

Universidade Santo Amaro
Programa de Pós-graduação Stricto Sensu
Mestrado em Medicina Veterinária

Roberta Carvalho de Freitas e Azevedo

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE LEISHMANIOSE
CANINA E ISOLAMENTO DE PARASITAS DO GÊNERO *LEISHMANIA*
EM CÃES DO MUNICÍPIO DE SÃO BERNARDO DO CAMPO, SÃO
PAULO.**

São Paulo - SP
2019

Roberta Carvalho de Freitas e Azevedo

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE LEISHMANIOSE
CANINA E ISOLAMENTO DE PARASITAS DO GÊNERO *LEISHMANIA*
EM CÃES DO MUNICÍPIO DE SÃO BERNARDO DO CAMPO, SÃO
PAULO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina e Bem-Estar Animal.
Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili

**São Paulo - SP
2019**

Roberta Carvalho de Freitas e Azevedo

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE LEISHMANIOSE
CANINA E ISOLAMENTO DE PARASITAS DO GÊNERO *LEISHMANIA*
EM CÃES DO MUNICÍPIO DE SÃO BERNARDO DO CAMPO, SÃO
PAULO.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina e Bem-Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

São Paulo, 04 de Dezembro de 2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Arlei Marcili

Prof. Dr. Jonas Moraes Filho

Profa. Dra. Renata Tonholoso

Conceito final: _____

UNISA

Universidade Santo Amaro

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER N.19/2018

Projeto de Pesquisa: " **Diagnostico sorológico e molecular de Leishmaniose canina e isolamento de parasitas do gênero Leishmania em cães do município de São Bernardo do Campo, São Paulo.**".

Pesquisador Responsável: Prof. Arlei Marcili
Roberta Carvalho de Freitas e Azevedo

Curso: Medicina Veterinária

Prezado Pesquisador:

Após a análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, deliberando pela **aprovação** do projeto " **Diagnostico sorológico e molecular de Leishmaniose canina e isolamento de parasitas do gênero Leishmania em cães do município de São Bernardo do Campo, São Paulo.**".

São Paulo, 25 de outubro de 2018.



PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONOFRIO

Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA
UNISA - Universidade Santo Amaro

**DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS
CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS – DBCA
CONCEA**

5.2.9. Relatório de projetos ou protocolos

5.2.9.1. O responsável pelo projeto ou protocolo encaminhará à CEUA, ao final do estudo, um relatório de uso de animais. O relatório deverá conter informações básicas acerca do projeto ou protocolo baseando-se nos itens descritos no Anexo I (Formulário Unificado para Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Ensino e/ou Pesquisa) da Resolução Normativa nº 04 do CONCEA, de 18 de abril de 2012.

VI. RESPONSABILIDADES DOS PESQUISADORES E PROFESSORES

VII. GERAIS

6.1.1. Pesquisadores e professores são responsáveis por todas as questões relacionadas ao bem-estar dos animais utilizados e devem agir de acordo com as exigências desta Diretriz. Essa responsabilidade se inicia quando os animais são alocados para uso em um projeto e se finaliza com término do mesmo.

6.1.2. Para garantir o bem-estar dos animais utilizados, os usuários de animais (pesquisadores, professores, alunos e técnicos) devem assegurar que a qualidade da supervisão do pessoal envolvido no cuidado e manejo dos animais usados esteja de acordo com a responsabilidade e com o nível de competência do pessoal.

6.1.3. Antes do início de qualquer atividade científica ou didática envolvendo o uso de animais, os pesquisadores e professores devem enviar uma proposta à CEUA indicando que o planejamento do projeto ou protocolo se encontra de acordo com esta Diretriz, com a Lei nº 11.794 e seus instrumentos de regulamentação.

6.1.4. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos não podem iniciar atividade científica ou didática envolvendo o uso de animais antes de obter a aprovação por escrito da CEUA, cumprindo todas as exigências solicitadas por esta.

6.1.5. Ao solicitar a aprovação para uma proposta, usuários de animais (pesquisadores, professores, alunos, técnicos) devem informar à respectiva CEUA sobre outras Instituições científicas ou didáticas participantes do projeto ou protocolo.

6.1.6. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos envolvidos em projetos com animais devem disponibilizar meios para que possam ser contatados em casos de emergência.

6.1.7. Os pesquisadores e professores devem garantir que a escolha da espécie animal a ser utilizada encontra-se apropriada ao fim científico ou didático. Devem ser observadas as condições de padrão genético, a ausência de patógenos específicos, a documentação de padrão sanitário, os históricos nutricionais e ambientais, e outros fatores relevantes.

6.1.8. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos devem registrar e manter todas as informações sobre o uso e o monitoramento de animais usados para fins científicos ou didáticos. Os registros devem, sempre que possível, incluir a origem e o destino dos animais, o tempo de permanência dos animais no projeto, os procedimentos realizados, o manejo dos animais e as medidas para promoção do bem-estar animal durante seu período em experimentação.

6.1.9. A aprovação da CEUA é obrigatória quando animais são utilizados para adquirir, desenvolver ou demonstrar conhecimentos e técnicas para fins científicos ou didáticos.

6.1.10. Quando animais de produção, domésticos ou de companhia forem utilizados para fins científicos ou didáticos e seus proprietários (ou terceiros) tiverem a responsabilidade pelo tratamento e cuidados diários, a descrição dessas responsabilidades do pesquisador ou professor, assim como as do proprietário do(s) animal(is) ou terceiros devem estar claramente definidas na proposta.

6.1.11. Quando cabível deve ser anexado à proposta o Termo de Consentimento – TC, assinado pelos responsáveis.

6.1.12. Nos casos em que cadáveres ou parte deles sejam oriundos de animais utilizados em experimentos, o profissional responsável pelo protocolo original deverá obter aprovação prévia da CEUA. Nos casos em que cadáveres ou parte deles tenham outra origem, o profissional responsável deve informar a procedência deles à CEUA.

