

JULIANA MARIOTTI GUERRA

**New insights into distinct eco-epidemiological scenarios of canine visceral  
leishmaniasis in São Paulo state, Brazil: from diagnosis to parasite-host  
interaction**

Thesis presented to the Graduate Program  
in Experimental and Comparative  
Pathology of the School of Veterinary and  
Animal Sciences of Veterinary Medicine  
and Animal Sciences of the University of  
São Paulo to obtain a PhD in Sciences

**Department:**

Pathology

**Concentration Area:**

Experimental and Comparative Pathology

**Advisor:**

Prof. Dr. Bruno Cogliati

Approved by: \_\_\_\_\_

Advisor

São Paulo  
2019

**P.S.: The original version is available at the FMVZ-USP Library**

Total or partial reproduction of this work is permitted for academic purposes with the proper attribution of authorship and ownership of the rights.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3745  
FMVZ

Guerra, Juliana Mariotti

New insights into distinct eco-epidemiological scenarios of canine visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil: from diagnosis to parasite-host interaction / Juliana Mariotti Guerra. – 2019.  
161 p. : il.

Título traduzido: Novas perspectivas sobre os diferentes cenários eco-epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no Estado de São Paulo, Brasil: do diagnóstico à interação parasita-hospedeiro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.  
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.  
Orientador: Prof. Dr. Bruno Cogliati.

1. Cães. 2. *Leishmania infantum*. 3. Diagnóstico. 4. Genótipo. 5. Biomarcadores. I. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Novas perspectivas sobre os diferentes cenários eco-epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no Estado de São Paulo, Brasil: do diagnóstico à interação parasita-hospedeiro.", protocolada sob o CEUA nº 4079280115 (ID 001237), sob a responsabilidade de **Bruno Cogliati** e equipe; **Juliana Mariotti Guerra** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 08/04/2015.

We certify that the proposal "New insights into the distinct eco-epidemiologic scenarios of canine visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil: from diagnosis to parasite - host interaction.", utilizing 150 Dogs (150 males), protocol number CEUA 4079280115 (ID 001237), under the responsibility of **Bruno Cogliati** and team; **Juliana Mariotti Guerra** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/08/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2015** a **03/2019** ÁREA: **0**

Origem:

Espécie: **Cães**

Linhagem: **N/A**

sex: **Misto**

idade: **a**

N: **150**

Peso: **a**

Local do experimento:

São Paulo, 23 de janeiro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

## ABSTRACT

GUERRA, J. M. **New insights into distinct eco-epidemiological scenarios of canine visceral leishmaniasis in São Paulo state, Brazil:** from diagnosis to parasite-host interaction. [Novas perspectivas sobre os diferentes cenários eco-epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no estado de São Paulo, Brasil: do diagnóstico à interação parasita-hospedeiro]. 2019. 161 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Visceral leishmaniasis (VL), caused by the protozoan parasite *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and transmitted to humans and reservoir hosts by female sandflies, represents a serious public health problem due to its continuous expansion to new areas and urban centers. In São Paulo (SP) state, Brazil, VL has a distinct temporal-geographic pattern dispersion, first appeared in the northwestern (NWSP) region, spreading in a southeastern (SESP) direction over time. The epidemiology and ecology of the disease in a particular region are determined by characteristics of the parasite, vertebrate hosts and invertebrate vectors species. Domestic dogs are widely considered to be the main reservoir of the parasite, that leads to the canine visceral leishmaniasis (CVL), which usually precedes human cases. The objectives of this doctoral thesis were to improve the cytopathological methods for direct diagnosis of CVL and to analyze the pathological and molecular fundamentals of host-parasite interactions from different eco-epidemiological scenarios in SP state, Brazil. In a first instance, we performed cytopathological methods as smear cytology (SC), liquid-based cytology (LBC), cell block (CB) and immunocytochemistry (ICC) in popliteal lymph nodes samples of dogs naturally infected with *L. infantum* to improve the CVL diagnosis. We showed that SC was the most accurate morphological diagnostic method (45.0%). Besides, LBC reduced the number of unsatisfactory cases (low sampled cell number), allowed excellent cellular preservation and the application of ancillary techniques, such as CB and ICC. CB-ICC alone or associated with SC demonstrated significantly higher sensitivity (70.00% and 72.00%, respectively) when compared to the SC alone (34.00%). CB-ICC showed to be more effective in the detection of infected animals with mild clinical signs and a promising tool to improve diagnosis of CVL and may be applied in routine epidemiological screening. Subsequently, lymph nodes samples of dogs naturally infected with *L. infantum* from NWSP and SESP of SP state were subject to a series of histopathology and

immunohistochemistry (IHC) analysis to describe microscope lesions, parasite load, and cytokine profile. We evidenced differences between the two eco-epidemiologic scenarios of CVL in SP state. In SESP region, a marked subcapsular inflammatory infiltration and histiocytosis were noted in the popliteal lymph node tissues, while significantly higher parasite burden ( $p = 0.0004$ ) and IHC scores of IL-1 $\beta$  ( $p = 0.0275$ ) and IL-4 (0.0327) were observed in animals from NWSP area. A final study proposed the characterization of the parasite genotype in dogs naturally infected with *L. infantum* from SESP and NWSP areas. The deletion genotype of *L. infantum* on LinJ.31.2380 locus was predominantly identified in the SESP, with a frequency of 44.44%, while the non-deletion genotype was observed in 35.19% of the samples ( $p = 0.01945$ ) from the NWSP area. Eight (14.81%) and three (5.56%) samples from NWSP demonstrated a third, mixed profile for the deleted site, representing heterozygosity equivalent and non-equivalent, respectively. This study showed no statistical difference among the specific genotype, the clinical status and the parasite load in the popliteal lymph node samples of the dogs. Differences in genetic profile of *L. infantum* population and in the host immune response associated with higher parasite burden in dogs can also contribute to explain the distinct eco-epidemiological patterns of VL in specific geographic regions of SP state, which requires the development of early/accurate diagnosis, better control and surveillance strategies to improve both public and animal health.

