolillo, E., Grimaldi Júnior, G., Momen, H. & Beverley, S. M. (1995) Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, 73(1-2), 145-55.

da Costa-Val, A. P., Cavalcanti, R. R., de Figueiredo Gontijo, N., Michalick, M. S., Alexander, B., Williams, P. & Melo, M. N. (2007) Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *Vet J*, 174(3), 636-43.

Dantas-Torres, F. (2009) Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors*, 2 Suppl 1, S1.

Dantas-Torres, F., Fundação Oswaldo Cruz, R., Brazil, Brandão-Filho, S. P. & Fundação Oswaldo Cruz, R., Brazil (2006) Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 48(3), 151-156.

de Almeida Leal, G. G., Roatt, B. M., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., Carneiro, C. M., Giunchetti, R. C., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A., Francisco, A. F., Cardoso, J. M., Mathias, F. A., Correa-Oliveira, R., Carneiro, M., Coura-Vital, W. & Reis, A. B. (2014) Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 205(3-4), 472-82.

de Oliveira, J. P., Fernandes, F., Cruz, A. K., Trombela, V., Monteiro, E., Camargo, A. A., Barral, A. & de Oliveira, C. I. (2007) Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biol Dis*, 6, 5.

de Paiva-Cavalcanti, M., de Moraes, R. C., Pessoa-E-Silva, R., Trajano-Silva, L. A., Gonçalves-de-Albuquerque, S. a. C., Tavares, D. e. H., Brelaz-de-Castro, M. C., Silva, R. e. F. & Pereira, V. R. (2015) Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*, 5, 31.

dos Santos Júnior, A. e. C., Kalume, D. E., Camargo, R., Gómez-Mendoza, D. P., Correa, J. R., Charneau, S., de Sousa, M. V., de Lima, B. D. & Ricart, C. A. (2015) Unveiling the *Trypanosoma cruzi* Nuclear Proteome. *PLoS One*, 10(9), e0138667.

Englund, P. T., Agbo, E. E., Lindsay, M. E., Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Yildirim, G. & Zhao, Z. (2005) RNAi libraries and kinetoplast DNA. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 6), 1409-12.

Faria, A. R. & Andrade, H. M. d. (2012) Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saude*, 3(2), 47-57.

Faria, A. R., Universidade Federal de Minas Gerais, B. H., Brasil, Andrade, H. M. d. & Universidade Federal de Minas Gerais, B. H., Brasil (2012) Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saude*, 3(2), 47-57.

Ferreira, L. T., Gomes, A. H. & Pereira-Chioccola, V. L. (2015) GENOTYPE CHARACTERIZATION OF *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* ISOLATED FROM HUMAN AND CANINE BIOPSIES WITH AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 57(3), 257-62.

Folgueira, C., Cañavate, C., Chicharro, C. & Requena, J. M. (2007) Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology*, 134(Pt 3), 369-77.

Fraga, D. B., Pacheco, L. V., Borja, L. S., Tuy, P. G., Bastos, L. A., Solcà, M. a. S., Amorim, L. D. & Veras, P. S. (2016) The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(1), e0004333.

Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Carneiro, C. M., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Marques, M. J., Tafuri, W. L. & Reis, A. B. (2008) Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic

compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 84(2), 269-77.

Gomes, Y. M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R. A., Abath, F. G. & Alves, L. C. (2008) Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J*, 175(1), 45-52.

Harhay, M. O., Oliaro, P. L., Costa, D. L. & Costa, C. H. (2011) Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*, 27(9), 403-9.

Heidarpour, M., Soltani, S., Mohri, M. & Khoshnegah, J. (2012) Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitol Res*, 111(4), 1491-6.

IBGE, I. B. d. G. e. E., *Distrito Federal, Divisão Político-Administrativa: Subdistritos*. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão.

Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., et al. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733), 436-42.

Karagiannis-Voules, D. A., Scholte, R. G., Guimarães, L. H., Utzinger, J. & Vounatsou, P. (2013) Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(5), e2213.