Para o Édio Azevedo, que sempre me incentivou a correr atrás dos meus sonhos. Sem você eu nunca estaria aqui.

“And I remember one time when I was so afraid,
Didn't think I had the courage to stand up on this stage,
Then you reached into my heart and found a melody,
And if there ever was somebody who made me believe in me
It was You!!!!”

-Garth Brooks-

Agradecimentos

O que é nosso está guardado e, não importa por qual caminho, vai chegar! Cresci ouvindo este ditado que guardo com carinho em minhas lembranças. Nada faz mais sentido para mim neste momento.

A vida dá voltas e o final nem sempre é como imaginamos. Às vezes é muito melhor do que o esperado. Ao longo desse percurso, várias pessoas surgem para nos ajudar a suportar e superar os desafios, que não costumam ser fáceis. Essas pessoas merecem ser reconhecidas.

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, por me dar a oportunidade de estar aqui e vivenciar esse momento. Obrigada pela oportunidade de um novo começo, um novo caminho, uma nova vida.

À minha família, tanto a que nasci, quanto a que me adotou ao longo dos anos, pelo amor sempre incondicional.

Ao Édio, por estar ao meu lado em todos os momentos, por sempre segurar a minha mão e sempre me incentivar a buscar os meus sonhos.

À UNISA e seus professores, que me ensinaram que ser um bom mestre não é somente dividir seu conhecimento com o próximo, mas, com amor pelo que faz, nos inspira a querer ser sempre pessoas melhores. Se, na minha vida acadêmica, eu conseguir passar 1/3 do amor que vocês me dedicaram, já serei realizada.

Aos amigos que fiz durante essa jornada e que levarei por toda a vida. Obrigada pelas palavras e gestos de carinho que me confortaram e me deram força nos momentos de fraqueza e pelas risadas nos momentos de alegria e de loucura.

Gostaria de agradecer de maneira muito especial ao Eduardo, que esteve ao meu lado desde o início dessa jornada, dividindo angústias e alegrias, e que tonou muito mais fácil percorrer todo esse caminho.

Ao pessoal do grupo de pesquisa Tryp/Leish Usp/Unisa, Andrea, David, Jaciara e Ryan. E, em especial à Giovanna, pela paciência e ajuda nas coletas e análises laboratoriais.

À Angélica, por abrir as portas da sua casa para mim, me dando acesso aos seus queridos e amados animais.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Arlei Marcili, que fez com que eu me enxergasse como uma pessoa melhor e redescobrisse o amor pela medicina veterinária e pela pesquisa que há anos estava esquecido. Sei que é clichê, mas acredito que já estava escrito que era pra ser assim, e agradeço todos os dias por isso.

A todos vocês, o meu muito obrigada. Sem vocês, esse sonho nunca teria se realizado!

Eu quase que nada sei, mas desconfio de muita coisa!
O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da
gente é coragem.
O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre
a mais, no meio da alegria, e ainda mais alegre ainda no meio da tristeza!
A vida inventa!
A gente principia as coisas, no não saber por que, e desde aí perde o
poder de continuação porque a vida é mutirão de todos, por todos
remexida e temperada.
O mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não
estão sempre iguais, ainda não foram terminadas, mas que elas vão
sempre mudando. Afinam ou desafinam. Verdade maior.
Viver é muito perigoso; e não é não. Nem sei explicar estas coisas. Um
sentir é o do sentente, mas outro é do sentidor.
O senhor saiba: eu toda a minha vida pensei por mim, sou nascido
diferente. Eu sou é eu mesmo. Diverjo de todo mundo.
Eu atravesso as coisas e no meio da travessia não vejo! Só estava era
entretido na idéia dos lugares de saída e de entrada.
A gente quer passar um rio a nado, e passa: mas vai dar na outra
banda é um ponto muito mais em baixo, bem diverso do em que
primeiro se pensou.
O real não está no início nem no fim, ele se mostra pra gente é no meio
da travessia.
Manter firme uma opinião, na vontade do homem, em um mundo
transviável tão grande, é dificultoso.
Eu quase que nada sei, mas desconfio de muita coisa!
Viver nem não é muito perigoso?
Dói sempre na gente, alguma vez, todo amor achável, que algum dia se
desprezou...
Qualquer amor já é um pouquinho de saúde, um descanso na loucura.

RESUMO

As espécies do gênero *Leishmania* parasitam mamíferos no Novo Mundo e possuem ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados. A Leishmaniose visceral é uma importante zoonose e possui canídeos silvestres e domésticos como importantes reservatórios conhecidos, e a diversidade genética de *Leishmania (l.) infantum chagasi* no Brasil ainda não é conhecida. Leishmaniose é uma doença severa com ampla distribuição geográfica e uma incidência de dois milhões de novos casos por ano. No estado de São Paulo cada vez mais vêm surgindo novos focos da doença. O que antes era restrito ao oeste do estado, hoje já está presente em cidades da região metropolitana e do litoral. Ainda não se sabe sobre a presença do protozoário na cidade de São Bernardo do Campo, que é atualmente classificada como silenciosa receptiva vulnerável pela Secretaria de Estado de Saúde de SP. O trabalho teve como objetivo a detecção sorológica e molecular de *Leishmania* spp. em cães residentes no município de São Bernardo do Campo. Foram realizadas coletas de sangue total de 81 animais em um abrigo localizado no distrito de Riacho Grande, e de aspirado de linfonodo poplíteo daqueles que apresentaram resultados positivos em qualquer dos testes diagnósticos. O diagnóstico sorológico por imunocromatografia foi realizado a partir do teste rápido DPP[®], o molecular específico para *Leishmania infantum chagasi* pela PCR utilizando-se os genes da catepsina L-like e do ITS, e o molecular para detecção de outros tripanosomatídeos pela PCR utilizando os genes V7V8 SSUrDNA. O teste sorológico das 81 amostras foi realizado imediatamente após a coleta e resultou em um total de 2 animais positivos, o que corresponde a 2,4% do total de animais. Desses animais positivos, e também de um terceiro animal que teve anteriormente um diagnóstico positivo de leishmaniose, foi realizada PAAF de linfonodo poplíteo e colocada em meio de cultivo, não ocorrendo nenhum crescimento parasitário. O diagnóstico molecular pelos genes da catepsina L-like, ITS e V7V8 SSUrDNA foram negativos para todas as amostras. O DPP[®] é reconhecido pelo MS como um teste de triagem para a leishmaniose canina, devido a sua alta sensibilidade e possibilidade de resultados positivos em infecções por outros tripanosomatídeos, o que justifica o fato de os animais terem apresentado resultados conflitantes nos diferentes métodos diagnósticos. Independente de qual seja o motivo da positividade nos exames sorológicos, os resultados obtidos demonstram que não há infecção dos animais deste estudo por *Leishmania infantum chagasi*.

