INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Utilização da PCR Diagnóstica, Imunohistoquímica e perfil
epidemiológico de Leishmania em cães no município de Porto
Nacional – TO**

KLEVERSON WESSEL DE OLIVEIRA

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:

Profa. Dra. Nanci do Nascimento

Orientador:

Prof. Dr. Delvonei Alves de Andrade

São Paulo

2017

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Utilização da PCR Diagnóstica, Imunohistoquímica e perfil
epidemiológico de Leishmania em cães no município de Porto
Nacional – TO**

KLEVERSON WESSEL DE OLIVEIRA

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:

Profa. Dra. Nanci do Nascimento

Orientador:

Prof. Dr. Delvonei Alves de Andrade

Versão Corrigida

Versão Original Disponível no IPEN

São Paulo

2017

Ficha catalográfica

OLIVEIRA, Kleverson Wessel de Oliveira

Utilização da PCR diagnóstica, Imunohistoquímica e Perfil epidemiológico de Leishmania em cães no Município de Porto Nacional – TO/Kleverson Wessel de Oliveira. Orientador: Nanci do Nascimento; Delvonei Alves de Andrade. São Paulo, 2017
69p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear. Área de concentração (Aplicações) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo

1. Leshmanioses 2. Diagnóstico 3. Epidemiologia 4. Zoonoses

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Kleverson Wessel de Oliveira

Título: Utilização da PCR diagnóstica, Imunohistoquímica e Perfil epidemiológico de Leishmania em cães no Município de Porto Nacional – TO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: 23/11/2017

Banca examinadora

Prof. Dr. Delvonei Alves de Andrade

Instituição: IPEN

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

Instituição: IPEN

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr^a. Martha Simões Ribeiro

Instituição: IPEN

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Instituição: Instituto Butantã - IB

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Véliz

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Julgamento: Aprovado

DEDICATÓRIA

A Deus que me deu força e motivos para vencer todos os obstáculos impostos ao meu aprendizado, aos meus pais, irmãos, esposa e ao meu filho, Lucas, pelo apoio, carinho e amor para comigo nesse momento de uma conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma conquista e por me proporcionar força e proteção.

A professora Dra. Nanci do Nascimento, que muito contribuiu pela Pós-graduação no Estado do Tocantins e por ter me aceito como seu orientando e possibilitar trilhar no doutorado (*in memoriam*).

Ao Professores. Dr. Patrick Spencer e Dr. Delvonei Alves de Andrade por terem aceitado dar continuidade nesse trabalho na ausência da Prof. Dra. Nanci do Nascimento e que contribuíram para as correções do mesmo.

Ao médico veterinário Dr. Fabrício Pereira Frota, por ter auxiliado nas necropsias e avaliação clínica dos cães com grande relevância, para o êxito do trabalho de campo.

Aos Professores da Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. Waldesse Pirajá Oliveira, a Prof^a. Dra. Jaqueline Dias de Oliveira pelas orientações da PCR, bem como por ter disponibilizado o laboratório para as análises de campo e PCR e a Prof^a. Dr^a. Solange Carreiro, pela disponibilização do Laboratório de Microbiologia Aplicada durante os ensaios da PCR e trabalho de campo.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco, pelas valorosas orientações e também por disponibilizar meios para execução dos ensaios de Imunohistoquímica no Instituto de Medicina tropical de São Paulo.

A Dra. Carla Pagliari pela execução e orientações dos ensaios de Imunohistoquímica no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Mauro Cortez do Instituto de Biomedicina da Universidade de São Paulo, pela orientação e apoio aos ensaios de PCR.

Ao médico patologista, Dr. Virgílio Ribeiro Guedes, por realizar a preparação das amostras de tecidos para Imunohistoquímica.

À Secretaria de Estado da Saúde do Tocantins, através do Departamento de Vigilância Epidemiológica pela disponibilização dos dados epidemiológicos, bem como a plotagem dos pontos de coleta.

Ao Convênio Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos Porto (ITPAC-PORTO) e Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, e aos organizadores desse convênio, Fernando Moreira e ao Prof. Dr. André Senna.

Ao Médico Veterinário e Gerente do Centro de Controle de Zoonoses – CCZ, Dr. Elder Costa Luz, por ter aceito e também contribuído na realização desse trabalho no CCZ. Aos agentes de Endemias, Elvado Valeriano Martins, Elton Cleiton Pereira Sousa e Vizelia Coelho Soares, por terem me auxiliado na captura e eutanásia dos cães. Ao Coordenador da Leishmaniose do município, Wilson dos Santos, por apoio nas organizações dos dados epidemiológicos e no suporte das capturas dos cães.

Aos funcionários do Reconhecimento Geográfico, Amilton Ribeiro Cunha e Domival Oliveira dos Santos, pelo auxílio na demarcação dos pontos de capturas dos cães. Aos agentes da entomologia, Jose Antônio de Sousa Parente e Anisio Tavares dos santos, pelas coletas e identificação de flebotomíneos.

Aos coordenadores, Francisco Aridan e Jose Manduca Ayres Filho, por disponibilizar os dados epidemiológicos e os funcionários da Secretaria Municipal para a realização dos trabalhos de campo.

Ao Prof. Msc. Thompson Turíbio e ao Prof. Dr. Guilherme Benko pelo auxílio do tratamento estatístico dos dados epidemiológicos.

Ao Prof. Msc. André Moreira Rocha e a Prof. Dra. Josefa Moreira do Nascimento pelo apoio nos ensaios histológicos e bem como pelas orientações referentes a parte ética do trabalho.

À Prof^a. MSc. Carina Scolari Gosch pela disponibilização laboratorial nos trabalhos de campo.

Ao Biólogos Augusto de Almeida e Heguel Belmiro pelas críticas na revisão do trabalho.

À Faculdade Objetivo de Palmas pela minha liberação durante todo o trabalho.

RESUMO

OLIVEIRA, Kleverson Wessel. **Utilização da PCR diagnóstica, Imunohistoquímica e Perfil Epidemiológico de Leishmania em cães no Município de Porto Nacional TOCANTINS**. 2017. 76p. Tese (Doutorado em tecnologia nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN - CNEN/SP. São Paulo

A Leishmaniose é uma doença parasitária que se apresenta sob várias formas clínicas, desde a mucocutânea até a visceral que é a forma mais grave da doença. Essa, é causada por um parasita flagelado do gênero *Leishmania* e apresenta um ciclo de vida heteróximo, envolvendo o repasto sanguíneo da fêmea de flebotômio em animais silvestres e domésticos, como os cães, bem como no homem. Até o momento, o controle da Leishmaniose Visceral (LV) está associado a eliminação de reservatório infectado (cães), porém, isso requer métodos de diagnósticos confiáveis. Nesse estudo, foi utilizado a PCR diagnóstica a partir das sequências spliced leader de RNA (mini-exon) e ensaio Imunohistoquímico, utilizando *leishmanias* spp. marcadas com anticorpos policlonais de biópsias embebidas em parafina. Além disso, utilizamos dados epidemiológicos de Leishmaniose canina e humana do município de Porto Nacional e do Estado Tocantins. Todos os fragmentos de fígado, baço e linfonodo apresentaram amplificação para *L. infantum chagasi* e nenhuma para *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Ao comparar a IHQ em relação a PCR, mostrou-se haver fraca replicabilidade, com P-valor obtido (0,0077), portanto $p < 0,05$, denotando não haver concordâncias entre os dois testes. Quanto aos dados epidemiológicos de Porto Nacional, eles indicaram uma queda significativa do número de cães com Leishmaniose Visceral no ano de 2011 em relação a 2010, no entanto, esse número aumentou gradativamente, alcançando os índices de 2011 no ano de 2014. Para os casos humanos, os anos de 2010 e 2011 foram os anos com maiores registros, apresentando um declínio significativo a partir desse período. No comparativo entre casos humanos e caninos, verifica-se que enquanto os casos humanos apresentaram-se em queda a partir de 2011, os casos caninos vêm aumentando chegando a registrar-se maiores que os humanos a partir de 2012

Palavras-chaves: Leishmanioses; diagnóstico; epidemiologia; zoonoses.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Kleverson Wessel. **Use of diagnostic PCR, Immunohistochemistry and epidemiological profile of Leishmania in dogs in the municipality of Porto Nacional-Tocantins**. 2017. 76p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo

Leishmaniasis is a parasitic disease that presents various clinical forms, from mucocutaneous to visceral, which is the most severe form of the disease. It is caused by a flagellate parasite of the genus *Leishmania* and presents a heteroxenic life cycle, involving blood feeding of the female sand flies in wild and domestic animals, such as dogs, as well as in humans. So far, control of Visceral Leishmaniasis (LV) is associated with the elimination of infected reservoir (dogs), however, this requires reliable diagnostic methods. In this study, the diagnostic PCR based on the spliced leader sequences of RNA (mini-exon) and Immunohistochemistry, using leishmanias spp. labeled with paraffin embedded biopsy polyclonal antibodies were used. In addition, we used epidemiological data on canine and human Leishmaniasis in the municipality of Porto Nacional and the state of Tocantins. All fragments of liver, spleen and lymph node showed amplification for *L. infantum chagasi* and none for *L. braziliensis* or *L. amazonensis*. When comparing IHC with respect to PCR, there was a low replicability, with a P-value of 0.0077, therefore $p < 0.05$, denoting that there were no concordances between the two tests. Regarding epidemiological data from Porto Nacional, they indicated a significant decrease in the number of dogs with Visceral Leishmaniasis in 2011 compared to 2010, however, this number increased gradually, reaching the indexes of 2011 in 2014. For human cases, the years 2010 and 2011 were the years with the highest records, showing a significant decline from that period. In the comparison between human and canine cases, it is verified that while human cases have fallen since 2011, canine cases have been increasing and have become larger than humans since 2012

Keywords: Leishmanioses; diagnosis; epidemiology; zoonoses

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sinais clínicos investigados dos cães analisados com sorologia positiva para Leishmaniose visceral	43
Tabela 2 - Resultados da amplificação por PCR em isolados de Leishmania do fígado de cães do Município de Porto Nacional - TO com Forma clínica e sorologia positiva para Leishmaniose visceral	49
Tabela 3 - Resultados da amplificação por PCR em isolados de Leishmania do Baço de cães do Município de Porto Nacional-TO com Forma clínica e sorologia positiva para Leishmaniose visceral	50
Tabela 4 - Resultados da amplificação por PCR em isolados de Leishmania de linfonodos de cães do Município de Porto Nacional -TO com Forma clínica e sorologia positiva para Leishmaniose Visceral.....	51
Tabela 5 - Resultados obtidos da reação de Imunohistoquímica para o diagnóstico de Leishmaniose visceral canina em amostras de fígado e baço de cães infectados	52
Tabela 6 - Análise comparativa da associação dos testes de PCR com Imunohistoquímica para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em amostras oriundas de fígados e baço.....	53
Tabela 7 - Resultados anuais de sorologia para Leishmaniose visceral canina expressos em percentuais de casos positivos (%), número casos positivos absolutos, intervalo de confiança para a proporção (%) e total de casos examinados em Porto Nacional.....	54
Tabela 8 - Tabela comparativa do número de casos notificados e confirmados com os respectivos Intervalo de Confiança de Leishmaniose Visceral Humana em Porto Nacional	55
Tabela 9- Comparativo do número de casos notificados em relação aos confirmados com os respectivos Intervalo de Confiança de Leishmaniose Visceral Humana no Tocantins	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Criança com quadro de emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa, hepatoesplenomegalia.	17
Figura 2 – Lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas. ...	18
Figura 3 – Forma cutâneo disseminada com acometimento facial.	19
Figura 4 - Forma cutâneo difusa, com acometimento da face, orelha e membros superiores.	19
Figura 5 - forma mucosa tardia com lesão ulcerada do palato mole.	20
Figura 6 - Flebotomíneo.	23
Figura 7 - formas ilustrativas de <i>Leishmania</i> “A” amastigotas, encontradas nos hospedeiros vertebrados, “B” Promastigotas e “C” Paramastigotas, encontradas nos hospedeiros invertebrados.	26
Figura 8 - Esquema do ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i> Com as respectivas formas conforme classificação de Lawyer et al., (1990).	27
Figura 9 - Desenho esquemático de um intestino de um flebotomíneo. Adaptado por Schlein, 1993 por Paulo pimenta, CPqRR , fiocruz-MG.	29
Figura 10 - Localização do município de Porto Nacional.	34
Figura 11 - Imagem do Google Earth identificando os pontos de coleta na área urbana de Porto Nacional	35
Figura 12 - Imagem do Google Earth identificando os pontos de coleta na área rural de Porto Nacional.....	35
Figura 13 - Imagem de um quintal de residência de um dos cães capturados mostrando acúmulo de entulhos.....	36
Figura 14 - Imagem de um quintal de residência de um dos cães capturados mostrando acúmulo de entulhos.....	36
Figura 15 - Imagem de uma avenida não pavimentada mostrando lixo com restos de alimentos, ao lado, uma residência não murada com entulhos, local de captura de cães pesquisados.	37
Figura 16 - Coleta de fragmentos do baço, durante necropsia.	38
Figura 17 - kit de extração da DNeasy Blood&Tissue (QIAGEN)	38
Figura 18 – Linfonodo da região escapular.	44

Figura 19 - Lesões tipo abrasões no cotovelo direito.....	44
Figura 20 - Lesões tipo ulcerações na região superior da coxa esquerda.	45
Figura 21 - Descamação furfurácea, alopecia generalizada e lesão paquidermante e dermatite generalizada.	45
Figura 22 - Fígado com características de infiltração gordurosa	46
Figura 23 - Baço com esplenomegalia.	46
Figura 24 - Conjuntivite e presença de secreção do trato respiratório indicativo de pneumonite.	47
Figura 25 - Onicogrífose.	47
Figura 26 - Gel de Agarose mostrando a amplificação de <i>L. Infantum chagasi</i>	48
Figura 27- Fotomicrografia de Imunomarcção de amastigotas em tecido esplênico de cães com Leishmaniose..	52
Figura 28 – Estimativa da frequência relativa (%) e intervalo de confiança (%) para os casos positivos de Leishmaniose Visceral Canina em Porto Nacional de 2010 a 2016.	54
Figura 29 - Estimativa da frequência relativa (%) e intervalo de confiança (%) para os casos positivos de Leishmaniose Visceral Humana em Porto Nacional de 2010 a 2016..	56
Figura 30 - Estimativa da frequência relativa (%) e intervalo de confiança (%) para os casos positivos de Leishmaniose Visceral Humana no Tocantins de 2010 a 2016.	57
Figura 31 - Gráfico comparativo do percentual de positividade de LVC e LVH no município de Porto Nacional no período de 2010 a 2016.	57