**Keywords:** Dogs. *Leishmania infantum*. Diagnosis. Genotype. Biomarkers.

## RESUMO

**GUERRA, J. M. Novas perspectivas sobre os diferentes cenários eco-epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no estado de São Paulo, Brasil:** do diagnóstico à interação parasita-hospedeiro. [New insights into distinct eco-epidemiological scenarios of canine visceral leishmaniasis in São Paulo state, Brazil: from diagnosis to parasite-host interaction.]. 2019. 161 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A leishmaniose visceral (LV), causada pelo parasito protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* e transmitida para humanos e hospedeiros por fêmeas de flebotomíneos, representa um grave problema de saúde pública devido à sua contínua expansão para novas áreas e centros urbanos. No estado de São Paulo (SP), a LV apresenta um padrão de dispersão temporal e geográfica distinta, surgindo inicialmente na região noroeste (NOSP), e espalhando-se no sentido sudeste (SESP) ao longo do tempo. A epidemiologia e ecologia da doença em uma determinada região são determinadas pelas características das espécies parasitos, hospedeiros vertebrados e vetores invertebrados. Cães domésticos são amplamente considerados como o principal reservatório do parasito, que leva à leishmaniose visceral canina (LVC), a qual geralmente precede os casos humanos. Os objetivos desta tese de doutorado foram aprimorar as técnicas citopatológicas para o diagnóstico direto da LVC e analisar os fundamentos patológicos e moleculares das interações parasito-hospedeiro advindos de diferentes cenários eco-epidemiológicos no Estado de São Paulo. Em um primeiro momento, realizamos exames citopatológicos como a citológica convencional (CC), a citologia de base líquida (CBL), o emblocado celular (EC) e a imunocitoquímica (ICC) em amostras de linfonodos poplíteos de cães naturalmente infectados com *L. infantum* para o aprimoramento diagnóstico da LVC. Nós demonstramos que CC foi o método diagnóstico morfológico mais preciso (45,0%). Além disso, a CBL reduziu o número de casos insatisfatórios (baixo número de células amostradas), permitiu excelente preservação celular e a aplicação de técnicas complementares, como EB e ICC. O EB-ICC sozinho ou associado ao CC demonstrou sensibilidade significativamente maior (70,00% e 72,00%, respectivamente) quando comparado ao CC isolado (34,00%). O EB-ICC mostrou-se mais eficaz na detecção de animais infectados com sinais clínicos leves e uma

ferramenta promissora para melhorar o diagnóstico de LVC, podendo ser aplicado na triagem epidemiológica de rotina. Posteriormente, amostras de linfonodos de cães naturalmente infectados com *L. infantum* do NWSP e SESP do Estado de SP foram submetidos a uma série de análises histopatológicas e imuno-histoquímicas (IHQ) para descrever lesões microscópicas, carga parasitária e perfil de citocinas. Evidenciamos diferenças entre os dois cenários eco-epidemiológicos da CVL no Estado de SP. Na região SESP, um acentuado infiltrado inflamatório subcapsular e histiocitose foram notados nos tecidos dos linfonodos poplíteos, enquanto uma carga significativamente maior de parasitos ( $p = 0,0004$ ) e dos escores IHQ de IL-1 $\beta$  ( $p = 0,0275$ ) e IL-4 (0,0327) foram observados em animais da área do NOSP. Um estudo final propôs a caracterização do genótipo do parasito em cães naturalmente infectados com *L. infantum* das áreas SESP e NOSP. O genótipo com deleção no loco LinJ.31.2380 de *L. infatum* foi predominantemente identificado no SESP, com uma frequência de 44,44%, enquanto o genótipo de não-deleção foi observado em 35,19% das amostras ( $p = 0,01945$ ) da área da NOSP. Oito (14.81%) e três (5.56%) amostras do NOSP demonstraram um terceiro perfil misto para o sítio deletado, representando heterozigosidade equivalente e não equivalente, respectivamente. Este estudo não mostrou diferença estatística entre o genótipo específico, o estado clínico e a carga parasitária nas amostras de linfonodo poplíteo dos cães. Diferenças no perfil genético da população de *L. infantum* e na resposta imune do hospedeiro associada a maior carga parasitária em cães também podem contribuir para explicar os distintos padrões eco-epidemiológicos da LV em regiões geográficas específicas do Estado de São Paulo, o que requer o desenvolvimento precoce diagnóstico preciso, melhor controle e estratégias de vigilância para aprimorar a saúde pública e animal.

Palavras-chave: Cães. *Leishmania infatum*. Diagnóstico. Genótipo. Biomarcadores.