Palavras-chave: leishmaniose; Trypanosomatídeos; leishmaniose canina; *Leishmania (l.) infantum chagasi*.

ABSTRACT

Species of the genus *Leishmania* parasitize mammals in the New World and have life cycles alternating between vertebrates and invertebrates. Visceral leishmaniasis is an important zoonosis and has wild and domestic canids as known hosts, and the genetic diversity of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Brazil is yet unknown. Leishmaniasis is a severe disease with wide geographical distribution and an incidence of two million cases per year. In the state of São Paulo, new outbreaks of the disease are increasingly emerging. What was once restricted to the west of the state is now present in cities in the metropolitan region and along its coast. The presence of protozoan in the city of São Bernardo do Campo hasn't been reported yet and the city is currently classified as vulnerable receptive silent by the Department of Health of the state of São Paulo. The objective of this work was the serological and molecular detection of *Leishmania* spp. in dogs in the municipality of São Bernardo do Campo. Whole blood was collected from 81 animals from a shelter located in Riacho Grande district and from popliteal lymph node aspirate from those who tested positive in any of the diagnostic tests. Serological diagnosis by immunochromatography was performed using the DPP[®] rapid test, the specific molecular for *Leishmania infantum chagasi* by PCR using the cathepsin L-like and ITS genes, and the molecular for detection of other trypanosomatids by PCR using the genes V7V8 SSUrDNA. Serological testing of the 81 samples was performed immediately after collection and resulted in a total of 2 positive animals, corresponding to 2.4% of the total animals. From these positive animals, and also from a third animal that had previously been positively diagnosed with leishmaniasis, popliteal lymph node FNA was placed in breeding ground with no parasitic growth occurring. Molecular diagnosis by cathepsin L-like, ITS and V7V8 SSUrDNA genes were negative for all samples. DPP[®] is recognized by the Brazilian Ministry of Health as a screening test for canine leishmaniasis, due to its high sensitivity and the possibility of positive results in infections by other trypanosomatids, which justifies the fact that the animals presented conflicting results in different diagnostic methods. Regardless of the reason for the positive results in the serological tests, the results show that there is no infection of the animals of this study by *Leishmania infantum chagasi*.

Keywords: leishmaniasis; Trypanosoma; canine leishmaniasis; dogs, *Leishmania (L.) infantum chagasi*

Lista de Figuras

Figura 1 – Disseminação da leishmaniose através dos anos.....	26
Figura 2 – Evolução da leishmaniose no estado de São Paulo.....	27
Figura 3 – Região Metropolitana de São Paulo.....	30
Figura 4 –Municípios componentes da Região Metropolitana de São Paulo.	30
Figura 5 – Plano Diretor do município de São Bernardo do Campo – SP.....	31
Figura 6 – Localização do abrigo.....	32
Figura 7 – Abrigos dos animais.....	32
Figura 8 – Filhotes de gatos que estavam no abrigo no dia da coleta.....	33
Figura 9 – Fluxograma de Pesquisa.....	34
Figura 10 – Exames sorológicos.....	37
Figura 11 – Gel de Eletroforese.....	38
Figura 12 – Cão participante da pesquisa.....	39

Lista de abreviaturas

B	Inferência Bayesiana
BAB	Blood Agar Base
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPP	Dual Path Plataforma
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (enzime-linked immunosorbent assay)
gGAPDH	Proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
gp63	Proteína de Superfície 63
HSP	Heat Shock Protein
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ITS	Espaçadores Ribossomais Internos (internal transcribed spacer)
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
Lu	Lutzomyia
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MP	Máxima Parcimônia
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação da Cadeia de Polimerase (Polimerase Chain Reaction)
RIFI	Reação de imunofluorescência
RPMI	Meio de cultura L-Anil-L-Glutamina
SRD	Sem Raça Definida
SSUrRNA	Ácido Desoxirribonucleico da Pequena Unidade Ribossomal (Small Subunit Ribossomal Ribonucleic Acid)
TH	Linfócitos T Helper
TNF	Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis FaCtor)

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 História da leishmaniose e epidemiologia.....	14
1.2 Tripanosomatídeos.....	16
1.2.1 Leishmanias	17
1.2.1.1 Leishmaniose tegumentar americana	17
1.2.1.2 Leishmaniose visceral (calazar).....	18
1.3 Vetores.....	19
1.4 Imunologia e patogenia da doença	20
1.5 Sinais clínicos.....	22
1.6 Métodos diagnósticos	24
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Considerações Éticas	29
4.2 Área de estudo e obtenção das amostras	30
4.3 Triagem sorológica.....	35
4.4 Extração de DNA.....	35
4.5 Marcadores moleculares para diagnóstico	35
4.6 Isolamento e manutenção de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	36
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 História da leishmaniose e epidemiologia

A leishmaniose, em todas as suas formas, é uma zoonose considerada uma das mais negligenciadas entre as doenças tropicais em todo o mundo. É a segunda doença parasitária com maior taxa de letalidade, perdendo somente para a malária, e está presente em 98 países de todos os continentes, com exceção da Oceania (WHO, 2019a).