LISTA DE SIGLAS

BSA - albumina bovina
CCZ – Centro de Controle de Zoonoses
CR – Complement receptors
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTP's – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT – Ditioneitol
GP – Glicoproteína
IHQ – Imunohistoquímica
INCT – Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia
kDa – Kilodalton
LACEN – Laboratório Central
LPG – Lipofosfoglicano
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA – Leishmaniose Visceral Americana
LVC – Leishmaniose Visceral Canina
LVH – Leishmaniose Visceral Humana
M – Molar
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
mM – Milimolar
μl – Microlitros
μM – Micromolar
Pb – Pares de bases
PBS – Phosphate buffered saline
PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
Pmol – Picomol
PPG – Proteofosfoglicano
RNA – Ácido Ribonucleico
TMAC - Cloreto de tetrametilamonio
SINAN – Sistema de Informação de Agravos Notificaveis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. Leishmanioses	16
2.2. Agentes etiológicos da <i>Leishmania spp</i>	21
2.3. Vetores e reservatórios	23
2.4. Morfologia da <i>Leishmania</i> e o ciclo biológico	25
2.4.1. Ciclo da <i>Leishmania</i> nos invertebrados	27
2.4.2. Ciclo da <i>Leishmania</i> nos hospedeiros vertebrados	29
2.5. Epidemiologia da Leishmaniose	30
3. OBJETIVO	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Caracterização da área de estudo	34
4.2. Número amostral de cães e pontos de coletas	34
4.3. Anamnese e coleta das amostras	37
4.4. Processamento das amostras e extração de DNA	38
4.5. Realização dos testes de PCR	39
4.6. Eletroforese em Gel de Agarose	40
4.7. Teste de Imunohistoquímico dos fragmentos obtidos	40
4.8. Coleta de dados epidemiológicos e testes estatísticos	41
5. RESULTADOS	43
5.1. Sintomatologia dos cães	43
5.2. Resultados das amplificações por PCR dos fragmentos obtidos	48
5.3. Resultados do Imunohistoquímico - IHQ das amostras de fígado e baço	52
5.4. Comparativos de PCR com a reação de IHQ	53
5.5. Número de casos de leishmaniose visceral canina em Porto Nacional no período de 2010 a 2016	53
5.6. Número de casos de Leishmaniose Visceral Humana em Porto Nacional de 2010 a 2016	55
5.7. Número de casos de Leishmaniose Visceral Humana no Tocantins no período de 2010 a 2016	56

5.8	Resultados do comparativo do percentual de positividade de LVC e LVH no Município de Porto Nacional no período de 2010 a 2016.....	57
6.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	58
6.1.	Discussão dos resultados de sintomatologia dos cães.....	58
6.2.	Discussão dos resultados da PCR diagnóstica dos fragmentos	59
6.3.	Discussão dos resultados da Imunohistoquímica dos fragmentos de fígado e baço.	61
6.4.	Discussão dos resultados comparativos de PCR com a reação de IHQ ..	62
6.5	Discussão do número de casos de leishmaniose visceral canina em Porto Nacional no período de 2010 a 2016.....	63
6.6	Discussão da proporção do intervalo de confiança do percentual de positividade de Leishmaniose Visceral Humana em Porto Nacional e no Tocantins de 2010 a 2016	65
7.	CONCLUSÃO.....	68
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças que se apresentam sob várias formas clínicas, desde aquelas que afetam os tegumentos e mucosas, podendo apresentar lesões destrutivas nas mucosas, chamadas de Tegumentar Americana, até a mais grave, a visceral, que afeta as células do sistema mononuclear fagocitário, fígado, baço e medula óssea.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas de vários tipos geralmente manifestando-se como úlceras crônicas bem como a mucocutânea que afeta pele e mucosas, causadas pelas espécies: *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainson*, *L. shawi* e *L. naiffi*. Os agentes transmissores desses parasitos no Brasil são insetos flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*; *L. flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e o *L. migonei*.

A visceral, conhecida popularmente como calazar, é uma doença crônica grave, que acomete principalmente crianças. É potencialmente fatal para o homem, com uma letalidade que pode alcançar 10%, quando não adequadamente tratada. É causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania infantum*, sendo que no Brasil o agente etiológico é a *Leishmania infantum chagasi* (GONTIJO e MELO, 2004)

A transmissão acontece durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, que tem demonstrado grande capacidade de se adaptar em vários ambientes, aumentando muito a densidade destes insetos dentro e ao redor de habitações humanas, facilitando a transmissão. Nas regiões norte e nordeste, a *Lutzomyia longipalpis* era encontrada nas matas, fazendo parte do ciclo primário de transmissão da doença. Progressivamente, houve adaptação desse inseto para o ambiente rural e a sua adaptação a esse ambiente foi somada à presença de animais silvestres sinantrópicos.

A contínua invasão das áreas de matas, seja por atividades relacionadas à agricultura, caça de animais, exploração de minerais ou para abertura de novas estradas, vem fazendo com que o homem se insira no ciclo silvestre, estabelecendo-se um novo cenário epidemiológico, onde a doença vem se disseminando também em áreas urbanas, principalmente devido à destruição constante de habitats naturais dos vetores e reservatórios (COSTA, et al., 2007).

Esses vetores multiplicam-se em matéria orgânica em decomposição, lixo e entulhos em lotes baldios. Esta característica é um dos principais fatores que implicam em sua presença nos centros urbanos. Além disso, o cão é considerado como o principal reservatório em ambientes urbanos, sendo que o papel desse animal foi comprovado pela primeira vez por Nicole em 1908 na Tunísia.

Até o momento, o controle da LV está associado a eliminação de reservatório (cães) infectado, porém isso requer métodos de diagnósticos confiáveis.

Em áreas endêmicas de Leishmaniose visceral e tegumentar como as áreas avaliadas no presente estudo, o uso de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia de Polimerase – PCR/ tem se demonstrado como uma opção para a diferenciação do parasita, principalmente entre as espécies de *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania chagasi* que são simpátricas entre si. Em associação, a técnica Imunohistoquímica é uma variação dos métodos parasitológicos que se baseia na detecção de parasitos marcados com anticorpos monoclonais e policlonais em secções de tecidos, fornecendo resultados consistentes.

Portanto, essas ferramentas são de grande importância para o conhecimento da epidemiologia e controle dessa doença. Junto a isso, a classificação correta das espécies de *Leishmania* é de grande importância para vigilância epidemiológica por permitir traçar o perfil epidemiológico das espécies de *Leishmania* presentes em humanos e animais.

Porto Nacional foi umas das cidades impactadas pela construção da Usina Hidrelétrica do Lajeado – UHE Lajeado, concentrando 95 casos novos confirmados de Leishmaniose Visceral nos últimos sete anos, colocando – a em terceiro em casos confirmados dentre os 139 municípios do Estado, seguido por Palmas com 204 casos e Araguaína com 695 casos, ressaltando que esses dois últimos municípios apresentam maior população. Porto Nacional carece de estudos

da distribuição dessas espécies de *Leishmania* isoladas de cães, principal reservatório animal urbano. Assim sendo, esse trabalho se justifica plenamente não apenas pelo estudo do perfil de espécies circulantes em cães, mas também pela identificação das espécies da *Leishmania*, por meio da Reação em Cadeia de Polimerase – PCR, e a comparação dos resultados obtidos dessa técnica com o ensaio Imunohistoquímico e a integração desses estudos com as variações e distribuição de casos no Tocantins pelos dados epidemiológicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leishmanioses

A Leishmaniose é uma infecção Zoonótica que afeta animais silvestres, animais domésticos e o homem. Os animais selvagens representam os verdadeiros reservatórios, enquanto o homem é considerado um hospedeiro acidental (FOGANHOLI e ZAAPA, 2011). É uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas para os hospedeiros mamíferos por flebotomíneos infectados (LANGONI, et al., 2015).

Dependendo da espécie e cepa do parasita e da imunidade do hospedeiro, os parasitas podem provocar uma reação inflamatória que conduz a eritema ou evolui para uma úlcera aberta (leishmaniose cutânea localizada), ou uma visceralização para nódulos linfáticos, baço e fígado (Leishmaniose Visceral). Essas variedades de manifestações clínicas observadas em pacientes com leishmaniose, estão baseadas na complexidade da epizootiologia da *Leishmania*, as quais são causadas por mais de doze espécies de *Leishmania* e numerosas espécies de flebotomíneos e mamíferos incriminados como vetores e hospedeiros reservatórios respectivamente (REITHINGER e DUJARDIN, 2007).

As primeiras referências a possível existência de Leishmaniose Visceral na América do Sul, são de Carlos Chagas em 1911 a 1912, quando percorria o vale do Rio Amazonas e seus principais afluentes, encontrando pacientes com esplenomegalia sem causa definida suspeitando dessa doença. No ano seguinte a LV teve sua primeira descrição nas Américas, quando Migone identificou o parasita durante a realização de autópsias de um indivíduo do município de Boa Esperança, atual Estado do Mato Grosso do Sul (MARCONDES e ROSSI, 2013).

O período de incubação da LV varia de oito meses a dois anos, sendo o início da doença insidioso; com perda de apetite; palidez; aparecimento de febre alta que é o sintoma mais notável; aumento do volume do baço; anemia e hemorragia da gengiva e digestiva. No que refere a alteração do apetite, isso pode

levar um caso de desnutrição grave e a evolução da doença pode ser rápida, levando à morte em algumas semanas. Além disso, deixa o organismo susceptível a diversas infecções bacterianas (PEREIRA, I.O.;SACRAMENTO, L.V.S.; MARQUES, M. J., 2011). A presença de complicações, como infecções bacterianas, principalmente por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, contribuem para o aumento da letalidade por este agravo (OLIVEIRA, et al., 2010)

A presença de leishmania no interior de células do Sistema Fagocítico Mononuclear, leva a uma hipertrofia e hiperplasia do sistema macrofágico das vísceras que é a razão da hepatoesplenomegalia conforme figura 1, bem como das alterações da medula óssea. Em virtude dessas alterações, sobrevém a anemia, leucopenia e plaquetopenia (REY., 2014)

Figura 1 - Criança com quadro de emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa, hepatoesplenomegalia. **Fonte: Manual do Ministério da Saúde, 2010**

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), parece ser uma doença antiga, que afligia humanos em áreas tropicais e subtropicais do novo mundo, como sugerido em antigas peças de cerâmica originadas do Peru e Equador. Essas peças retratavam rostos humanos com deformações graves bastantes similares as causadas pela Leishmaniose mucocutânea. Além disso, historiadores da época da colonização ibérica relatavam com frequência ocorrência de lesões cutâneas nos habitantes nativos (LAINSON, 2010).

No Brasil, a LTA possui uma diversidade de agentes, de reservatório e de vetores em diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que torna difícil o controle (BRASIL, 2010).

Atualmente são conhecidas várias espécies de *Leishmania* que causam a Leishmaniose Tegumentar, sendo as mais comuns no Brasil a *Leishmania guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. lainson* e *L. amazonensis* (NEVES, 2011).

O período de incubação varia de uns dias a mais de um ano, mas geralmente dura em torno de 2 a 3 semanas. As lesões iniciais, no ponto de inoculação, costumam ser do tipo pápulo-vesiculoso, algumas vezes acompanhadas de linfagite e inflamação dos gânglios regionais. Essa pápula termina por ulcerar-se e exibir aqueles caracteres típicos da lesão leishmaniótica: úlcera crônica, indolor de contornos regulares com bordas salientes, pouco exsudato e com fundo granuloso (figura 2) (REY., 2014).

Figura 2 – Lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas. **Fonte: Manual do Ministério da Saúde, 2010**

A manifestação clínica da LTA, depende da espécie do parasita e da resposta imunitária do paciente podendo ficar restringida ao local da inoculação ou alcançar novos sítios, como mucosas do nariz, laringe e orofaringe (FILHO, 2006).

A forma cutânea localizada; é caracterizada pelo acometimento primário da pele, com tendências a cura espontânea e boa resposta ao tratamento. A forma Cutânea Disseminada; caracteriza-se por múltiplas lesões papulares, que acometem vários segmentos corporais, com frequência na face e tronco (figura 3). A forma Cutâneo Difusa; evolui de forma lenta e com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrendo grandes extensões cutâneas e com má

resposta ao tratamento (figura 4). Por sua vez, a forma Mucosa ou Mucocutânea; se expressa por lesões destrutivas localizada nas mucosas das vias aéreas superiores, sendo essa forma secundária à lesão cutânea, ocorrendo geralmente por disseminação hematogênica ou linfática (figura 5) (BRASIL, 2010).

Figura 3 – Forma cutâneo disseminada com acometimento facial. Fonte: Manual do Ministério da Saúde 2010)

Figura 4 - Forma cutâneo difusa, com acometimento da face, orelha e membros superiores. Fonte: Manual do Ministério da Saúde 2010

Figura 5 - forma mucosa tardia com lesão ulcerada do palato mole. **Fonte: Manual do Ministério da Saúde 2010.**

MARZOCHI e MARZOCHI, (1997), propuseram uma classificação clínica da LTA, levando em consideração as formas de resposta do hospedeiro, a partir do local da picada do vetor e a localização das lesões e a evolução clínica conforme o esquema a baixo (BRASIL, 2006).

2.2. Agentes etiológicos da *Leishmania* spp

A classificação da *Leishmania* era baseada inicialmente em critérios etiológicos, tais como as espécies do vetor, distribuição geográfica, tropismo, propriedades antigênicas, e manifestações clínicas. Isso era devido à impossibilidade de distinção morfofisiológica entre as diferentes espécies. Entretanto, análises bioquímicas e moleculares demonstraram que os critérios patológicos e geográficos eram inadequados e que outros deveriam ser levados em consideração, tais como os padrões do polimorfismo do DNA do cinetoplasto (LIU, 2013).

Mais de trinta espécies de *Leishmania* foram reconhecidas, das quais vinte são consideradas infectivas para humanos e animais. A importância de distinção entre as espécies de *Leishmania* é fundamental para a diferenciação das várias formas das doenças (visceral, cutânea e mucocutânea) pelo menos em seres humanos, a fim de estabelecer o diagnóstico correto e o prognóstico da doença, bem como apoiar tomada de decisões sobre os protocolos de tratamento adequado (TSOKANA, et al., 2014).

Até a década de 60 todas as formas de leishmanioses cutâneas ocorridas no Brasil foram atribuídas a *L. braziliensis*. No entanto, estudos epidemiológicos realizados pelo Instituto Evandro Chagas, indicaram outras espécies de *Leishmania* infectando o homem e uma variedade de mamíferos selvagens e flebotomíneos na região amazônica (LAINSON, et al., 1994).