Khanra, S., Datta, S., Mondal, D., Saha, P., Bandopadhyay, S. K., Roy, S. & Manna, M. (2012) RFLPs of ITS, ITS1 and hsp70 amplicons and sequencing of ITS1 of recent clinical isolates of Kala-azar from India and Bangladesh confirms the association of *L. tropica* with the disease. *Acta Trop*, 124(3), 229-34.

Lainson, R. (2010) Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amaz Saude*, 1(2), 13-32.

Lumsden, W. H. R. & Evans, D. A. (1976) *Biology of the Kinetoplastida*, 2 vols. London ; New York: Academic Press.

Madeira, M. d. F., Uchôa, C. M. A., Leal, C. A., Silva, R. M. M., Duarte, R., Magalhães, C. M. & Serra, C. M. B. (2003) *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 551-555.

Maia, C. & Campino, L. (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*, 158(4), 274-87.

Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P. & Gravino, A. E. (2015) Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with

meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit Vectors*, 8, 289.

Monteiro, A. G., Lima, B. D. d. & Favali, C. B. F. (2014) *Diagnóstico molecular e identificação das espécies de Leishmania na leishmaniose visceral canina no Distrito Federal, Brasil*. Dissertação. Universidade de Brasília (UnB), 2014-07-17. Available online: [http://repositorio.unb.br/handle/10482/16973?mode=full&submit\\_simple=Mostrar+item+em+formato+completo](http://repositorio.unb.br/handle/10482/16973?mode=full&submit_simple=Mostrar+item+em+formato+completo)[Acessado 05/02/2016].

NCBI.gov (2016) *Leishmania infantum genome view* 2016. Available online: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=5671](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=5671)[Acessado 05/02/2016].

Nicolato, R. e. C., de Abreu, R. T., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D., Reis, L. E., Carvalho, M., Carneiro, C. M., Giunchetti, R. C., Bouillet, L. E., Lemos, D. S., Coura-Vital, W. & Reis, A. B. (2013) Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One*, 8(12), e82947.

Nieto, C. G., Navarrete, I., Habela, M. A., Serrano, F. & Redondo, E. (1992) Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, 45(1-2), 33-47.

Oliveira, T. M., Pereira, V. F., Benvença, G. U., Martin, M. F., Benassi, J. C., da Silva, D. T. & Starke-Buzetti, W. A. (2015) Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. *Rev Bras Parasitol Vet*, 24(2), 220-2.

OPS/OMS, O. P. A. d. S. (2015) *Leishmaniose: Informe Epidemiológico das Américas*. <http://new.paho.org/leishmaniasis>: Organização Pan Americana de Saúde. Available online: <http://new.paho.org/leishmaniasis>[Acessado 05/02/2016].

Pace, D. (2014) Leishmaniasis. *J Infect*, 69 Suppl 1, S10-8.

Papadogiannakis, E. I. & Koutinas, A. F. (2015) Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 163(3-4), 94-102.

Paşa, S., Tetik Vardarlı, A., Erol, N., Karakuş, M., Töz, S., Atasoy, A., Balcioğlu, I. C., Emek Tuna, G., Ermiş, Ö., Ertabaklar, H. & Özbel, Y. (2015) Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. *Vet Parasitol*.

Pennisi, M. G., Cardoso, L., Baneth, G., Bourdeau, P., Koutinas, A., Miró, G., Oliva, G. & Solano-Gallego, L. (2015) LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasit Vectors*, 8, 302.

Rallis, T., Day, M. J., Saridomichelakis, M. N., Adamama-Moraitou, K. K., Papazoglou, L., Fytianou, A. & Koutinas, A. F. (2005) Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol*, 132(2-3), 145-52.

Ranasinghe, S., Wickremasinghe, R., Hulangamuwa, S., Sirimanna, G., Opathella, N., Maingon, R. D. & Chandrasekharan, V. (2015) Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* DNA in skin biopsy samples in Sri Lanka where the causative agent of cutaneous leishmaniasis is *Leishmania donovani*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(8), 1017-23.