Em 2017, 94% de todos os casos informados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2019b). Nesse mesmo ano, aproximadamente 35% dos casos de leishmaniose cutâneas e 96% dos casos de leishmaniose visceral ocorridos nas Américas e reportados à Organização Pan-Americana da Saúde (SisLeish – OPAS/OMS, 2019) ocorreram no Brasil (OPAS, 2019).

O primeiro relato que se tem de leishmaniose visceral (LV) no Brasil foi realizado em 1934, quando em cortes histológicos feitos em fígados de pessoas que supostamente haviam morrido de febre amarela foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* spp. (PENA, 1934). Em 1936 ocorreu o primeiro diagnóstico realizado em uma pessoa viva, feito por Evandro Chagas em um jovem de 16 anos na cidade de Aracaju, Sergipe (CHAGAS et al., 1937; CHAGAS, 1936).

O primeiro surto da doença ocorrido no país foi em 1953, em Sobral, no Ceará, e atingiu aproximadamente 100 pessoas (DEANE, 1956), o que levou o governo a instaurar uma campanha para estudo e também conscientização da população sobre a doença, que durou até o início da década de 1970 (SILVA, 1957).

A partir da década de 1980, a leishmaniose teve uma mudança no seu perfil como doença. Antes restrita aos espaços rurais do Norte e Nordeste, seguiu para outras regiões, atingindo a periferia dos grandes centros urbanos brasileiros (BRASIL, 2000).

Desse modo, o Brasil vem desde a década de 1980 sofrendo um processo de expansão no número de casos de LV humana em área urbana associados à grande presença de cães positivos, em especial nas cidades de médio e grande porte. Essa

expansão se deve à mudança da estrutura agrária brasileira que ocorreu ao longo dessas décadas, intensificando-se após o surgimento de epidemias importantes em várias cidades do Nordeste brasileiro. O ciclo de transmissão, antes rural e silvestre, tornou-se também urbano (GONTIJO; MELO, 2019).

Atualmente, o Brasil é um dos 65 países mais afetados pela LV, merecendo destaque pela alta disseminação da doença por quase todas as regiões do seu território. Dessa maneira, a LV é uma doença de elevada importância para a saúde pública brasileira, apresentando uma alta taxa de letalidade, em especial quando associada a quadros de infecções e má nutrição (GONTIJO; MELO, 2019; MATSUMOTO; DA LIMA; CASAGRANDE, 2013; BRASIL, 2000).

O primeiro caso de leishmaniose no estado de São Paulo, com suspeita de ser autóctone, ocorreu no município de Diadema, em 1978. Nesse caso houve uma extensa investigação que acabou não encontrando cães infectados nem a presença de flebotomíneos na região (IVERSON et al., 1982). Desde então, diversos estudos foram feitos procurando encontrar possíveis vetores da doença em áreas urbanas, sendo o primeiro registro feito em Araçatuba (DA COSTA et al., 1997). Já no ano seguinte, 1998, foram identificados cães positivos, por meio de exame parasitológico direto que constatou a presença de *Leishmania* sp. em esfregaços de aspirado de linfonodos caninos. Esse achado desencadeou uma pesquisa epidemiológica que culminou com a identificação de um caso de transmissão autóctone no estado de São Paulo em 1999, sendo esse o primeiro caso confirmado de leishmaniose humana no estado paulista (CAMARGO-NEVES; KATZ, 1999; GALIMBERTTI et al., 1999).

Estudos recentes sobre a Leishmaniose no estado de São Paulo demonstram que a doença vem se disseminando no sentido oeste-leste, margeando grandes rodovias, como a Marechal Rondon, e também suas radiais, avançando para a grande São Paulo, assim como ocorreu anteriormente nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Norte e Mato Grosso do Sul nas décadas anteriores (FERRO, 2018; PAULA et. al., 2016; SÃO PAULO, 2015). Já existem casos de leishmaniose humana registrados em várias cidades da região metropolitana de São Paulo, como Embu das Artes e Cotia, assim como em cidades litorâneas do estado, como o Guarujá (SÃO PAULO, 2018), demonstrando que, mesmo sem notificações de casos animais, é possível que a doença já esteja presente em toda a grande São Paulo.

1.2 Tripanosomatídeos

O gênero *Leishmania* pertence à Família Trypanosomatidae, que compreende protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida (HONIBGERG, 1963). Os cinetoplastídeos, juntamente com os euglenoides (ordem Euglenida), formam o filo Euglenozoa (CAVALIER-SMITH, 1981, 1993, 2004). Os organismos da ordem Kinetoplastida estão divididos em duas subordens: a) Bodonina, que compreende parasitas e espécies de vida livre; b) Trypanosomatina, que apresenta apenas a família Trypanosomatidae, cujos membros são todos parasitas.

Os tripanossomatídeos apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, infectando animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens. Esses organismos, depois dos nematoides, são os eucariotos que apresentam a maior variedade de hospedeiros e distribuição geográfica (VICKERMAN, 1976; 1994; STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2004, 2006). Eles podem ser parasitas monoxênicos, onde há somente um hospedeiro, ou heteroxênicos, que completam seu ciclo em mais de um hospedeiro, sendo um invertebrado e um vertebrado ou até mesmo vegetal. Até 2017, eles eram classificados por características morfológicas e de hospedeiros, sendo distribuídos em nove gêneros.