Atualmente, na região Amazônica do Brasil, existem sete espécies de *Leishmania* spp. bem conhecidas associadas como agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: *Leishmania* (V.) *braziliensis* Vianna 1911, *Leishmania* (V.) *guyanensis* Floch, 1954, *L. (L.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972, *L. (V.) laisoni*, Silveira et al., 1987, *L. (V.) Shawi*, Lainson et al., 1989, *L. (V.) Naiffi*, Lainson & Shaw, 1989, *L. (V.) lindenberg* Silveira et al., 2002. (JENNINGS, et al., 2014)

MARZOCHI e MARZOCHI, (1997), levando em consideração a distribuição epidemiológica e geográfica de algumas espécies em diferentes ecossistemas, sugeriram que a doença humana surgiu na Amazônia ocidental, em

particular no sul do rio Amazonas, onde a espécie de *Leishmania* predominante é a *L. (V.) braziliensis* (GUERRA, et al., 2011).

O agente etiológico da Leishmaniose visceral (LV) exibe perfil de distribuição geográfica diferente, sendo que no Brasil a *L. infantum chagasi* é considerada o agente etiológico da LV, sendo derivado de linhagens europeias (KUHLS, et al., 2011).

A *Leishmania chagasi* foi descrita por Cunha & Chagas em 1937 após não conseguirem infectar animais de laboratório, que eram facilmente infectados por *L. donovani* e *L. Infantum*, agentes da leishmaniose Visceral do velho mundo, com os parasitas extraídos de casos de Leishmanioses Viscerais no Brasil (LAINSON, 2010).

Entretanto, desde que Cunha & Chagas (1937), descreveram que *L. chagasi* era considerada uma nova espécie responsável pela doença nas américas, a nomenclatura e particularmente, a origem do agente causador da leishmaniose visceral nestas áreas tem sido objeto de muito debate e especulações. A controvérsia inicia um ano depois quando Cunha (1938), conclui que o agente etiológico da Leishmaniose Visceral nas Américas é idêntico a *Leishmania infantum* (DANTAS-TORRES, 2006)

Existem duas vertentes para a origem da *Leishmania infantum* no novo mundo. A primeira, (Killick- Kendrick 1985, Rioux, 1990) a mais aceita, considera *L. Infantum* como sendo importada da Europa durante a colonização pelos Espanhóis e Portugueses, transportada por cães e ratos. A segunda, (Lainson & Rangel 1995), tem por hipótese que o parasito teria estado presente nas américas antes da colonização europeia, sendo assim autóctone da região (KUHLS, et al., 2011).

Por muito tempo, *L. chagasi* tem sido considerada como um agente autóctone no novo mundo, porém, após estudos genotípicos comparativos entre *L. chagasi* e *L. Infantum* mostrarem que ambas as espécies apresentam perfis genéticos similares, essas foram considerados como mesma espécie, assumindo que esses parasitas foram introduzidos na América do Sul durante a colonização europeia através de cães infectados com *L. infantum*, adaptando-se a novos vetores e hospedeiros (LAINSON e RANGEL, 2005).

2.3. Vetores e reservatórios

A história da leishmaniose visceral no Brasil foi inicialmente associada com o ambiente rural, com bases, principalmente, na cidade de Sobral - CE, onde uma série de epidemias causou dezenas de mortes. Na época, os cães e o vetor eram os elos da cadeia epidemiológica no ambiente doméstico. O flebótomo *Lutzomya longipalpis* foi identificado como o vetor, baseado em evidências consistentes, a partir de vários estudos relativos à competência vetorial deste flebotomíneo. (RANGEL e VILELA, 2008).

O nome popular do flebótomo (*sandfly*) refere-se em inglês, a um inseto de cor pálida, piloso, (figura 6), no entanto essa denominação ainda é confusa em decorrência que em certas partes do mundo outros gêneros de insetos como *Culicoides* (díptera: ceratopogonidae e simuliidae) sejam referidos pelo mesmo nome. A distinção deve ser feita entre os vetores das leishmanioses e outras doenças de interesse de saúde pública, que são corretamente denominados de flebotomínios (MAROLI, M.; FELICIANGELI, M.D.; BICHAUD, L., et al., 2013).

Figura 6 - Flebotomíneo. Fonte: Medical and Veterinary Entomology, 2013.

Os flebotomíneos (díptera: Psycodidae: Phlebotominae), são considerados importantes para a saúde pública em todo mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. As espécies de *Phlebotomus* encontradas no velho mundo, e as do gênero *Lutzomya*, nas Américas, são considerados vetores de inúmeros patógenos de vertebrados inclusive *Leishmania spp.* zoonótica ou antroponótica, a qual afeta as populações de aproximadamente 90 países, sendo

considerada uma das seis doenças tropicais mais importantes em todo mundo (DESJEUX, 2004).

A ocupação desordenada de áreas nas últimas décadas tem favorecido a proliferação de riscos de infecção por *Leishmania*. Consequentemente, espécies de flebotomíneos que já se adaptaram a ambientes domésticos e peridomicílio, podem transmitir o parasita para animais domésticos, que servem como reservatórios (AGUIAR, G.M.; AZEVEDO, A.C.R.; MEDEIROS, W.M., et al., 2014).

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e, *L. migonei*. Vale ressaltar que essas espécies foram definidas como vetores por seguirem os critérios sugeridos por Killick-Kendrick e Ward (1981) e Killick-Kendrick (1990), (BRASIL, 2010).

Para as espécies vetoras da Leishmaniose Visceral, destacam-se duas, relacionadas com a transmissão da doença no Brasil, o *Lutzomyia longipalpis* e o *L. cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* e recentemente, *L. cruzi* foi incriminada como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2014).

Além dessas duas espécies, outras espécies de flebotomíneos são consideradas potenciais transmissores da doença. No Pará, *L. antunesi* (Coutinho, 1939) pode ser um vetor alternativo da LVA. O *L. forattinii* (Galati, Rego, Nunes & Teruya, 1985); considerada simpátrica da *L. cruzi* em Mato Grosso do Sul, na região de Corumbá e Ladário, também tem sido considerada como transmissora da LVA (OLIVEIRA, et al., 2010).

Outra espécie da fauna flebotomínea encontrada na Serra da Bodoquena, que merece atenção é a *L. almerioi*, Galati & Nunes, 1999, por ter sido encontrada em alta densidade populacional e apresentar infecção natural por *Leishmania chagasi* (NUNES, et al., 2008).

Os hospedeiros vertebrados naturais da leishmaniose são mamíferos da ordem Edentata: (tatus e preguiça), Carnívora, (cachorros e gatos), Hyracoide (hírace), Roedores (ratos), Primatas (homens e macacos), Marsupiais (Gambás) e Perissodactyla (cavalos). Porém os hospedeiros primários da Leishmaniose são os mamíferos silvestres, como os roedores silvestres e canídeos selvagens. No entanto, com o aumento do processo de domiciliação do ciclo Zoonótico da

transmissão da Leishmaniose, os animais domésticos têm assumido um papel importante como reservatório da infecção (DANTAS-TORRES, 2007).

Diversos mamíferos podem se infectar por *Leishmania spp*, no entanto, esses não são usualmente responsáveis pela transmissão ao homem. No Brasil, dos canídeos silvestres, somente a raposa (*Cerdocyon thous*) é considerado reservatório natural da Leishmaniose Visceral, entretanto, diversas espécies já foram relatadas com infecção, como o lobo guará (*Chisocyon brachyurus*), raposa do campo (*Lycalopex vetulus*) e cachorro vinagre (*Spheatos venaticus*) são incriminadas como reservatórios (SOUZA, et al., 2010).

CARVALHO, et al., (2015), relatam infecções em glândulas adrenais de lobo guará por *Leishmania infantum*. No exame histopatológico foram visualizados infiltrados com macrófagos contendo numeroso protozoários arredondados com núcleo basofílico com cinetoplasto distinto, compatível com amastigotas de *Leishmania sp*. O Xenodiagnóstico resultou na detecção em duas das dez fêmeas engorgitadas que continham sequências de DNA de *L. infantum*, portanto sendo considerado positivo.

No ambiente urbano, o cão desempenha um importante papel como reservatório natural da *Leishmania spp*, principalmente em decorrência das altas taxas de infecções e pela persistência do parasita particularmente na pele, com ou sem manifestação clínica da doença (CRUZ-CHAN, et al., 2014).

O primeiro diagnóstico de um cão infectado naturalmente por espécies do gênero *Leishmania*, com leishmaniose tegumentar no Brasil, foi realizado por Pedroso em 1913. Estudos mais recentes tem mostrado ser relativamente comum a presença de cães infectados por *Leishmania braziliensis* em diferentes focos de Leishmaniose Tegumentar Americana (JÚNIOR, et al., 2010).

Entretanto, HOFFMAN, et al., (2012), relataram um caso de cão infectado por *Leishmania amazonensis*, com sinais de doença generalizados, predominando o quadro visceral, na região norte do Estado do Paraná, Brasil.

2.4. Morfologia da Leishmania e o ciclo biológico

O protozário da *Leishmania* apresenta um ciclo heteroxênico, no qual existe uma forma extracelular promastigota, fusiforme, com núcleo central e flagelo

livre emergindo de uma bolsa flagelar, em uma pequena invaginação na região anterior do parasito, sendo encontrada no tubo digestivo de insetos. As formas amastigotas são intracelulares obrigatórios, com um corpo celular pequeno, ovalada e sem motilidade. O pequeno flagelo presente é internalizado e mantido na bolsa flagelar, visível a microscópio eletrônico de transmissão. Essas, são encontradas nos fagolisossomos dos macrófagos do hospedeiro vertebrado, conforme Figura 7. (PEREIRA, I.O.; SACRAMENTO, L.V.S.; MARQUES, M.J., 2011). Entretanto, a classificação mais simples e aceita universalmente foi proposta por LAWYER et al., (1990), que independente das espécies de *Leishmania* dentro do vetor, apresentam as seguintes formas: Promastigotas procíclicas, promastigotas nectomonas, promastigotas paramastigotas, promastigotas haptomonas e promastigotas metacíclicas, conforme figura 8. Essas formas apresentam adaptações as mudanças nas condições ambientais sofridas pelos parasitas dentro dos hospedeiros mamíferos e flebotomíneos. (PIMENTA, P.F.P.; FREITAS, V.C.; NÁGILA, F.C.S., 2012).

Figura 7 - formas ilustrativas de *Leishmania* "A" amastigotas, encontradas nos hospedeiros vertebrados, "B" Promastigotas e "C" Paramastigotas, encontradas nos hospedeiros invertebrados. Disponível em neves, 2011

Figura 8 - Esquema do ciclo de vida de *Leishmania* sp. Com as respectivas formas conforme classificação de Lawyer et al., (1990). **Fonte: Pimenta, INCT, 2012.**

2.4.1. Ciclo da *Leishmania* nos invertebrados

O ciclo nos hospedeiros invertebrados inicia-se quando um inseto vetor, sempre um flebotomíneo, faz seu repasto sanguíneo em um indivíduo ou animal infectado, no qual, utiliza-se de peças bucais, relativamente curtas e rígidas, para dilacerar os tecidos e vasos sanguíneos dos hospedeiros, formando um pequeno poço de sangue, onde se alimenta, processo este denominado de Telmatofagia ou “Pool-feeding”. (RIBEIRO, 1987).

Com isso, acaba aspirando macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue, linfa ou até mesmo nos tecidos. O alimento no intestino médio do inseto é rapidamente envolvido por uma membrana quitinosa, secretada pelas células epiteliais do intestino, a matriz peritrófica. (NEVES, 2011)

Esses parasitas, apresentam diferentes estágios de desenvolvimento e devem sobreviver a ação proteolítica no intestino médio do vetor, escapar da membrana peritrófica, prevenir a eliminação com o sangue digerido pela inibição do peristaltismo, aderir ao intestino médio (*Leishmania*) ou intestino posterior (*Viannia*, algumas *sauroleishmania*), antes de ser transmitido pelo repasto sanguíneo. Para tanto, sugere-se que o proteofosfoglicano (PPGs) do parasita previne a digestão pelas enzimas e o lipofosfoglicano (LPGs) em conjunto com a galectina do vetor, medeia a ligação com o intestino médio. (READY, 2013)

No intestino médio anterior, o parasita secreta um Gel, Gel Secretor de Promastigota (PSG), contendo filamentos de Proteofosfoglicano, que facilita a interação com os tecidos dos mamíferos. Acredita-se que as promastigotas metacíclicas de *L. mexicana* são regurgitadas a partir do intestino médio acompanhado do gel do parasito (ROGERS, 2007).

As primeiras evidências sobre a interação dos flebotomíneos com os hospedeiros, provem de Roger e Bates, 2007, que concluíram que os parasitas manipulavam o tempo de ingestão de sangue, para garantir um número máximo de promastigota metacíclicas infectivas no PSG, fazendo com que haja um bloqueio suave durante a ingestão aumentando a persistência do repasto e a alimentação em múltiplos hospedeiros, com posterior regurgitação (READY, 2013).

As observações do modo de desenvolvimento das espécies de *Leishmania* em seus vetores flebotomíneos foram particularmente importantes, pois levaram a classificação dos parasitos em três grupos distintos: Hypopylaria, Peripylaria e Suprapylaria conforme (figura 9). Os parasitas pertencentes ao grupo Hypopylaria foram consideradas as espécies mais primitivas, e seu desenvolvimento é restrito a porção posterior ao piloro, íleo e reto dos flebotomíneos. Peripylaria; as espécies de *Leishmania* presente nesse grupo se desenvolvem no intestino posterior do flebotomíneo, também migrando para o intestino anterior. Lainson e Shaw denominaram esse complexo de *L. Braziliensis* do novo mundo, sendo que todos esses infectam seres humanos (LAINSON, 2010).

O grupo Suprapilarya, apresenta desenvolvimento restrito a porção do trato digestivo anterior ao piloro, sobretudo nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio. Semelhante ao comportamento peripilárico, os parasitos migram para as porções mais anteriores onde podem ser transmitidos aos hospedeiros vertebrados. Esses parasitas pertencem ao subgênero *Leishmania* incluindo a espécie de *L. chagasi* (PIMENTA, P.F.P.; FREITAS,V.C.; e NÁGILA, F.C.S., 2012).

Figura 9 - Desenho esquemático de um intestino de um flebotômíneo. Adaptado por Schlein, 1993 por Paulo pimenta, CPqRR, Fiocruz-MG. **Fonte: INCT 2012.**

2.4.2. Ciclo da *Leishmania* nos hospedeiros vertebrados

A entrada das promastigotas nas células dos hospedeiros é mediada por receptores, processo esse que desencadeia a fagocitose. O número de moléculas de superfícies dos parasitos e dos macrófagos tem sido implicado na interação entre a *Leishmania* e o macrófago. No caso das promastigotas os receptores do complemento (CR1), (CR3) Mac-1, receptores de fibronectina e receptores de frutose e manose (MR) presente na superfície dos macrófagos desempenham um papel importante de ligação e fixação nos macrófagos (LIU e UZONNA, 2012).