Reis, A. B., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R. C., Carneiro, C. M., Mayrink, W., Tafuri, W. L. & Corrêa-Oliveira, R. (2009) Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 128(1-3), 87-95.

Requena, J. M., Chicharro, C., García, L., Parrado, R., Puerta, C. J. & Cañavate, C. (2012) Sequence analysis of the 3'-untranslated region of HSP70 (type I) genes in the genus *Leishmania*: its usefulness as a molecular marker for species identification. *Parasit Vectors*, 5, 87.

Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P. & Perieres, J. (1990) Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, 65(3), 111-25.

Romero, G. A. & Boelaert, M. (2010) Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(1), e584.

Santos, T. R., Carreira, V. S., Ferrari, H. F., Moreira, M. A. & Luvizotto, M. C. (2014) Comparison of PCR with stained slides of bone marrow and lymph nodes aspirates with suspect diagnosis for leishmaniasis. *Acta Trop*, 140, 137-40.

Saporito, L., Giammanco, G. M., De Grazia, S. & Colomba, C. (2013) Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(8).

Saridomichelakis, M. N. (2009) Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol*, 20(5-6), 471-89.

Secretaria de Estado de Saúde do DF, S. d. V. à. S., Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde (2013) *Informativo Ambiental das Leishmanioses no DF*. Boletim anual 2013:

Secretaria de Estado de Saúde do DF, S. d. V. à. S., Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde (2015) *Informativo Ambiental das Leishmanioses no DF 2015*. Boletim anual 2015:

Shapira, M., McEwen, J. G. & Jaffe, C. L. (1988) Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J*, 7(9), 2895-901.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 165(1-2), 1-18.

Tojal da Silva, A. C., Cupolillo, E., Volpini, A. C., Almeida, R. & Romero, G. A. (2006) Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health*, 11(9), 1388-98.

Valladares, J. E., Ruiz De Gopegui, R., Riera, C., Alberola, J., Gállego, M., Espada, Y., Portús, M. & Arboix, M. (1998) Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Res Vet Sci*, 64(3), 195-8.

VectorBase (2016) *Lutzomyia longipalpis* VectorBase. Available online: <https://www.vectorbase.org/organisms/lutzomyia-longipalpis> [Acessado 05/02/2016].

WHO, W. H. O. (2010) *Control of the Leishmaniases : Report of a meeting of the Who Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010*. Geneva: World Health Organization.

WHO, W. H. O. (2013) *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases : second WHO report on neglected tropical diseases*.

WHO, W. H. O. (2015) Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2013. In. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>: Control of Neglected Tropical Diseases [Acessado 05/02/2016].

## 9. APENDICE 1

### Ficha Epidemiológica

Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina nas regiões de São Sebastião, Jardim Botânico e Lago Sul, do Distrito Federal, Brasil.

Identificação(nome):

Número:

Data da coleta:

Responsável pela coleta:

Origem:

Sexo:

Porte:

Raça:

Pelagem:

Orelhas:

Sorologia:

Classificação clínica:

- Sem sinais clínicos
- Com sinais clínicos

1. Linfadenopatia:

1.1. Generalizada: \_\_\_ SIM \_\_\_ NÃO

1.2. Localizada:

1.2.1. Linf. Submandibular:

1.2.2. Linf. Pré-escapular:

1.2.3. Linf. Poplíteo

2. Anomalias locomotoras:

3. Sinais viscerais:

3.1. Perda de peso:

3.2. Fraqueza:

3.3. Alterações Gastrointestinais:

3.4. Epistaxe:

3.5. Uveítes:

4. Sinais cutâneos:

4.1. Alopecia:

4.2. Descamação:

4.3. Hiperkeratose:

4.4. Eritema:

4.5. Prurido:

4.6. Úlceras:

4.7. Nódulos:

4.8. Pústulas:

4.9. Onicogribose:

4.10: Lesões oculares