Com o uso rotineiro de análises moleculares na construção de árvores filogenéticas, e também com o advento de novos marcadores moleculares, como os heat shock protein (hsp) e os ácidos desoxirribonucleicos de pequena unidade ribossomal (SSUrRNA), as inferências evolutivas dos tripanossomas acabaram sendo alteradas, e novos gêneros foram propostos com base na análise evolutiva. Atualmente, a família Trypanosomatidae é dividida em 19 gêneros, sendo 14 monoxênicos (*Angomononas*, *Blastocrithidia*, *Bleptomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Kentomonas*, *Leptomonas*, *Lotamaria*, *Novymonas*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Strigomononas*, *Wallaceina* e *Zelonia*) e 5 heteroxênicos (*Endotrypanum*, *Leishmania*, *Phytomonas*, *Porcisia*, *Trypanosoma*) (VOTÚPKA, 2015; KAUFER et al, 2017; LUKES et al. 2018).

1.2.1 Leishmanias

O gênero *Leishmania* é constituído por cerca de 30 espécies que infectam vertebrados de diferentes ordens (répteis e mamíferos) transmitidas por vários invertebrados hematófagos da família Psychodidae. Está distribuído em regiões de clima tropical e subtropical de todo o mundo, com exceção da Oceania (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004).

As espécies de leishmanias se apresentam sob a forma amastigota e promastigota em seus ciclos de vida. Essas formas são definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante (HOARE, 1972; WALLACE, 1979; VICKERMAN, 1994). Existem dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, e a diferença entre eles é a região do tubo digestivo, onde o parasita, na sua forma promastigota, se desenvolve no vetor até a forma metacíclica, que é a forma infectante (LAINSON; SHAW, 1987).

As leishmanioses são causadas por parasitas desse gênero e constituem um grupo de doenças com grande diversidade epidemiológica e clínica (tegumentares e viscerais). Além disso, são consideradas parasitoses de grande potencial zoonótico, sendo das doenças mais importantes na área de saúde pública em todo o mundo. (ASHFORD et al., 1992, ALVAR et al., 2012.). Na América Latina, possui ampla distribuição geográfica, sendo registrada em 11 países, com 90% de todos os casos ocorrendo no Brasil (ALVAR et al., 2012).

1.2.1.1 Leishmaniose tegumentar americana

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA), doença que engloba as leishmanioses mucosa, cutânea e mucocutânea em humanos, é causada pelas leishmanias chamadas dermatotrópicas: *L. (v) braziliensis*, *L.(v.) guyanensi*, *L. (l.) amazonensis*, *L. (v.) lainsoni*, *L. (v.) naiffi*, *L. (v.) lindenberg*, *L.(v.)shawi* . (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000, 2010).

A LTA é a que mais comumente ocorre em humanos. É caracterizada pela presença de úlceras cutâneas, com bordas elevadas e fundo granulomatoso, podendo ser únicas ou múltiplas. Uma característica importante é que essas úlceras tanto podem se curar sozinhas, quanto sofrerem metástases por via hematogena,

causando a leishmaniose cutânea difusa, forma mais rara da doença (BRASIL, 2000, 2010).

No Brasil, as 3 espécies mais importantes desse grupo são a *L.(v) guyanensi*, limitada ao norte da Amazônia e países que fazem fronteira nessa área, como as Guianas; a *L.(l.) amazonenses*, encontrada no Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do país; e a *L.(v) braziliensis*, a mais comumente diagnosticada nas infecções por todo o país (BRASIL, 2000, 2010).

1.2.1.2 Leishmaniose visceral (calazar)

As espécies causadoras da leishmaniose visceral são: *L. (l.) donovani*, em Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão; *L. (l.) infantum*, na região do Mediterrâneo (Europa e África), e *L. (l.) chagasi*, em diferentes países da América (Novo Mundo) (LAINSON, 1983).

O complexo *Leishmania donovani*, que inclui todas as espécies capazes de causar sintomatologia visceral e, em alguns casos, também tegumentar, possui ampla distribuição (Velho e Novo Mundo). Assim, para o entendimento das relações dessas diferentes espécies e suas diferentes origens geográficas, foram realizados diversos estudos empregando vários marcadores moleculares, como o espaçador interno transcrito do gene ribossômico (ITS) (MAURÍCIO et al., 2004; KUHLS et al., 2008), a proteína de superfície 63 (gp63) (MAURÍCIO et al., 2001; QUISPE TINTAYA et al., 2004), mini-exon (MAURÍCIO et al., 2004), cisteíno proteases (QUISPE TINTAYA et al., 2004), citocromo oxidase II (IBRAHIN et al., 2001) e microssatélites (KUHLS et al., 2007; LUKES et al., 2007).

Esses estudos demonstram uma clara associação das espécies do complexo *Leishmania donovani* com a origem geográfica dos isolados, mas não possibilitavam a separação de *L. infantum* e *L. chagasi*. Estudo recente baseado em relações filogenéticas dos genes SSUrDNA e de proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) com diversos isolados brasileiros e europeus possibilitou a separação de *L. i. chagasi* de *L. infantum* e sugere um evento recente de introdução, provavelmente no processo de colonização, de *L. infantum* no Novo Mundo por meio dos valores de divergência dessas sequências e história evolutiva de seus hospedeiros vertebrados (MARCILI et al., 2014). Tal fato contrasta com o

cenário de introdução mais antiga com *L. chagasi* sendo uma espécie nativa das Américas (LAINSON; SHAW, 1978).