Além disso, a glicoproteína de 63kDa (Gp 63) é uma das principais moléculas de superfície presente em todas as espécies de *Leishmania*, especialmente em promastigotas, interagindo com os receptores nos macrófagos (WALKER, et al., 2014).

Nos hospedeiros vertebrados, os parasitos são fagocitados por macrófagos e células dendríticas da derme. Após a fagocitose e internalização das promastigotas dentro dos fagossomos, as formas de *leishmania* conseguem sobreviver aos fagolisossomos. Durante esse processo, as promastigotas transformam-se em amastigotas dentro de 12 e 24 horas e continuam crescendo e se dividindo nos compartimentos dos fagolisossomos (ASSCHE et al., 2011).

Entretanto, acredita-se que muitos neutrófilos sejam recrutados para o local da infecção e que essas células sejam mais eficientes na fagocitose. Essas células são chamadas de fagócitos de curta duração em decorrência de servirem

como células intermediárias, propondo que elas atuem como “cavalos de Tróia” usados pelos parasitos como um trajeto silencioso de entrar nos macrófagos evitando a ativação celular (LIU e UZONNA, 2012).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o local infectado, onde eles liberam mediadores antimicrobianos, promovem a fagocitose dos microrganismos, e matam os agentes infecciosos por uma ação oxidativa e liberação de mediadores tóxicos no vacúolo parasitóforo (MENEZES, J.P.; SARAIVA, E.M.; ROCHA-AZEVEDO, B., 2016). A sobrevivência das Leishmanias dentro do ambiente hostil dos macrófagos, envolve várias estratégias de neutralização do poder microbicida dos macrófagos e bem como da resposta imune efetiva (PODINOVSKAIA e DESCOTEAUX, 2015).

O Lipofosfoglicano de superfície (LPG), o GP63 e o proteofosfoglicano (PPG) de promastigota de *L. major* são importantes determinantes na inibição fagocitária e subsequente sobrevivência intracelular dos parasitas (LIU e UZONNA, 2012).

2.5. Epidemiologia da Leishmaniose

O primeiro caso de Leishmaniose visceral no Brasil data do ano de 1913, no município de Boa Esperança - MT, sendo que posteriormente em 1934, mais casos da doença foram relatados, baseados em análise visceral de *post-mortem* em 41 pacientes do nordeste suspeitos de febre amarela (MAIA-ELKHOURY, et al., 2008)

A LVA apresenta comportamento epidemiológico cíclico, com elevação de casos com períodos médios a cada cinco anos. Atualmente, essa endemia atinge 20 estados brasileiros, com média anual de 3095 casos no período de 1996 a 2005 e incidência de 2,1 casos por 100.000 habitantes (ALVES, 2009). Estima-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas de riscos para Leishmaniose, tendo sido diagnosticada em 88 países, dos quais 82 estão em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Até a década de 1990 o Nordeste correspondeu a 90 % dos casos de LVA do País, porém a doença vem se expandindo para as regiões centro-oeste, sudeste e norte modificando esta situação (ALVES, 2009).

Em 2007, os municípios que apresentaram os maiores números de casos foram respectivamente: Araguaína (TO) com 251 casos (8,7%); Fortaleza (CE) com 180 casos (6,2%), Campo Grande (MS) com 97 casos (3,3%) e Teresina (PI) com 75 casos (2,6%) (MAIA-ELKHOURY, et al., 2008).

Inicialmente, a LVA foi caracterizada como uma doença eminentemente rural, porém nos últimos anos vem se expandindo para áreas urbanas de município de médio e grande Porte. Nos últimos 10 anos revelam a urbanização e a Peri urbanização da Leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (BH), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Terezinha (PI), Natal (RN), São Luiz (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as endemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2010)

A expansão da LVA está associada a urbanização da doença e do vetor, as mudanças socioambientais e as dificuldades de controle em grandes centros urbanos onde o problema de desnutrição, moradia e saneamento básico estão presentes. Além disso, a imigração de cães e humanos de áreas endêmicas contribui para sua expansão por introduzir o parasito em novos ambientes (CARDIM, et al., 2013).

A relação entre os componentes da cadeia de transmissão no cenário urbano parece ser mais complexa e variada do que no rural. Nas últimas décadas ocorreram profundas mudanças na estrutura agrária do Brasil, que resultaram na migração de um grande contingente populacional para centros urbanos, criando condições favoráveis para emergência e ré emergências de doenças, entres elas o calazar (GONTIJO e MELO, 2004).

A vigilância epidemiológica é um dos componentes do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), cujo objetivo é reduzir as taxas de letalidade e grau de morbidade através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, bem como diminuir os riscos de transmissão. Atualmente, existe uma classificação baseada na estratificação de áreas de transmissão para LV, sendo que essa foi realizada a partir da seleção de todos os municípios que apresentaram casos de LV enviadas pelas Secretaria de Estado da Saúde do período de 1998 a 2002. Além disso, o novo enfoque do programa de Leishmaniose Visceral é o de

incorporar os estados e municípios, ou seja, sem transmissão de LVH e LVC.
(BRASIL, 2014).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de infecção de cães com as espécies de *Leishmania Infantum chagasi*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* por meio de Reação em Cadeia de Polimerase – PCR, no Município de Porto Nacional – Tocantins.

3.2. Objetivos específicos

Identificar dentre essas espécies a que mais se apresenta em infecções caninas com sorologia positiva;

Verificar os sinais e sintomas mais proeminentes nos cães;

Comparar as reações positiva de PCR com as reações de Imunohistoquímica nos tecidos analisados;

Avaliar os dados epidemiológicos de Leishmaniose humana e canina em Porto Nacional e cruzar essas informações com as espécies de *Leishmania* isoladas dos cães.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Caracterização da área de estudo

Porto Nacional localiza-se aproximadamente a 60 km da capital Palmas, com latitude 10° 42' 28" sul e longitude 48° 25'01" oeste (Figura 10). Possui um clima tropical e a sua vegetação predominante é o cerrado. A área total de Porto Nacional é de 4.449,892 km² e possui além da sede o distrito de Luzimangues, sendo que esse faz divisa com Palmas apenas pelo lago da Usina Luiz Eduardo Magalhães.

Figura 10 - Localização do município de Porto Nacional. **Fonte: Google imagens 2015**

4.2. Número amostral de cães e pontos de coletas

Foram aceitos pelo Comitê de Ética Animal – CEUA do ITPAC-Porto Nacional, conforme protocolo 005/2015 de 24 de Julho de 2015, em anexo, o número amostral de 30 cães soro positivos pelo teste Elisa para Leishmaniose com laudo do Laboratório Central do Tocantins. Todos esses cães foram capturados por demanda populacional e inquéritos sorológicos, conforme os pontos de coletas (Figura 11, 12, 13, 14 e 15)

Figura 11 - Imagem do Google Earth identificando os pontos de coleta na área urbana de Porto Nacional

Figura 12 - Imagem do Google Earth identificando os pontos de coleta na área rural de Porto Nacional

Figura 13 - Imagem de um quintal de residência de um dos cães capturados mostrando acumulo de entulhos.
Foto: Autor da tese

Figura 14 - Imagem de um quintal de residência de um dos cães capturados mostrando acumulo de entulhos.
Foto: Autor da tese

Figura 15 - Imagem de uma avenida não pavimentada mostrando lixo com restos de alimentos, ao lado, uma residência não murada com entulhos, local de captura de cães pesquisados. **Foto: Autor da tese**

4.3. Anamnese e coleta das amostras

Todos os cães passaram por uma avaliação qualitativa e quantitativa das manifestações clínicas. Alterações cutâneas, oculares e palpebrais, cor das mucosas, onicogribose, presença de secreções anormais, perda de peso, apatia, modificações no tamanho dos linfonodos, baço e fígado, foram os sinais e sintomas avaliados. Para a verificação das alterações do fígado e baço, efetuou-se pesagem e comparação com o peso dos animais, sendo que aqueles que pesaram acima de 3% do peso do animal, foram considerados aumentados de tamanho, no que se refere as alterações dos linfonodos, considerou-se linfonodos normais os que obtiveram tamanhos entre 0,1 a 2 cm, conforme (DYCE, 2010).

A eutanásia dos cães foi realizada seguindo as orientações do Conselho Federal de Medicina Veterinária e órgãos de proteção dos animais, onde, foi feita em plano anestésico profundo com perfusão de Cloreto de Potássio - KCL a 19,1. Utilizou-se como fármacos anestésicos, 0,1 mL/Kg, via intramuscular ou intravenosa de Quetamina a 10%, associado a um relaxante muscular, 0,08 mL/Kg via intramuscular de Xilasina. Após a constatação do óbito, obtiveram-se as

amostras por laparotomia, sendo retirado o fígado, baço e linfonodo para pesagem e posterior coleta dos fragmentos, conforme figura 16.

Figura 16 - Coleta de fragmentos do baço, durante necropsia. **Foto: Autor da tese**

4.4. Processamento das amostras e extração de DNA

Após as coletas, os fragmentos dos tecidos foram processados seguindo a metodologia de kit de extração da DNeasy Blood&Tissue (QIAGEN) conforme figura 17 e em seguida quantificado no nanodrop.

Figura 17 - kit de extração da DNeasy Blood&Tissue (QIAGEN) **Foto: Autor da tese**

4.5. Realização dos testes de PCR

Para o teste da PCR foi utilizado o sistema da Gotaq® Green Master Mix da PROMEGA seguindo as orientações do fabricante. Cada 12,5 µL do mix contém uma unidade de taq DNA polimerase em tampão (pH 8,5), 400µM dNTP's e 3 mM MgCl₂. Para as reações de PCR de *L. infantum chagasi* foram utilizados os Primers RV1 5' – CTT TTC TGG TCC CGG GGG TAG G - 3' RV2 5' – CCA CCT GGC CTA TTT TAC ACC A – 3' da região do mini círculo de k DNA do grupo da *L. donovani*, sendo que estes foram desenhados e adaptados por LE FICHOUX, et al.,(1999) e geram um amplicon de 145 pb. Em cada reação foram utilizados 80 – 150 ng de DNA, 10 pmol de cada primer 12,5µL de “GoTaq master mix”, e H₂O ultrapura para um volume final de 25µL. A reação foi feita seguindo o seguinte protocolo: 1 ciclo de 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 58°C por 40 segundos, 72°C por 40 segundos, finalizando com um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min e 4°C por 5 minutos (BIGELI, J.G; JÚNIOR, W.P; e TELES, N.M.M., 2012).

Foi utilizado primer universal, da ordem Leishmania, LU-5A, 5'-TTT ATTGGT ATG CGA AAC TTC-3' (HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A., et al.,1998); para a identificação das espécies *L. braziliensis*, e *L. amazonensis*, os primers reversos foram, respectivamente, LB-3C, 5'-CGT CCC GAA CCC CGT GTC-3' (Harris et al., 1998) que gera um amplicon de 149 pb e Lam 5'-TAA AAG CCG CTC ACC CAC AG-3'; que gera um amplicon de 220 pb.

O primer para *L. amazonensis* foi redesenhado pela Prof^a. Dr^a. Jaqueline Dias de Oliveira da Universidade Federal do Tocantins - UFT usando o software Primer designer versão 2.0 a partir da sequência da região SL (spliced leader) de RNA (mini-exon) de Harris, et al.,1998.

Nas reações de PCR de *L. braziliensis* foram utilizados os 10 pmoles de cada um dos primers LU-5A e LBr, acrescidos dos có-fatores: Betaína a 0,6M, Ditiotretol (DTT) a 1mM, Cloreto de Tetrametilamonio (TMAC) a 50 mM, para um volume final de 25 µl, para os seguintes ciclos: 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos, 1 ciclo a 72°C por 5 minutos e 4°C por 5 minutos. Para as reações de *L. amazonensis*, foram

usados os 10pmoles de cada um dos primers LU-5A e Lam, acrescidos de Betaína a 0,6M, Ditiotretitol (DTT) a 1mM, Cloreto de Tetrametilamonio (TMAC) a 50mM e Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10,5% para um volume final de 25µL, seguindo o mesmo programa no termociclador da *L. braziliensis*.

4.6. Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos amplificados foram visualizados em Gel de Agarose, a 2% para os primers de *L. Infantum chagasi* e *L. braziliensis*, e a 3% para *L. amazonensis*. A esses géis, foram adicionados Brometo de Etídeo 0,1 µg/mL, sendo posteriormente visualizados sob luz ultravioleta no transluminador.

4.7. Teste de Imunohistoquímica dos fragmentos obtidos

Por motivos operacionais, só foram possíveis utilizar 17 cães dos 30 para o ensaio Imunohistoquímico, no qual realizaram-se secções das porções de fígado e baço, acondicionando-os em cassetes em formol tamponado. Estes tecidos foram inclusos em parafina para posterior cortes histológicos. Após a realização das secções, os mesmos foram desparafinados, em banhos de xilol em temperatura ambiente por 20 minutos e novamente em banho de xilol por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram hidratados em banhos sequenciais com concentrações decrescentes de etanol, durante 5 minutos em cada solução. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e em água destilada por 5 minutos. Foi efetuado o bloqueio de peroxidase endógena com três passagens de 10 minutos em solução de água oxigenada a 3% em câmara escura. Procedeu-se a lavagem em água corrente, água destilada e em PBS pH 7,4 por 5 minutos para cada lavagem. A exposição de antígenos foi feita por incubação em tampão Retrieval (pH 9,0 a 95%; Dako, Denmark) por 5 minutos em cada lavagem. As secções foram incubadas com uma solução de anticorpo policlonal anti-*Leishmania amazonensis*, produzidos em camundongo diluído 1:1000 em albumina bovina (BSA) 1% “over Night” a 4 °C (gentilmente cedido pelo Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). Após isso, efetuou-se a lavagem em PBS por 10 minutos e incubação com anticorpo secundário anti IgG de camundongo, Biotinilado, 30 minutos a 37 °C, seguida de lavagem em 100 mL

PBS. Em seguida os cortes foram incubados com o complexo Streptavidina-Peroxidase, 30 minutos a 37 °C (kit LSAB marca dako, Código K690). Efetuou-se a revelação da reação com 3,3 Diaminobenzidina, 45 mg em PBS, acrescido de 1,2 mL de água oxigenada 3% e contracorado com hematoxilina 10 segundos.

4.8. Coleta de dados epidemiológicos e testes estatísticos

Os dados epidemiológicos de Leishmaniose Visceral Humana, foram obtidos pelo Departamento de Vigilância Epidemiológica do Estado, através de relatórios segundo municípios de residência do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. No que se refere aos dados de Leishmaniose Visceral canina, este obteve-se pela Secretaria Municipal de Saúde de Porto Nacional no departamento de Vigilância Epidemiológica. Para esses dados, aplicou-se o teste estatístico do QUI-Quadrado (χ^2), um método não paramétrico, com o princípio de comparar as divergências entre as frequências observadas e esperadas, onde se trabalha com duas hipóteses:

H0: não há associação entre grupos;

H1: há associação entre grupos;

Contudo, quando o Teste QUI-Quadrado (χ^2) apresenta resultado significativo ($p < 0,05$), pode-se inferir que houve associação entre o número de casos positivos da doença em relação ao total de casos investigados naquele ano. O resultado não significativo, por sua vez, indicaria não haver associação.

Assim, uma vez que o teste seja significativo, ou seja, existir dependências do número de casos em função do ano de investigação, utilizou-se a estimativa do Intervalo de confiança para proporção com o objetivo de evidenciar o ano discordante, descrito por (FERREIRA, 2005).

Para a análises comparativa dos resultados da Imunohistoquímica (IHQ) entre os tecidos analisados, foi utilizado o teste G, teste não-paramétrico para duas amostras independentes, semelhante em todos os seus aspectos ao do QUI-Quadrado, para dados categóricos. Os escores devem ser mensurados em nível nominal ou ordinal, e as amostras podem apresentar duas ou mais categorias dispostas em tabelas de contingência I x c. Os graus de liberdade são assim calculados: $(I - 1) \times (c - 1)$, sendo “I” – linha e “c” – coluna.

H0: a ocorrência de LV detectada por IHQ independe do tecido do animal analisado;
H1: a ocorrência de LV detectada por IHQ está associada ao tecido do animal analisado, com nível de precisão de 0,05

No que se refere aos resultados comparativos entre PCR e IHQ, utilizou-se o Teste Kappa que é destinado a comparar as proporções da mesma variável mensurada a nível nominal em duas ocasiões diferentes. Testa-se a reprodutibilidade dos resultados, admitindo-se que haverá concordância nas proporções das respostas nos dois períodos considerados.

Todos esses testes foram realizados pelo programa estatístico Bioestat 5.6.

5. RESULTADOS

5.1. Sintomatologia dos cães

Dos 30 cães coletados, 65 % eram constituídos por animais jovens com faixa etária variando de 6 meses até 3 anos, quanto aos gêneros dos animais, 13 pertenciam ao sexo masculino e 17 femininos. No que se refere aos aspectos clínicos, 20 apresentaram-se sintomáticos, apenas 9 oligossintomáticos e 1 assintomático, conforme tabela 1. Dentre os sintomas investigados, os mais predominantes foram: Linfadenomegalia em 91,6 % dos cães, figura 18, alterações na pele do tipo abrasões, 87,3%, figura 19, alterações na pele do tipo ulceração, 83,3%, figura 20. Além dessas lesões na pele, verificou-se um cão com descamação furfurácea, figura 21, hepatomegalia, 75%, figura 22, apatia, 62,5%, emagrecimento, 58,3% e esplenomegalia, 54,1%, figura 23. Os menos predominantes foram hipertermia com 41,6 % e alterações oftálmicas com 28,8%, figura 24, e onicogribose, 29,1%, figura 25.

Tabela 1 - Sinais clínicos investigados dos cães analisados com sorologia positiva para Leishmaniose visceral

Sinais clínicos	Número absoluto	Percentual
Apatia	15	62,5
Hipertermia	10	41,6
Alterações na pele (abrasões)	21	87,5
Alterações na pele (úlceras)	20	83,3
Linfadenomegalia	22	91,6
Esplenomegalia	13	54,1
Alterações oftálmicas	5	28,8
Hepatomegalia	18	75,0
Emagrecimento	14	58,3
Mucosas hipocoradas	13	54,1
Onicogribose	7	29,1

Figura 18 – Linfonodo da região escapular com tamanho de 3,5 cm de comprimento por 3,5 cm de largura indicativos de uma Linfadenomegalia. **Fonte: fotos da coleta durante a necropsia. Autor da tese**

Figura 19 - Lesões tipo abrasões no cotovelo direito. **Fonte: fotos da coleta durante o exame clínico. Autor da tese**

Figura 20 - Lesões tipo ulcerações na região superior da coxa esquerda. **Fonte: Fotos da coleta durante o exame clínico. Autor da tese**

Figura 21 - Descamação furfurácea, alopecia generalizada e lesão paquidermiante e dermatite generalizada. **Fonte: Fotos da coleta durante o exame clínico. Autor da tese**

Figura 22 - Fígado com características de infiltração gordurosa ou esteatos, com volume de peso de 490 g de um animal com 10Kg. **Fonte: fotos da coleta durante a necropsia. Autor da tese**

Figura 23 - Baço com volume de peso de 390 g de um animal de 7 Kg indicativo de Esplenomegalia. **Fonte: Foto da coleta durante a necropsia. Autor da tese**

Figura 24 - Conjuntivite e presença de secreção do trato respiratório indicativo de pneumonite. **Fonte: Foto da coleta durante o exame clínico. Autor da tese**

Figura 25 - Onicogrifose. **Fonte: foto da coleta durante o exame clínico. Autor da tese**

5.2. Resultados das amplificações por PCR dos fragmentos obtidos

Foram obtidos 30 fragmentos de baço e fígado e 22 fragmentos de linfonodos de cães com sorologia positiva com laudo do Laboratório Central do Tocantins, sendo que todos esses fragmentos apresentaram amplificações para as regiões dos primers de *L. Infantum* RV1/RV2, conforme figura 26, e nenhuma amplificação para as regiões dos primers para *L. braziliensis* Lu/Lbr e os primers Lu/Lam para *L. Amazonensis*, conforme as tabelas 2, 3 e 4.

Figura 26 - Gel de Agarose mostrando a amplificação de *L. Infantum chagasi*, utilizando primers RV1 e RV2 de 4 fragmentos de baço gerando um amplicon de 145 pb, controle positivo de *L. braziliensis*, utilizando os primers Lu e Lbr gerando um amplicon de 149pb e controle positivo de *L. amazonensis*, utilizando os primers Lu e Lam gerando um amplicon de 220 pb. M – Marcador de peso molecular de 100 pb. **Fonte: foto do autor da tese**

Tabela 2 - Resultados da amplificação por PCR em isolados de Leishmania do fígado de cães do Município de Porto Nacional - TO com Forma clínica e sorologia positiva para Leishmaniose visceral

Isolados	<i>L. Infantum chagasi</i> /Primers RV1/RV2	<i>L. braziliensis</i> /Primers Lu/Lbr	<i>L. amazonensis</i> / primers Lu/Lam
F1	+	-	-
F2	+	-	-
F4	+	-	-
F5	+	-	-
F6	+	-	-
F7	+	-	-
F8	+	-	-
F9	+	-	-
F10	+	-	-
F11	+	-	-
F12	+	-	-
F13	+	-	-
F14	+	-	-
F15	+	-	-
F16	+	-	-
F17	+	-	-
F18	+	-	-
F19	+	-	-
F20	+	-	-
F21	+	-	-
F22	+	-	-
F23	+	-	-
F24	+	-	-
F25	+	-	-
F26	+	-	-
F27	+	-	-
F28	+	-	-
F29	+	-	-
F30	+	-	-
F31	+	-	-

(+) Presença de amplificação, (-) não houve amplificação

Tabela 3 - Resultados da amplificação por PCR em isolados de Leishmania do Baço de cães do Município de Porto Nacional-TO com Forma clínica e sorologia positiva para Leishmaniose visceral

Isolados	<i>L. Infantum chagasi</i> /Primers RV1/RV2	<i>L.braziliensis</i> /primer Lu/Lbr	<i>L.amazonensis</i> /primer Lu/Lam
B1	+	-	-
B2	+	-	-
B4	+	-	-
B5	+	-	-
B6	+	-	-
B7	+	-	-
B8	+	-	-
B0	+	-	-
B10	+	-	-
B11	+	-	-
B12	+	-	-
B13	+	-	-
B14	+	-	-
B15	+	-	-
B16	+	-	-
B17	+	-	-
B18	+	-	-
B19	+	-	-
B20	+	-	-
B21	+	-	-
B22	+	-	-
F23	+	-	-
B24	+	-	-
B25	+	-	-
B26	+	-	-
B27	+	-	-
B28	+	-	-
B29	+	-	-
B30	+	-	-
B31	+	-	-

(+) Presença de amplificação, (-) não houve amplificação

Tabela 4 - Resultados da amplificação por PCR em isolados de Leishmania de linfonodos de cães do Município de Porto Nacional -TO com Forma clínica e sorologia positiva para Leishmaniose Visceral

Isolados	<i>L. Infantum chagasi</i> /Primers RV1/RV2	<i>L. braziliensis</i> /primer Lu/Lbr	<i>L. amazonensis</i> /primer Lu/Lam
L1	NR	NR	NR
L2	NR	NR	NR
L4	NR	NR	NR
L5	NR	NR	NR
L6	NR	NR	NR
L7	NR	NR	NR
L8	+	-	-
L9	+	-	-
L10	+	-	-
L11	+	-	-
L12	+	-	-
L13	+	-	-
L14	+	-	-
L15	+	-	-
L16	+	-	-
L17	+	-	-
L18	+	-	-
L19	+	-	-
L20	+	-	-
L21	+	-	-
L22	+	-	-
L23	+	-	-
L24	+	-	-
L25	+	-	-
L26	+	-	-
L27	+	-	-
L28	+	-	-
L29	+	-	-
L30	+	-	-
L31	+	-	-

NR – Teste não realizado, (+) Presença de amplificação, (-) não houve amplificação

5.3. Resultados do Imunohistoquímico - IHQ das amostras de fígado e baço

Dos 17 cães utilizados para a reação de Imunohistoquímica, 12 deles (70,5%) apresentaram imunomarcacão para *Leishmania spp*, em pelo menos um dos órgãos avaliados (figura 27). Em relação aos fragmentos dos órgãos estudados, 58,8 % de tecido esplênico exibiram imunomarcacão, sendo este o órgão que apresentou maior frequência de positividade, o fígado apresentou 47 % de positividade (tabela 5). Apesar das diferenças entre os resultados obtidos, ao analisá-los pelo teste G, os resultados mostram uma associação significativa entre os resultados de IHQ dos tecidos analisados ($P < 0,05$), não mostrando diferenças entre os resultados ($P=0,0280$).

Figura 27- Fotomicrografia com aumento de 1000 x de Imunomarcacão de amastigotas em tecido esplênico de cães com Leishmaniose. **Fonte: foto do Autor da tese.**

Tabela 5 - Resultados obtidos da reação de Imunohistoquímica para o diagnóstico de Leishmaniose visceral canina em amostras de fígado e baço de cães infectados

	Imunohistoquímico		
	Positivos	Negativos	Total
Cães analisados	12	05	17
Fígado	08	09	17
Baço	10	07	17

5.4. Comparativos de PCR com a reação de IHQ

Ao se analisar comparativamente as mesmas amostras para ambos os testes, observa-se que em todos os 17 cães utilizados para as análises do IHQ houve amplificação para as regiões dos primers de *L. Infantum chagasi* RV1/RV2. Entretanto, apenas 12 apresentaram imunomarcagem em qualquer um dos órgãos no teste do IHQ (tabela 6). Quando aplicado o teste Kappa, o valor obtido foi de 0,2941, denotando fraca replicabilidade. O P-valor obtido (0,0077) é significativo ($p < 0,05$), denotando não haver concordâncias entre os dois testes PCR e IHQ. A escala de replicabilidade adotada foi a de Bernard Rosner (2006).

Tabela 6 - Análise comparativa da associação dos testes de PCR com Imunohistoquímico para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em amostras oriundas de fígados e baço.

Teste	Positivos	Negativos	Total
PCR	17	0	17
IHQ	12	5	17

5.5 Número de casos de leishmaniose visceral canina em Porto Nacional no período de 2010 a 2016.

Verifica-se na tabela 7, uma variação nos números de cães examinados, no entanto, observa-se a partir de 2013, um decréscimo, porém com percentual de positividade inalterado, havendo uma pequena alteração em relação aos anos de 2013 a 2014, com um aumento significativo dos percentuais de positivos conforme figura 28. Constata-se também, que os anos de 2010, 2012 e 2013, foram aqueles que apresentaram os menores percentuais de positividade em relação aos demais anos (χ^2 , $p < 0,05$), denotando haver diferenças entre esses com os demais.

Tabela 7 - Resultados anuais de sorologia para Leishmaniose visceral canina expressos em percentuais de casos positivos (%), número casos positivos absolutos, intervalo de confiança para a proporção (%) e total de casos examinados em Porto Nacional

Ano	Positivo	I.C (%)	Examinados
2010	526(14,8%)	13,6 – 15,9	3570
2011	661(23,8%)	25,4 – 22,2	2778
2012	463(15,9%)	17,1 – 14,5	2928
2013	847(19,3%)	20,5 – 18,1	4391
2014	770(22,5%)	23,9 – 21,1	3429
2015	342(23,6%)	25,7 – 21,3	1459
2016	402(24,8%)	26,9 – 22,7	1624

I.C. – Intervalo de Confiança. Fonte: Fonte: SEMUS de Porto Nacional, 2017.

Figura 28 – Estimativa da frequência relativa (%) e intervalo de confiança (%) para os casos positivos de Leishmaniose Visceral Canina em Porto Nacional de 2010 a 2016. As proporções seguidas de letras diferentes entre colunas, diferem entre si segundo seu intervalo de confiança ($p < 0,05$). Fonte: SEMUS de Porto Nacional, 2017.

5.6 Número de casos de Leishmaniose Visceral Humana em Porto Nacional de 2010 a 2016

A tabela 8, mostra um comparativo de casos notificados e confirmados, com seus respectivos Intervalos de Confianças de Leishmaniose Visceral Humana em Porto Nacional, apontando que 2013, foi o ano que apresentou os maiores números de notificações. Entretanto, os anos de 2010 e 2011, foram aqueles que observaram os maiores percentuais de positividade, no entanto, a partir desse período, houve uma diminuição expressiva desse percentual. Quando aplicado o teste do Qui-Quadrado (χ^2) para esses dados, verifica-se que essas variações foram significativas com $P=0,1703 < 0,05$, mostrando haver dependência da proporção do número de casos confirmados em função do ano no período de 2010 a 2016. Quando se observa as frequências relativas com seus respectivos intervalos de confiança, figura 29, nota-se uma variação significativa na proporção do intervalo de confiança dos anos de 2010 e 2011 em relação aos anos de 2012, 2013 e 2014. Porém, com queda interrompida no ano de 2015, com a máxima igualando a mínima de 2011, e a máxima de 2016 se igualando a média de 2015.