Dentre os hospedeiros vertebrados, destacam-se o homem e os cães domésticos, que são considerados o principal reservatório urbano. Os principais reservatórios silvestres são canídeos (DEANE; DEANE, 1954; DEANE; DEANE, 1955; ALENCAR, 1961; LAINSON et al., 1969; COURTENAY et al., 2002; LAINSON, RANGEL, 2005; FIGUEIREDO et al., 2008), felinos (SAVANI et al., 2004; DAHROUG et al., 2010), roedores (LAINSON; RANGEL, 2005), marsupiais do gênero *Didelphis* (TRAVI et al., 1994; LAINSON; RANGEL, 2005) e morcegos (LIMA et al., 2008).

No Brasil, a leishmaniose visceral, tanto humana, quanto canina, tem como agente etiológico a *Leishmania infantum chagasi*, e o principal responsável pela sua transmissão é o flebótomo *Lutzomyia longipalpis*. Há, também, relatos da presença do protozoário em outros artrópodes, porém sem comprovação da capacidade vetorial desses artrópodes (COELHO et al., 2017; VIOL et al., 2016).

1.3 Vetores

A *leishmania* spp. tem como seu principal vetor insetos dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo o principal representante no Brasil o *Lutzomyia longipalpis*. São pequenos (2 a 3 mm), têm o corpo recoberto por cerdas, de colocação clara, sempre pousam com as asas em pé e entreabertas, o que os fazem ser popularmente conhecidos como mosquito-palha (BRASIL, 2014). Somente as fêmeas são hematófagas e são atraídas por odores e temperatura corporal, preferindo se alimentar nos períodos de menor insolação, como início da manhã e final da tarde (BRASIL, 2014). Existem cerca de 1000 espécies documentadas de flebotomíneos em todo o mundo, sendo que, até 2002, 20 eram comprovadamente capazes de transmitir a *Leishmania* sp. (GALLATI, 2003).

O primeiro registro do vetor *Lutzomyia longipalpis* no Brasil ocorreu na Serra da Mantiqueira, São Paulo, na década de 1970. (FORATTINI et al, 1970). Desde então, diversos estudos vêm sendo conduzidos buscando identificar possíveis vetores presentes nas regiões metropolitanas de várias cidades.

Com os casos cada vez mais frequentes da doença em regiões onde não foi encontrada a presença do *Lu. longipalpis*, outros flebotomíneos começaram a ser pesquisados como possíveis vetores. Em 2010, encontrou-se no Maranhão um exemplar de *Migonemyia migonei* infectado com o parasita (DE CARVALHO, 2010). Na região metropolitana de São Paulo, o *Pintomyia fischeri* vem sendo estudado como possível vetor da doença, visto que não foi encontrado o *Lu. longipalpis* nem na capital, nem em nenhuma das cidades da região onde se registraram casos da doença (GALVIS-OVALLOS, 2017).

Na capital paulista, já foram identificadas 5 diferentes espécies de flebotomos: *Psychodopygus lloydi*, *Pintomyia fischeri*, *Lutzomyia amarali*, *Nyssomyia whitmani* e *Migonemyia migonei*, sendo as 3 últimas antropofílicas, com possibilidade de estarem envolvidas no ciclo biológico da leishmaniose (LAVITSCHKA et al., 2018). Já Costa (2016), encontrou na região da Serra do Itapetinga exemplares dessas mesmas espécies naturalmente infectados com *Leishmanias* spp, demonstrando a necessidade de uma maior vigilância dessas espécies para a transmissão da Leishmaniose, e não somente do *Lu.longipalpis*.

Outros estudos demonstram que os flebotomíneos estão se adaptando cada vez mais às cidades devido tanto à expansão urbana desordenada, quanto ao desmatamento cada vez maior (BRAZIL, 2013; COELHO, 2017). Foram realizadas coletas intra e peridomiciliares e em região de mata que faz divisa com as residências, tendo sido o número de espécimes capturados intradomiciliar maior que os capturados em área de mata (COELHO, 2017).

1.4 Imunologia e patogenia da doença

Qualquer ser vivo tem mecanismos de defesa contra agentes externos. Nas patologias infecciosas, normalmente a doença ocorre ou pela reação do hospedeiro à infecção, ou porque o agente infectante altera de alguma maneira o metabolismo do hospedeiro. Os sintomas clínicos representam a exteriorização desses mecanismos de defesa, que são celulares ou humorais (NASCIMENTO et al., 2017; STANLEY; ENGWERDA, 2007; SOUZA, et al., 2013).

A resposta imune do hospedeiro contra parasitos intracelulares determina qual individuo terá uma pequena inflamação local autolimitante e qual desenvolverá a doença de forma sistêmica (NASCIMENTO et al., 2016). A patogênese da leishmaniose começa com a internalização dos promastigotas inoculados pelas fêmeas das moscas durante o repasto sanguíneo pelos macrófagos do hospedeiro. Os parasitas de *Leishmania* são capazes de usar diferentes componentes dos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro para evitar sua eliminação antes que uma infecção seja estabelecida, como a inibição das funções dos macrófagos, principalmente da sua atividade oxidativa (SOUZA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2016). Desse modo, os parasitas conseguem sobreviver e, na sua forma amastigota, começam a se replicar continuamente até a ruptura da célula hospedeira, causando assim a propagação da doença (NASCIMENTO, 2015, 2016).

A definição do tipo de resposta imune a um antígeno depende da produção de linfócitos T de tipos diferentes, entre eles os T helper CD4+, CD8+, Th1, Th2 e, mais recentemente descobertos, os Th17 (SANTIAGO, 2011; SOUZA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015). Cada um dos tipos de T helper produz diferentes citocinas. As células Th1 secretam, entre outras, TNF- α IFN- γ , IL-2 e IL-12; as Th2, IL-4 IL-5, IL-10; e as Th17, principalmente IL17 (SANTOS et al., 2007; SOUZA et al., 2013).

Cabe mencionar, também, a existência de um controle antagônico entre essas citocinas, em que o aumento da concentração de IL-10 é capaz de suprimir a produção de IL-12 e IFN- γ (SANTIAGO, 2011; SANTOS et al., 2007). A presença do parasita nas células mononucleares do hospedeiro modula uma resposta Th2, e não Th1, diminuindo a atividade citotóxica dos macrófagos com aumento da resposta humoral.