Tabela 8 - Tabela comparativa do número de casos notificados e confirmados com os respectivos Intervalo de Confiança de Leishmaniose Visceral Humana em Porto Nacional

Ano	Casos notificados	I.C %	Casos confirmados
2010	53	71,2 – 45,2	31(58,5%)
2011	43	61,4 – 31,6	20(46,6%)
2012	54	21,9 – 4	7(13%)
2013	63	16,8 – 2,3	6(9,6%)
2014	50	5,7 – 2,3	2(4%)
2015	39	33,2 – 7,8	8(20,6)
2016	56	18,8 – 2,6	6(10,8)

I.C. – Intervalo de Confiança. Fonte: SEMUS de Porto Nacional, 2017.

Figura 29 - Estimativa da frequência relativa (%) e intervalo de confiança (%) para os casos positivos de Leishmaniose Visceral Humana em Porto Nacional de 2010 a 2016. **Fonte: SEMUS de Porto Nacional, 2017.**

5.7 Número de casos de Leishmaniose Visceral Humana no Tocantins no período de 2010 a 2016

Observa-se na tabela 09, que o número de positividade de LVH apresentou-se em declínio de 2010 até 2014, apresentando uma pequena elevação de 2014 a 2016. Quando analisado pelo teste do QUI-quadrado, observa-se uma variação significativa entre os anos, com $P=0,0275 < 0,05$, verificando que a frequência dos casos depende do ano. Essa oscilação, foi evidenciada pelo intervalo de confiança, figura 30, onde houve uma queda expressiva entre os anos de 2010, 2011 em relação aos demais. O ano de 2014 foi o que apresentou o menor percentual, igualando com os anos de 2013 e 2015 em algum ponto do Intervalo de Confiança.

Tabela 9- Comparativo do número de casos notificados em relação aos confirmados com os respectivos Intervalo de Confiança de Leishmaniose Visceral Humana no Tocantins

Ano	Casos notificados	I.C %	Casos confirmados
2010	1359	28,3 – 23,6	353(26%)
2011	2006	26,2 – 22,4	487(24,6%)
2012	2390	15,5 – 12,7	337(14,10%)
2013	2214	13,9 – 11,1	277(12,6%)
2014	1654	12 – 9	174(10,6%)
2015	1635	13,9 – 10,7	201(12,3%)
2016	1473	17 – 13,4	224(15,2)

I.C. – Intervalo de Confiança. **Fonte: Secretaria de Estado da Saúde do Tocantins - SINAN, 2017.**

Figura 30 - Estimativa da frequência relativa (%) e intervalo de confiança (%) para os casos positivos de Leishmaniose Visceral Humana no Tocantins de 2010 a 2016. **Fonte: Secretaria de Estado da Saúde do Tocantins - SINAN, 2017.**

5.8 Resultados do comparativo do percentual de positividade de LVC e LVH no Município de Porto Nacional no período de 2010 a 2016

A figura 31 mostra um comparativo do percentual de positividade de Leishmaniose Visceral Canina e humana, observando que os casos humanos nos anos de 2010 e 2011 apresentam-se maiores em relação aos casos caninos. No entanto, após esse período, esse evento se modifica, com uma diminuição dos casos humanos e um aumento dos casos caninos.

Figura 31 - Gráfico comparativo do percentual de positividade de LVC e LVH no município de Porto Nacional no período de 2010 a 2016. **Fonte: SEMUS/ Porto Nacional e SESAU, Departamento de Vigilância epidemiológica do Estado do Tocantins.**

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1. Discussão dos resultados de sintomatologia dos cães

O diagnóstico clínico da LVC é bastante complexo. Apesar da ausência de sinais clínicos patognomônicos, aqueles mais comuns são: alterações cutâneas, linfadenomegalia local ou generalizada, perda de peso, aumento do tamanho do baço e do fígado, onicogribose ou apatia (MAIA e CAMPINO, 2008).

Observa-se nos resultados, que a maioria dos cães analisados, foram sintomáticos e apenas 1 assintomático e 8 oligossintomáticos, sendo que os sintomas mais frequentes foram: linfadenomegalia em 91,6 % dos cães, alterações na pele do tipo abrasões, 87,3%, alterações na pele do tipo ulceração, 83,3%, hepatomegalia, 75%, apatia, 62,5%, emagrecimento, 58,3% e esplenomegalia, 54,1%. Os menos predominantes foram hipertermia com 28,8 % e alterações oftálmicas com 28,8%. Isso provavelmente pode ser em decorrência de que esses cães foram provenientes de demanda espontânea da população, levados ao CCZ já com os sintomas da doença proeminentes. Observa-se também, que todos os cães, tanto sintomáticos como oligossintomáticos apresentaram amplificações para as regiões dos primers de *L. infantum chagasi* RV1/RV2. No que se refere ao teste Imunohistoquímico, houve imunomarcacão tanto para sintomático como oligossintomático.

Para SIDERIS, V.; PAPADOULOU, G.; DOTSIK, E., et al., (1999), muitos cães infectados pela LV, podem ser assintomáticos e permanecem saudáveis por toda a vida, desenvolvendo uma resposta imune celular, entretanto, existem outros que são susceptíveis a doença e que se tornam sintomáticos.

Em um modelo experimental de infecção canina, mostrou-se que os cães apresentam respostas imunes variáveis, sendo que embora alguns tenham desenvolvido a doença, outros cães infectados permaneceram assintomáticos ao longo de 5 anos de observação (PINELLI, et al., 1994).

QUEIROZ, et al., (2010), analisando cães com leishmaniose visceral pelas técnicas de PCR e Imunohistoquímica em tecidos cutâneos, obteve

resultados semelhantes, sendo que as principais alterações observadas foram: hepatoesplenomegalia, emagrecimento, linfadenomegalia, alterações cutâneas como dermatite e onicogrifose. Em um outro estudo, ASSIS, et al., (2010), comparando métodos diagnósticos para LV em cães oriundos de Ilha Solteira, SP, demonstrou que a maioria dos sintomas verificados em cães sintomáticos eram: alterações da pele com 71 %, esplenomegalia com 83 %, hepatomegalia com 75 % e emagrecimento em 58 % dos cães analisados. FREIRE, S.M.; CAMPOS, A.P.; CAVALCANTE, R.R., et al., (2014) ao estudarem as alterações do baço e o estado clínico de cães com leishmaniose visceral, observaram que 86,7% dos cães apresentaram linfadenopatia, seguida pelas lesões de pele (80%), perda de peso (60%), conjuntivite (33,3%) e onicogrifose (27,7%). Todos esses resultados seguem em concordância com os resultados obtidos nesse trabalho.

6.2. Discussão dos resultados da PCR diagnóstica dos fragmentos

As técnicas moleculares representam um grande avanço no diagnóstico canino, principalmente devido a sua elevada sensibilidade. Porém os custos dessa técnica são bastante elevados (FARIAS e ANDRADE, 2012). No entanto os ensaios de PCR melhoraram consideravelmente o diagnóstico parasitológico da LVC, sendo que a detecção de DNA do parasita em tecidos por técnicas de PCR permite o diagnóstico sensível e específico (SOLANDO-GALLEG0, et al., 2009).

Ao analisar os tecidos de fígado, baço e linfonodos, observou-se que houve amplificações para as regiões dos primers de *L. Infantum chagasi* RV1/RV2 e nenhuma amplificação para as regiões dos primers para *L. braziliensis* Lu/Lbr e os primers Lu/Lam para *L. Amazonensis*. Isto pode ser justificado em decorrência da urbanização da leishmaniose visceral. Para MARCONDES e ROSSI, (2013) muitos fatores podem ter contribuído para dispersão da LV no Brasil, destacando-se a movimentação de cães de áreas endêmicas para não endêmicas e a mudança na ecologia do vetor, sendo esse, disseminado pelo Brasil e adaptado ao ambiente modificado pelo homem. MACHADO, C.J.S.; SILVA, E.G. e VILANI, R.M., (2016), ressaltam que o perfil epidemiológico do território nacional foi redesenhado pelo quadro endêmico de leishmaniose, principalmente a visceral que envolve os cães como reservatórios e que a dispersão espaço temporal dessa doença acompanha

um rápido crescimento das cidades com um alto fluxo populacional, o aumento da pobreza, as baixas condições sanitárias, o deslocamento do reservatório doméstico e a adaptação das espécies vetoras.

No que se refere a alta positividade de *L. infantum chagasi* nesses tecidos, explica-se pelo fato desses parasitos apresentarem tropismo por esses órgãos. NEVES, (2011), relata que a *L. infantum chagasi* é um parasita do sistema mononuclear fagocitário, principalmente baço, linfonodo, fígado e medula óssea. Entretanto no curso da infecção, outros órgãos podem ser atingidos, como intestino, sangue, rins e pele. COSTA, et al., (2015) avaliando a PCR diagnóstica em 195 amostras de sangue canino para o diagnóstico de leishmaniose canina em duas diferentes regiões epidemiológica: Campinas – SP e Teresina – PI, verificaram que nenhuma amostra de sangue foi positiva para os Primers de *L. braziliensis* e apenas 35 amostras testadas inicialmente para *Leishmania spp*, foram positivas para os primers RV1 e RV2 de *L. infantum chagasi*. Em outro trabalho publicado por MOTOIE, G.; FERREIRA, G.E.M.; CUPOLILLO, E., et al., (2013), estudando a distribuição espacial e genética de populações de genótipos de *Leishmania infantum chagasi* em tecidos de cães no Estado de São Paulo, verificou amplificação para as regiões dos primers de RV1 e RV2 em 250 amostras de tecidos caninos. COIRO, C.J.; COELHO, L.G.G; SILVA, C., et al., (2017), analisando cães por caracterização molecular, observou que das 164 amostras de sangue, linfonodo e medula óssea, 46 se apresentaram positivas para *L. Infantum chagasi* no sangue, 94 para o linfonodo e 114 para medula óssea. FARIAS e ANDRADE, (2012), explicam que em amostras de sangue total, apesar de ser uma coleta menos invasiva, a sensibilidade mostra-se inferior àquela obtida com outros tecidos. Vale ressaltar, entretanto, que a não detecção de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, não exclui a possibilidade de infecções, em virtude de não terem sido coletas de fragmentos de pele, local do tropismo dessas espécies. No entanto, SANCHES, et al., (2016), verificaram alta prevalência de *L. Amazonensis* em sangue periférico de cães com leishmaniose na cidade de Bauru – SP, sugerindo que a alta frequência de infecção causada por *L. amazonensis* vistas nesses cães, mostra que a doença que é tratada como Leishmaniose Visceral canina que geralmente é causada por *L. infantum chagasi* é de fato causada por *L. amazonensis* responsável pelas formas cutâneas da doença. Ele também destaca,

que somente a sorologia não seria suficiente para diferenciar a Leishmaniose Visceral da Leishmaniose tegumentar. No que se refere a cães infectados com *L. braziliensis*, MORGADO, et al., (2016), detectaram *L. braziliensis*, por PCR-RFLP, em um cão assintomático que apresentava co-infectado com *Hepatozoon canis* e sorologia positiva para Leishmania, diagnosticado com LV. Além disso, verifica-se uma tendência em considerar o cão doméstico como reservatório da Leishmaniose Tegumentar, porém, para DANTAS-TORRES, (2007), a importância dos cães como reservatório hospedeiro da *L. braziliensis* é certamente insignificante no ciclo de transmissão domiciliar e peridomiciliar, tendo em vista a ausência do vetor para transmissão no ambiente urbano, uma vez que os vetores para LTA possui comportamento mais silvestre, sendo que onde houve infecções humanas, todos os casos estavam relacionados com ecoturismo, construção de estradas, atividade com agriculturas e militares.

6.3. Discussão dos resultados da Imunohistoquímica dos fragmentos de fígado e baço.

O diagnóstico das leishmanioses pode ser feito pela visualização de achados de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e tamanhos compatíveis com amastigota. A técnica de Imunohistoquímica aumenta a possibilidade de detecção do parasito nos tecidos, baseado na detecção de antígenos *in situ*, por meio da utilização de anticorpo (XAVIER, et al., 2006).

Em nossos estudos verificou-se que 70,5 % dos cães analisados apresentaram imunomarcção para *Leishmania spp*, em pelo menos um dos órgãos avaliados. No que se refere aos órgãos estudados, 58,8 % dos tecidos esplênicos exibiram imunomarcção e o fígado apresentou 47% de positividade. Apesar das diferenças entre esses resultados, ao analisá-los pelo teste G, mostra não haver variações significativas com ($P=0,0280$). Resultados semelhantes foram descritos por GUERRA, et al., (2011), ao analisarem diferentes tecidos caninos, observando que 78,8% dos tecidos que apresentaram imunomarcção eram de tecido esplênico, seguido pelo linfonodo do poplíteo (76,6%) e o terceiro com maior positividade foi o fígado (73,4%). Entretanto quando aplicado o índice de *Kappa*, observou grau de concordância muito bom entre baço e fígado. FURTADO, et al., (2015), ao realizarem estudos comparativos entre Imunohistoquímico e

hibridização *in situ*, sugerem que o baço e o linfonodo são os tecidos mais adequados para a detecção de *L. infantum chagasi* com positividade de 81,5 % dos cães estudados. Em trabalhos realizados por LAURET, et al., (2013), o baço apresentou uma taxa de positividade para IHQ de 71,4%. Todos esses resultados estão em consonância com os obtidos nesse estudo.

6.4. Discussão dos resultados comparativos de PCR com a reação de IHQ

A sensibilidade de IHQ e PCR nesse estudo foi similar à encontrada na literatura. Quando comparadas as duas técnicas observa-se que a IHQ foi menos sensível que a PCR, sendo que 100 % dos cães analisados foram positivos para *L. infantum chagasi* por PCR e apenas 70 % positivos para IHQ. Quando aplicado o teste Kappa, o valor obtido foi de 0,2941, denotando não haver concordâncias entre os dois testes PCR e IHQ. Isso pode ser explicado em virtude da sensibilidade da PCR, que a qual pode amplificar pequenos trechos da molécula de DNA em fragmentos de tecidos com muito pouco DNA, ao passo que no IHQ, precisa de fragmentos de tecidos com parasitos suficientes para que os anticorpos apresentem imunomarcção. Isso pode ser corroborado pelos resultados obtidos por (MULLER, N.; HENTRICH, B.; FREY, C.F. e WELLER, M., 2015), avaliando tecidos de cães e equinos em PCR em tempo real, observando que nos tecidos onde havia baixa carga parasitária (0,016 amastigotas/ μ g de tecidos), foi necessária uma inspeção microscópica cuidadosa de toda a secção do tecido para a detecção das amastigotas imunomarcadas. Em um outro trabalho realizado por, AMATO, et al., (2009), comparando IHQ e PCR em pacientes com Leishmaniose cutânea, os autores verificaram uma positividade na PCR de 90 % nas pessoas infectadas e apenas 68,8 % dos casos foram positivos para o antígeno de Leishmania. Em um outro trabalho realizado por ASSIS, et al., (2010), dos 34 cães avaliados, 20 resultaram positivos para Leishmania nos testes parasitológicos IHQ e HE e sorológicos RIFI e ELISA, porém, 9 cães permaneceram como suspeitos e 5 como negativos. Todos os casos suspeitos e negativos, tiveram as amostras testadas por PCR, obtendo uma positividade em quase todos os cães, 13 dos 14 suspeitos e negativos, e apenas 1 negativo, elevando a positividade do diagnóstico dos cães com LVC.

6.5 Discussão do número de casos de leishmaniose visceral canina em Porto Nacional no período de 2010 a 2016.

Apesar de poucas evidências na literatura, o sacrifício de cães com LV, tem sido considerado como umas das estratégias como controle dessa doença no Brasil. Muitos autores argumentam que essa estratégia apresenta baixo custo-benefício e muitos são contra (COSTA, D.N.; CODEÇO, C.D.; SILVA, M.A. e WERNECK, G.L., 2013).

DYE, (1996), por meio de um estudo matemático, considerou o controle vetorial a estratégia mais efetiva e questionou o controle do reservatório canino.

Com base nesse estudo, verifica-se que houve uma diminuição dos números de cães positivos de 2011 para 2012, no entanto, esses dados aumentaram gradativamente, retornando ao percentual de 2011 no ano de 2014. Quando aplicado o intervalo de confiança, observa-se que as proporções de positividade dos anos de 2011, 2014, 2015 e 2016 são equivalentes. Assim sendo, constata-se que somente a eutanásia dos cães como controle da Leishmaniose não é suficiente, uma vez, que nenhuma das ações isoladas de controle da leishmaniose, repercute em efeitos positivos no contexto geral sobre o agravo. COSTA, (2011), retrata que ainda não existe consenso na literatura, quanto a eliminação de cães para o controle da Leishmaniose. Para ROMERO e BOELAERT, (2010), o cão doméstico tem sido incriminado como um importante reservatório para o parasito no ambiente urbano, porém o controle baseado somente no sacrifício de cães, não tem mostrado um controle efetivo contra a propagação dessa doença pelo país. Além disso, como o Tocantins está situado em uma área endêmica para leishmaniose, existe a possibilidade de haver muitos cães assintomáticos, contribuindo para manutenção do ciclo no estado. GONTIJO e MELO, (2004), relatam que uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos, que dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados se apresentam assintomáticos e podem ser fonte de infecção para flebotomíneos. Estudos

realizados por MOSHFE, et al., (2009), concluíram que cães assintomáticos infectados com *Leishmania* e bem como os sintomáticos apresentam um papel importante na manutenção da infecção e provavelmente mantendo o ciclo de transmissão do parasita nas áreas endêmicas de LVC. Um outro fator importante que contribui para a manutenção do ciclo é a presença de muitos lotes baldios e presença de lixo e matéria orgânica em decomposição. Nesse estudo observa-se que as principais áreas onde foram capturados os cães para a pesquisa em Porto Nacional são as que apresentam uma elevada quantidade de lotes baldios com presença de vegetações em decomposição e até mesmo lixo. Além dessas características, o hábito de criação de galinhas por parte da população pode ser considerado um fator de risco para a ocorrência de Leishmaniose. BIGELI, J.G.; JÚNIOR, W.P.O, e TELES, N.M.M., (2012), afirmaram que a presença de mata ou de muita vegetação nas proximidades das residências também pode ser um fator de risco para a ocorrência de leishmaniose visceral canina. Conclusão feita após estudos em cães infectados por *Leishmania infantum* e sua relação com aspectos ambientais e sanitários no município de Palmas, Tocantins, onde verificou-se que a maioria dos cães com Leishmaniose, encontravam-se em áreas com elevados números de lotes baldios, presença de vegetação e detritos de demolição e matéria orgânica em decomposição. Além desses aspectos, observou-se que esses locais não apresentavam redes de esgotos e muitos descarregavam esgotos em vala em ar livre. SANT'ANNA, et al., (2010), relatam que a presença de galinhas nas residências está relacionada a uma maior proliferação do vetor da LV, e que a presença de patos, roedores, pássaros e galinhas próximos aos domicílios aumenta o risco de ocorrência de Leishmaniose Visceral. MARCONDES e ROSSI, (2013), retratam que em grande parte dos locais onde existem elevada transmissão de LV tanto em humanos como em canina, as condições socioeconômicas da população são precárias. Afirmam ainda, que a urbanização desorganizada nas periferias das cidades associados com habitações inadequadas, ausência de estrutura sanitária, aglomerado populacional, presença de potenciais criadouros e animais domésticos nas residências são fatores que favorecem a expansão da doença. As mudanças ambientais mostram-se sem dúvida, entre as mais importantes forças motrizes para a emergência e re-emergência dessa doença, que contam ainda com mudanças no uso da terra, mudanças climáticas, condições socioeconômicas e perda da

biodiversidade como matriz impulsionadora a disseminação espaço temporal dessa enfermidade (MACHADO, C.J.S.; SILVA, E.G. e VILANI, R.M., 2016). Associados a esses resultados, observa-se também, que houve uma diminuição no número de coletas, provavelmente em decorrência da falta de condições orçamentárias que levou a uma descontinuidade das ações de campo, como inquérito sorológico, prevenção e controle. ROMERO, (2016), no debate do artigo de Von Zuben & Donalísio sobre o controle da Leishmaniose no Brasil, constata que os principais problemas enfrentados na execução da política brasileira de controle de Leishmaniose visceral, levando em consideração a percepção dos gestores do programa é a descontinuidade das ações de prevenção e controle que algumas vezes é afetada pela priorização de outros programas, em decorrência de problemas orçamentários e bem como a escassez de recursos humanos devidamente treinados. Isso reflete na impossibilidade de cumprir com as ações de controle preconizadas, em um cenário caracterizado por recursos. QUINNEL e COURTENAY, (2009), apontam que um dos possíveis fatores que contribuem com a baixa efetividade dos programas de eutanásia canina, está relacionada com a descontinuidade do programa em decorrência de falta orçamentária e recursos humanos adequadamente treinados, associados a triagem de cães infectados assintomáticos que são infecciosos para os vetores, cooperando assim para a continuidade da infecção.

6.6 Discussão da proporção do intervalo de confiança do percentual de positividade de Leishmaniose Visceral Humana em Porto Nacional e no Tocantins de 2010 a 2016

As atividades de controle da LV no Brasil iniciaram-se na década de 50, com base no controle do vetor, controle de reservatórios e tratamento de casos humanos associados. No entanto em 2003, o Ministério da Saúde lançou o manual de vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, reeditado em 2006, considerando que os principais desafios para o controle da endemia, está na urbanização; alteração no perfil clínico epidemiológico da doença; dificuldades operacionais; grau de efetividade das medidas empregadas e o alto custo financeiro (MORAIS, M.R.F.; FIUZAV.O.P.; ARAUJO, V.E.M., et al., 2015). No entanto, ainda não existe consenso na literatura sobre a importância do papel do cão na

transmissão da *Leishmania infantum chagasi* para os seres humanos e nem, tão pouco, sobre os benefícios da eutanásia de cães para o controle LV (COSTA, D.N.; CODEÇO, C.D.; SILVA, M.A. e WERNECK, G.L., 2013). Todavia, o Ministério da Saúde orienta a eutanásia canina de todos os animais soros reagentes e/ou parasitológico positivo (BRASIL, 2014).

Apesar dos gráficos indicarem queda no percentual de positivities dos casos confirmados de LV humana em Porto Nacional a partir 2011, verifica-se que quando aplicado o intervalo de confiança, os pontos das médias do ano de 2015 se encontram em determinados pontos do intervalo em comparação ao ano de 2011, indicando não haverem mudanças significativas entre eles. Porém, o ano 2014 se equivale proporcionalmente aos anos de 2012 e 2013, mostrando que esse decréscimo da proporção de positividade foi interrompido nesse período, provavelmente em decorrência na falta da continuidade de efetividade nas ações de controle. Para WERNECK, (2008), uma razão fundamental para a falta de efetividade dessas estratégias está na ausência de um sistema de vigilância permanente, com a utilização extensiva de recursos humanos e financeiros. Em 1980, o município de Teresina – PI foi o local de ocorrência da primeira epidemia de leishmaniose visceral urbana no Brasil (COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F. e ARAÚJO, M.V., 1990). Essa incidência caiu após 1985, no entanto, uma nova epidemia ocorreu entre 1993 e 1995 somando mais de 1200 casos, sendo que no período de 1996 a 1998, essa doença permaneceu no município de forma endêmica e a partir de 1998, têm-se observado um aumento gradual de sua incidência (WERNECK, 2008). Além disso, o ano de 2011, segundo dados epidemiológicos do Ministério da Saúde, foi o período que mais houve registro de Leishmaniose Visceral no Brasil, em uma série histórica de 1980 até 2015. Isso evidencia um comportamento similar dos dados de Porto Nacional e Estado do Tocantins em relação ao Brasil. Tudo isso vem a corroborar com o afirmado no que concerne a falta de continuidade dos programas de ações. Quando comparamos o percentual do número de casos confirmados caninos com o número de casos confirmados humanos, observa-se que nos anos de 2010 e 2011 o número de casos humanos é superior aos caninos, a partir desse período, os casos caninos vem aumentando gradativamente, sendo superiores aos dos humanos, que passou por um período de decréscimo, mostrando não haver sobreposição entre eles. Além

disso, em áreas urbanas, existe a dificuldade em controlar a doença em decorrência do grande número de cães, muitos dos quais errantes, sendo que em parte, podem ser assintomáticos dificultando a detecção por não despertar suspeita clínica (MOSHFE, et al., 2009). Outro fator a se considerar é a rápida aquisição de infecção pelos novos cães introduzidos em substituição aos cães eliminados (COSTA, C.H.N.; TAPETY, C.M.M. e WERNECK, G.L., 2007). O controle da Leishmaniose no Brasil começou em 1953 no Estado do Ceará, assim como na China e União Soviética, sendo que nesses países, esse controle baseou-se no uso de DDT e eliminação de cães e no caso do Brasil priorizou o sacrifício de cães soro reagentes (COSTA, 2011). Contudo, em 1953, somente um cão soro reagente foi sacrificado, mas em 1954 e 1955 esse número subiu para 42 e um aumento maior para 2000 em 1960. Em comparação com as estratégias utilizadas por 14 países que além do sacrifício de cães pulverizaram DDT, houve uma diminuição na incidência de casos humanos de 595 para 320 casos, e nos municípios que adotaram somente a medida de sacrifício houve um acréscimo de 89 para 101 (WERNECK, 2008) in (ALENCAR, 1961). Esses dados apontam que controle do vetorial associado ao do reservatório mostram-se mais eficiente para conter o crescimento da doença.

7. CONCLUSÃO

- Foi observado uma predominância de cães sintomáticos (66,6 %), sendo os sinais e sintomas mais frequentes foram: Linfadenomegalia, alterações na pele do tipo abrasões, alterações na pele do tipo ulceração, um cão com descamação furfuracea, hepatomegalia, apatia, emagrecimento, esplenomegalia.
- No universo amostral de cães avaliados, a *Leishmania infantum chagasi* foi espécie predominante dentre as três pesquisadas, não apresentando perfil de infecção canina para a *L. braziliensis* e *L. amazonensis*.
- Em decorrência do baixo N-amostral, fica como sugestão em trabalhos futuros a necessidade de ampliá-lo, e bem como, coletar amostras de tecidos de lesões cutâneas para a identificação das outras espécies;
- Não foram observadas diferenças significativas das taxas de positividade entre o baço e o fígado para o IHQ.
- Para o diagnóstico da LV, a técnica da PCR, apresenta-se como uma alternativa mais confiável em comparação aos ensaios de Imunohistoquímico, em virtude desta, apresentarem problemas com falsos negativos.
- Verifica-se uma diminuição significativa nos percentuais de positividade de LV canina no ano de 2011 em comparação a 2012. No entanto, a partir desse período, os casos aumentam, retornando as proporções referente a 2011.
- Observa-se que os anos de 2010 e 2011, foram aqueles com maior proporção de casos positivos humanos, havendo uma diminuição significativa em relação aos anos subsequentes em Porto Nacional e no Tocantins.
- Em relação ao comparativo de casos de LVC e LVH, constata-se uma mudança no percentual de positividade a partir de 2011, onde os casos caninos superaram os casos humanos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. M., AZEVEDO, A. C., MEDEIROS, W. M., ALVES, J. R., & RENDEIRO, V.. ASPECTS OF THE ECOLOGY OF PHLEBOTOMINES (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) In an area of cutaneous leishmaniasis occurrence, municipality of Angra dos Reis, coast of Rio de Janeiro state, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 56, p. 143-149. 2014. doi: 10.1590/S0036-46652014000200010
- ALENCAR, J. E.. Profilaxia do Calazar no Ceará - Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v.3, p.175-180. 1961
- ALVES, W. A.. Controle da Leishmaniose Visceral Baseado no Reservatório Canino. Em O. P. Salud, *Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas* p. 94-98. Rio de Janeiro: PANAFTOSA. 2006
- ALVES, W. A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. *Boletim Epidemiológico Paulista - BEPA*, v.6, p.25-29. 2009
- AMATO, V. T.W. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction on paraffin-embedded material improve the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. *International Journal of Dermatology*, v48, p.1091-1095. 2009.
- ASSCHE, T., DESCHACHT, M., LUZ, R. A., MAES, L., & COS, P. 15. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*, v.51, p.337-351. 2011. oi:doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011
- ASSIS, J. D., QUEIROZ, N. M., SILVEIRA, R. D., NUNES, C. M., OLIVEIRA, T. M., JUNIOR, A. C., MACHADO, R. Z. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães Oriundos Ilha Solteira, SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária Jaboticabal*, v.19, p.17-25. 2010.
- BATES, P. A.. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, v.37, p.1097-1106. 2007. doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.003
- BIGELI, J. G., JÚNIOR, W. P., e TELES, N. M. Diagnosis of Leishmania (Leishmania) chagasi infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, State of Tocantins, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.45, p.18-23. 2012.
- BRASIL. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnósticos clínico e diferencial*. Brasília, Distrito Federal: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL, *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2 ed., p. 1-177. 2010

BRASIL, *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (1ª ed., pp. 1-113). Brasília, 2014.

CARDIM, M. F., RODAS, L. A., DIBO, M. R., GUIRADO, M. M., OLIVEIRA, A. M., & CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Introdução e expansão da Leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, v.47, p.700. 2013 doi:10.1590/S0034-8910.2013047004454.

CARVALHO, T. F., NEVES, G. G., GOMES, P. P., TINOCO, H. P., PESSANHA, A. T., MALTA, M. C., SANTOS, R. L. Adrenitis associated with *Leishmania infantum* infection in a maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.8, p.88-94. 2015.