A infecção por leishmanias induz a produção de citocinas pelas células infectadas, provocando o recrutamento celular local e a diferenciação celular. O perfil de resposta compreende também a imunidade adaptativa. Assim, na estimulação de linfócitos CD4+ do tipo Th1, há produção de IL-1, IL-2, IL-12, INF- γ , e TNF- α para promover a ativação do macrófago e a eliminação do parasita pela produção de óxido nítrico (CAJUEIRO et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2016; SANTANA et al., 2017).

A resposta imune contra *Leishmania* spp. é mediada por IFN- γ , que, por meio das células Th1, ativam os macrófagos para produzir óxido nítrico. Junto ao IFN- γ , a

IL-17 é uma das citocinas que ativam a proteção contra a leishmaniose. Por outro lado, as citocinas produzidas pelas células Th2 facilitam o desenvolvimento da doença (NASCIMENTO et al., 2016).

Nascimento et al. (2015), em seu estudo com camundongos experimentalmente infectados com *L.infantum chagasi*, demonstraram que, tanto “*in vitro*”, quanto “*in vivo*” o parasito é capaz de induzir resposta imune adaptativa do tipo Th17. No mesmo trabalho, foi avaliado o papel do Th17 e da IL-17 na infecção pela leishmaniose, e chegou-se à conclusão de que o padrão Th17 tem função protetora contra a leishmaniose visceral, tanto pela modulação negativa da produção de IL-10, quanto pela potencialização da produção de óxido nítrico pelos macrófagos, junto ao IFN- γ .

Também já se demonstrou que a IL-17 é um potente ativador de neutrófilos, além de induzir a produção de diferentes tipos de proteínas, muitas delas relacionadas à inflamação, como proteínas de resposta aguda e peptídeos antimicrobianos (SOUZA et al., 2013). Nesse sentido, já se verificou, também, que cães assintomáticos que não fazem soroconversão têm linfócitos que produzem mais IL-2, TNF- γ e IL-12, e que, quando os parasitos ficam restritos à pele e aos linfonodos, em 90% dos casos ocorre remissão espontânea (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; MAIA; CAMPINO, 2015; STANLEY; ENGWERDA, 2007).

A cura clínica ocorre quando os macrófagos, mediados por linfócitos Th1, são ativados para um estado leishmanicida, caracterizado pela apresentação de antígeno às células dendríticas, além da produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-12, IFN- γ e TNF- α . A presença das citocinas de padrão Th2, como a IL-10, desativa os macrófagos e estimula a resposta imune humoral, com produção de anticorpos que, no caso da leishmaniose, não têm boa relação com a melhora clínica do animal (CARMO; KATZ; BARBIERI, 2010; PORTES et al., 2016; LOURENÇO, 2015).

1.5 Sinais clínicos em canídeos

Os grupos de estudos de leishmaniose, tanto internacionais quanto brasileiros, sugerem que nem todo cão que está infectado com a leishmania se encontra efetivamente doente (SOLANO-GALEGO et al., 2011; BRASILLEISH,

2018). Por outro lado, sabe-se que unicamente a presença do parasita no animal, seja na corrente sanguínea, seja na pele, já é suficiente para infectar os vetores, de modo que os animais considerados assintomáticos desempenham um papel importante no ciclo da leishmaniose (FRAGA et al., 2016; ESTEVA et al., 2017).

Os cães podem ser classificados como expostos, infectados ou doentes, de acordo com as características físicas e também achados laboratoriais de cada animal. Os *guidelines* atualmente existentes classificam os animais de duas maneiras diferentes: como infectado mas não doente, quando há a confirmação da infecção, contudo o animal se encontra sem alterações clínicas e laboratoriais; ou doentes, divididos em 4 estágios de acordo com as anormalidades encontradas (SOLANO-GALEGO et al, 2011); ou ainda como, sadio exposto, quando a sorologia é positiva com títulos baixos e não há nenhum outro sintoma; infectado sadio, quando, além da sorologia, há a positividade em testes parasitológicos ou moleculares mas o animal continua sem sintomatologia clínica; e infectado doente, quando há a positividade em qualquer um dos testes e o animal apresenta alterações clínicas ou laboratoriais (BRASILEISH, 2018).

Já existem trabalhos que demonstram que, mesmo em cães aparentemente saudáveis, há alterações laboratoriais e também microscópicas na pele, o que sugere que o termo animal assintomático não seja o mais correto a ser utilizado (DANTAS-TORRES, OTRANTO 2014). Do mesmo modo, já foi comprovado que o número de sinais clínicos e sintomas apresentados pelos animais é inversamente proporcional à sua capacidade de infectar o vetor flebotômico, o que leva à importância de manter sempre o uso de repelentes e outras estratégias de controle, mesmo que os cães estejam aparentemente normais (LAURENTI et al., 2013).

Toda a sintomatologia clínica da leishmaniose canina é determinada por vários fatores, como a resposta imune e a imunocompetência do animal, a carga parasitária, a genética e até mesmo fatores ambientais (RIBEIRO et al. 2018). Sendo assim, alguns cães são capazes de combater a infecção, enquanto outros mantêm a doença de forma subclínica por anos, sem sinais clínicos visíveis. Alguns ainda desenvolvem a doença de várias formas diferentes, mas que normalmente evoluem para uma forma crônica e debilitante da doença, que pode levar à morte do animal (PALTRINIERI et al., 2010).