COIRO, C. J., COELHO, L. G., SILVA, R. C., & LANGONI, H. Molecular characterization of *Leishmania* spp. isolated from Brazilian stray dogs from an endemic area for canine visceral Leishmaniasis. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v.7, p.9 - 13. 2017. doi:10.1016/j.vprsr.2016.11.005

COSTA, C. H. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 232-242. 2011. doi:10.1590/S0037-86822011005000014.

COSTA, C. H., PEREIRA, H. F., ARAÚJO, M. V. Epidemia de Leishmaniose visceral no Piauí, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.24, p.365-372. 1990.

COSTA, C. H., TAPETY, C. M. e WERNECK, G. L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 415-419. 2007.

COSTA, D. N., CODEÇO, C. D., SILVA, M. A., & WERNECK, G. L. Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. *Neglected tropical diseases*, v.7, p23-55. 2013.

COSTA, L. N., BORBA, A. S., CASTAGNA, C. L., FILHO, E. B., MARSON, F. A., JUNIOR, F. F., LEVY, C. E. Evaluation of PCR in the diagnosis of canine leishmaniasis in two different epidemiological regions: Campinas (SP) and Teresina (PI), Brazil. *Epidemiology & Infection. Cambridge University Press*, v.143, p.1088-1095. 2015.

COSTA, S. M., CECHINEL, M., BANDEIRA, V., ZANNUNCIO, J. C., LAINSON, R., & RANGEL, E. F. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil - Mini Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.102, p.149-153. 2007.

CRUZ-CHAN, J. V., CETINA, A. D., LIZAMA, L. E., VEGA, P. P., SIERRA, M. j., VALLADO, M. E., DUMONTEIL, E. A canine model of experimental infection with *Leishmania* (L) *mexicana*. *Parasites & Vectors*, v.7, p.1-9. 2014.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, p.117-118. 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Vianna) Braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, v.149, p.139-146. 2007.doi:10.1016/j.vetpar.2007.07.007

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.27, p.305-318. 2004. doi:10.1016/j.cimid.2004.03.004

DYCE, K. S. Tratado de Anatomia Veterinária. *Tratado de Anatomia Veterinária* p. 856. Elsevier Health Sciences, 2010.

DYE, C. The Logic of Visceral Leishmaniasis Control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.55, p.125-130. 1996. doi:10.4269/ajtmh.1996.55.125

FARIAS, A. R., e ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.3, p.47-57. 2012. doi: 10.5123/S2176-62232012000200007.

FERREIRA, D. *Estatística Básica* p. 664. UFLA, 2005.

FILHO, G. *Bogíolo Patologia Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

FOGANHOLI, J. N., & ZAAPA, V. Importância da Leishmaniose na Saúde Pública. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. ISSN 1679-7353. Periódicos semestrais. 2011

FREIRE, S. M., CAMPOS, A. P., CAVALCANTE, R. R., LINDOSO, J. Â., & COSTA, F. A. Dinâmica das alterações do baço associadas ao estado clínico de cães com leishmaniose visceral. *Revista Brasileira de Ciências Veterinária*, v.21, p.27-32. 2014. doi:10.4322/2014.015.

FURTADO, M. C., MENEZES, R. C., KIUPEL, M., MADEIRA, M. F., OLIVEIRA, R. V., LANGOHR, I. M., & FIGUEIREDO, F. B. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, v.8, p.1-5. 2015.doi: 10.1186/s13071-015-1224-4

GONTIJO, C. M., & MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil:. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, p. 338 - 349. 2004.

GUERRA, J. A., PRESTES, S. R., SILVEIRA, H., COELHO, L. I., GAMA, P., MOURA, A., FERREIRA, L. C. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Vianna) Guyanensis* in the Brazilian Amazon. *Neglected tropical diseases*, 5, 1 - 5. 2011. doi:10.1371/journal.pntd.0000980.

HARRIS, E., KROPP, G., BELLI, A., RODRIGUEZ, B., & AGABIAN, N. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 1989-1995. 1998.

- HOFFMAN, A. R., NAVARRO, I. T., JUNIOR, V. E., CALDART, E. T., BREGANÓ, R. M., & PEREIRA, P. M. *Leishmania amazonensis* in dog with clinical diagnosis of visceral leishmaniasis in Paraná State, Brazil – a case report. *Ciências Agrárias*, v.33, p. 3265-3270. 2012. doi: 10.5433/1679-0359.
- JENNINGS, Y. L., SOUZA, A. A., ISHIKAWA, E. A., SHAW, J., LAINSON, R., & SILVEIRA, F. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* · *Leishmania* (*Viannia*) *shaw*i. *Parasite*, v.21, p.1 - 11. 2014. doi:10.1051/parasite/2014039.
- JÚNIOR, A. H., BELLATO, V., SOUZA, A. P., MOURA, A. B., SARTOR, A. A., SANTOS, E. G., & SILVA, V. L. Leishmaniose Tegumentar Canina no município de Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.43, p.713-718. 2010
- KUHLS, K., ALAM, M. Z., CUPOLILLO, E., FERREIRA, G. E., MAURICIO, I. L., ODDONES, R., SCHONIAN, G. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Neglected tropical disease*, v.5, p.1 - 16. 2011.
- LACHAUD, L., CHABBERT, E., DUBESSAY, P., DEREURE, J., LAMOTHE, J., DEDET, J.-P., & BASTIEN, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*, v.125, p. 197-207. 2002. doi:10.1017/S0031182002002081
- LACHAUD, L., MARCHERGUI-HAMMAMI, S., CHABBERT, E., DEREURE, J., DEDET, J. P., & BASTIEN, P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, p.210-215. 2002. doi:10.1128/JCM.40.1.210-215.
- LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.1, p.13 - 32. 2012. doi: 10.5123/S2176-62232010000200002
- LAINSON, R., & RANGEL, E. (Dezembro de 2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 811-827.
- LAINSON, R., shaw, j., SILVEIRA, F., SOUZA, A. D., BRAGA, R., & ISHIKAWA, E. The dermal Leishmaniosis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.89, p.435-443.1994.
- LANGONI, H., RICHINI-PEREIRA, V. B., SCREMIN, C., TRONCARELLI, M. Z., CAMARGO, J. B., MACHADO, J. G., et al. Zootecnia. Detecção Molecular de *Leishmania* spp. em material de hemocultura, e diagnóstico sorológico para Leishmaniose em cães procedentes do Bairro da Conquista, São Manuel-SP, Brasil, v.22, p. 580-590. 2015.

LAURET, M. D., ROSSI, C. N., MATA, V. L., TOMOKANE, T. Y., CORBETT, C. E., SECUNDINO, N. F., MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *veterinary parasitology*, v.196, p.296-300. 2013.

LE FICHOUX, Y. Q. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.1953 - 1957. 1999

LIU, D. *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens* v.1 D. LIU, Kindle. 2013.

LIU, D., & UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Cellular and infection microbiology*, v2, p.1-7. 2012. doi:103389/fcimb.2012.00083.

MACHADO, C. J., SILVA, E. G., & VILANI, R. M. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. *Revista Saúde e Sociedade*, v25, p247-258. 2016. doi: 10.1590/S0104-12902016146918

MAIA, C., & CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine Leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, v158, p274-287. 2008. doi:10.1016/j.vetpar.2008.07.028

MAIA-ELKHOURY, Silveira, A. N., ALVES, W. A., SOUSA-GOMES, M. L., SENA, J. M., & LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil:. *Caderno de Saúde Pública*, v.24, p.2941-2947. 2008

MARCONDES, M., & ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil, Visceral leishmaniasis in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.50, p.341-352. 2013

MAROLI, M., FELICIANGELI, M. D., BICHAUD, L., CHARREL, R., & GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, v.27, p.123-147. 2013. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01034.

MARZOCHI, M. A., & MARZOCHI, K. Leishmanioses em áreas urbanas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.30, p.162-163. 1997.

MARZOCHI, M. C., & MARZOCHI, K. B. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. *Caderno de Saúde Pública*, v.10, p. 358-375. 1994.

MENEZES, J. P., SARAIVA, E. M., & ROCHA-AZEVEDO, B. D. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasites & Vectors*, 9, 1 - 8. 2016. doi: 10.1186/s13071-016-1540-3

MORAIS, M. H., FIUZA, V. D., ARAUJO, V. E., MENEZES, F. C., & CARNEIRO, M. Avaliação das atividades de controle da leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas

Gerais, 2006-2011. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.24, p.485-496. 2015. doi:10.5123/S1679-49742015000300014.

MORGADO, F. N., CAVALCANTE, A. d., MIRANDA, L. H., O'DWYER, L. H., SILVA, M. R., MENEZES, R. C., PORROZI, R. Leishmania spp. coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.25, p.450-458. 2016. doi:DOI. 10.1590/s1984-29612016065.

MOSHFE, A., MOHEBALI, M., EDRISSINA, G., ZAREI, Z., AKHOUNDI, B., KAZEMI, D., MAHMOODI, M. Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of Leishmania infantum infection. *Acta trópica*, 112, 101-105. 2009.

MOTOIE, G., FERREIRA, G. E., CUPOLILLO, E., CANAVEZ, F., & PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Spatial distribution and population genetics of Leishmania infantum genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. *Infection, Genetics and Evolution*, p.48-59. 2013. doi:10.1016/j.meegid.2013.04.031

MULLER, N., HENTRICH, B., FREY, C. F., & WELLER, M. Quantitative PCR for the diagnose of cutaneous liehsmaniasis from formalin-fixed and paraffin-embedded skin sections. *Molecular and cellular probes*, 29, 507-510. 2015. doi:10.1016/j.mcp.2015.09.008

MURBACK, N. D., NAKAZATO, K. R., FILHO, G. H., NASCIMENTO, R. A., & DORVAL, M. E. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, 86, 55-63. 2011

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*, 13^a ed. Atheneu. 2011

NUNES, V. L., GALATI, E. A., CARDOZO, C., ROCCA, M. E., ANDRADE, A. R., SANTOS, M. F., ROSA, D. D. Estudos de flebotomíneos (diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.52, p.446-451. 2008.

OLIVEIRA, D. M., SARAIVA, E. M., ISHIKAWA, E. A., SOUSA, A. A., SILVA, E. O., & Silva, I. M. (Dezembro de 2011). Distribution of phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) across an. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 1039-1044.

OLIVEIRA, G. M., FILHO, E. A., ADRADE, G. M., ARAUJO, L. A., OLIVEIRA, M. L., & CUNHA, R. V. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.1, p.83-94. 2010. doi:10.5123/S2176-62232010000300012.

OLIVEIRA, J. F. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.43, p.188-193. 2010

ORGANIZATION, W. H. Leishmaniasis Bulletin. Em W. H. Organization, *Leishmaniasis* V. 81. 2010.

PEREIRA, I. d., SACRAMENTO, L. V., & MARQUES, M. J. LEISHMANIOSES: “ESTADO DA ARTE”. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, 9, 220-238. 2011. Fonte: <http://dx.doi.org/10.5892/RUVRV.91.220238>

PIMENTA, P. F., FREITAS, V. C., & NÁGILA. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. Em I. N. Molecular, *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular* p. 1 - 45. 2012.

PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., REAL, G. D., & RUITENBERG, J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infection and immunity*, v. 62, p.229-235. 1994.

PODINOVSKAIA, M., & DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage:. *Futures Microbiology*, v.10, p. 111-129. 2015. doi:10.2217/FMB.14.1032015.

QUEIROZ, N. M., ASSIS, J. d., OLIVEIRA, T. M., MACHADO, R. Z., NUNES, C. M., & Starke-BUZETTI, W. A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Revista Brasileira de Veterinária de Jaboticabal*, v.19, p.32-38. 2010.

QUINNELL, R. J., & COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, v.136, p. 1915-1934. 2009 doi:10.1017/S0031182009991156.

RANGEL, E., & VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, v.24, p.2948-2952. 2008.

READY, P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Review of Entomology*, 58, 227 - 250, 2013.

REITHINGER, R., & DUJARDIN, J.-C. (Janeiro de 2007). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of microbiology*, v.45, p.21 - 25. 2007. doi:10.1128/JCM.02029-06.

REY., L. *Bases da Parasitologia Médica*, 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2014.

RIBEIRO, J. Vector salivation and parasite transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82, 1-3 1987.

ROGERS, M. B. *Leishmania* Manipulation of Sand Fly Feeding Behavior Results in Enhanced Transmission. *Plos Pathogens*, 3, 818-825, 2007.

ROMERO, G. A. (2016). O controle de Leishmaniose Visceral no. *Caderno de Saúde Pública*, v.32, p.1-3. doi:10.1590/0102-311XCO010616.

ROMERO, G. A., & BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS Neglected tropical disease*, v.4, e 584. 2010. doi:10.1371/journal.pntd.0000584.

SANCHES, L. D., MARTINE, C. C., NAKAMURA, A. A., SANTIAGO, M. E., LIMA, B. D., & LIMA, V. M. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.25, p.465-469. 2016. doi:10.1590/s1984-29612016071

SANT'ANNA, M. R., NASCIMENTO, A., ALEXANDRE, B., DILGE, E., CAVALCANTE, R. R., DIAZ-ALBITER, H., DILLON, J. J. Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasites & Vectors*, v. 3, p. 1-11. 2010. doi:10.1186/1756-3305-3-3.

SIDERIS, V., PAPADOULOU, G., DOTSIK, E., & KARAGOUNI, E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *European Journal of Epidemiology*, v.15, p.271-276. 1999.

SOLANDO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISE, M., FERRER, L., BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine Leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v.165, p.1-18. 2009. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022

SOUZA, N. P., ALMEIDA, A. d., FREITAS, T. P., Regina Celia Rodrigues da PAZ, V. D., NAKAZATO, L., & SOUZA, V. R. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.443, p. 333-335. 2010.

TSOKANA, C. N., ATHANASIOU, L. V., VALIALIAKOS, G., SPYROU, V., MANOLAKOU, K., & BILLINIS, C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. Em D. CLABORN, & D. Claborn (Ed.), *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment* p. 161-193. InTech. 2014.

WALKER, D. M., OGHUMU, S., GUPTA, G., MCGWIRE, B. S., DRREW, M. E., & SATOSKAR, A. R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.71, p.1245-1263. 2014. doi:10.1007/s00018-013-1491-1.

WERNECK, G. L. geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Caderno de Saúde Pública*, v.24, p.2937-2940. 2008.

XAVIER, S. C., ANDRADE, H. M., MONTE, S. J., CHIARELLI, I. M., LIMA, W. G., MICHALICK, M. S., TAFURI, W. L. Comparasion of paraffin-embedded skin biopsies from diferent anatomic Regions as sampling methods for detections of *Leishmania* infection in dogs using histological Immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research*, v. 2, p.1-7. 2006. doi:10.1186/1746-6148-2-17.