Os sinais da leishmaniose são considerados inespecíficos e podem mimetizar qualquer doença. Os mais comuns incluem lesões cutâneas (como alopecia,

dermatites descamativas e onicogribose), linfadenomegalia, perda de peso, esplenomegalia, lesões oculares (como ceratoconjuntivite seca, uveítes e blefarítes), e ainda alterações laboratoriais, como anemia não regenerativa, hiperproteïnemia, hiperglobulinemia e proteinúria (SANTIAGO, 2011; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018; SPINELLI, 2018).

1.6 Métodos diagnósticos

O diagnóstico correto da leishmaniose canina é um dos maiores desafios que se tem hoje, apesar do grande número de métodos diagnósticos existentes (SPINELLI, 2018). Para se determinar o teste a ser utilizado em cada situação, é importante saber o “status” epidemiológico da área onde se está, as vantagens e limitações de cada técnica, e como deve ser feita a interpretação do exame (BRASIL, 2014). O ideal é que o diagnóstico seja de fácil execução, que tenha resultados precisos e baixo custo (DOTTA et al., 2009).

O considerado padrão-ouro do diagnóstico é a visualização das formas amastigotas do parasito. Ela pode ser feita pela visualização em lâmina de material obtido por meio de punção de vários órgãos linfoides, como também de *imprinting* de lesões cutâneas e esfregaços sanguíneos. As dificuldades incluem a variação do parasitismo nos diferentes órgãos, bem como a necessidade de treinamento para coleta de material e principalmente leitura correta das lâminas (DOTTA et al., 2009; SPINELLI, 2018).

Os testes sorológicos são os mais utilizados tanto na rotina das clínicas particulares, quanto nos inquéritos epidemiológicos. Eles têm como principal desvantagem a possibilidade de reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae (DOTTA et al., 2009, LUCIANO et al., 2009; SPINELLI, 2018).

Os principais testes sorológicos utilizados na rotina são: reação de imunofluorescência direta (RIFI); ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA – e o teste rápido Snap® IDEXX); imunocromatografia (DPP® - Biomanguinhos –exclusivo dos serviços de saúde pública, e o teste rápido Alere®) (SPINELLI, 2018).

Como a leishmaniose pode ser considerada uma doença imunomediada (FEITOSA et al., 2000), os métodos imunológicos de diagnósticos, como a

imunohistoquímica, são altamente específicos e sensíveis para a detecção de formas amastigotas em tecidos. Tal técnica é proposta por vários autores a ser usada em combinação com as técnicas sorológicas nos inquéritos epidemiológicos, para que se possa obter uma maior sensibilidade no diagnóstico (SOLANO-GALEGO et al, 2004; XAVIER et al., 2006; QUEIROZ et al., 2010).

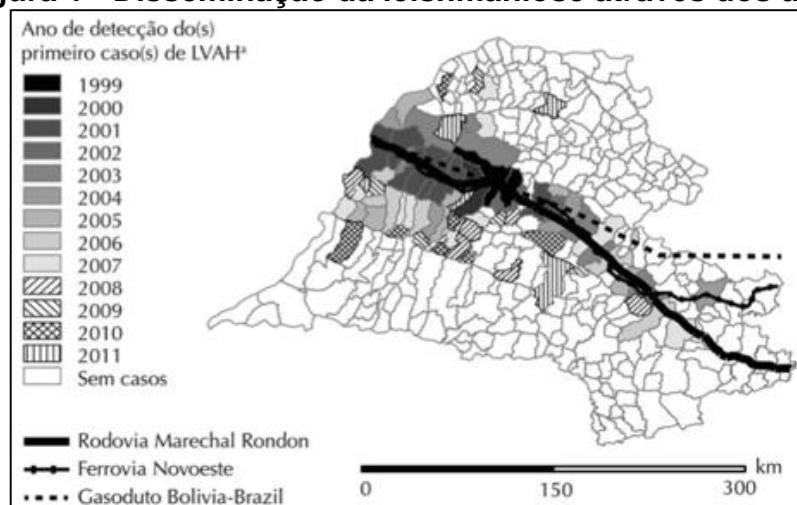
Como a mais sensível das técnicas laboratoriais, tem-se o diagnóstico molecular realizado pela reação da cadeia de polimerase – PCR. A PCR permite identificar sequências pré-determinadas do DNA do parasito e ampliar seletivamente essas sequências a partir de diversos materiais biológicos e tecidos. A especificidade dessa técnica é ligada diretamente à parte do DNA do parasito (primer) que se usou como amostra. Suas principais desvantagens são a necessidade de laboratórios modernos, com equipamentos de valores elevados, e mão de obra qualificada e bem treinada (DOTTA et al., 2009; SPINELLI, 2018; LUCIANO et al., 2009; SILVA et.al., 2019; BRASIL, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Não existem registros de casos de LVC no município paulista de São Bernardo do Campo, o que não quer dizer que não ocorra a doença na região. Por vários motivos, médicos veterinários de serviços particulares raramente fazem a notificação dos casos que atendem em seus consultórios às autoridades competentes, razão pela qual os números oficiais sobre a doença costumam ser subestimados.

Estudos recentes sobre a Leishmaniose no estado de São Paulo demonstram que a doença vem se disseminando no sentido oeste-leste, margeando grandes rodovias, como a Marechal Rondon, e também suas rodovias radiais, e que avançará para a grande São Paulo, assim como ocorreu anteriormente nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Norte e Mato Grosso do Sul (MATSUMOTO, 2019; FERRO, 2018; PAULA et. al., 2016; SÃO PAULO, 2015) (figuras. 1 e 2). Já existem casos de Leishmaniose humana registrados em várias cidades da região metropolitana de São Paulo, como Embu das Artes e Cotia, assim como em cidades litorâneas do estado, como o Guarujá (SÃO PAULO, 2018), e casos caninos inclusive dentro da própria cidade de São Paulo (COSTA, 2018), demonstrando que, mesmo sem notificações oficiais, é possível que a doença já esteja presente em toda a grande São Paulo.

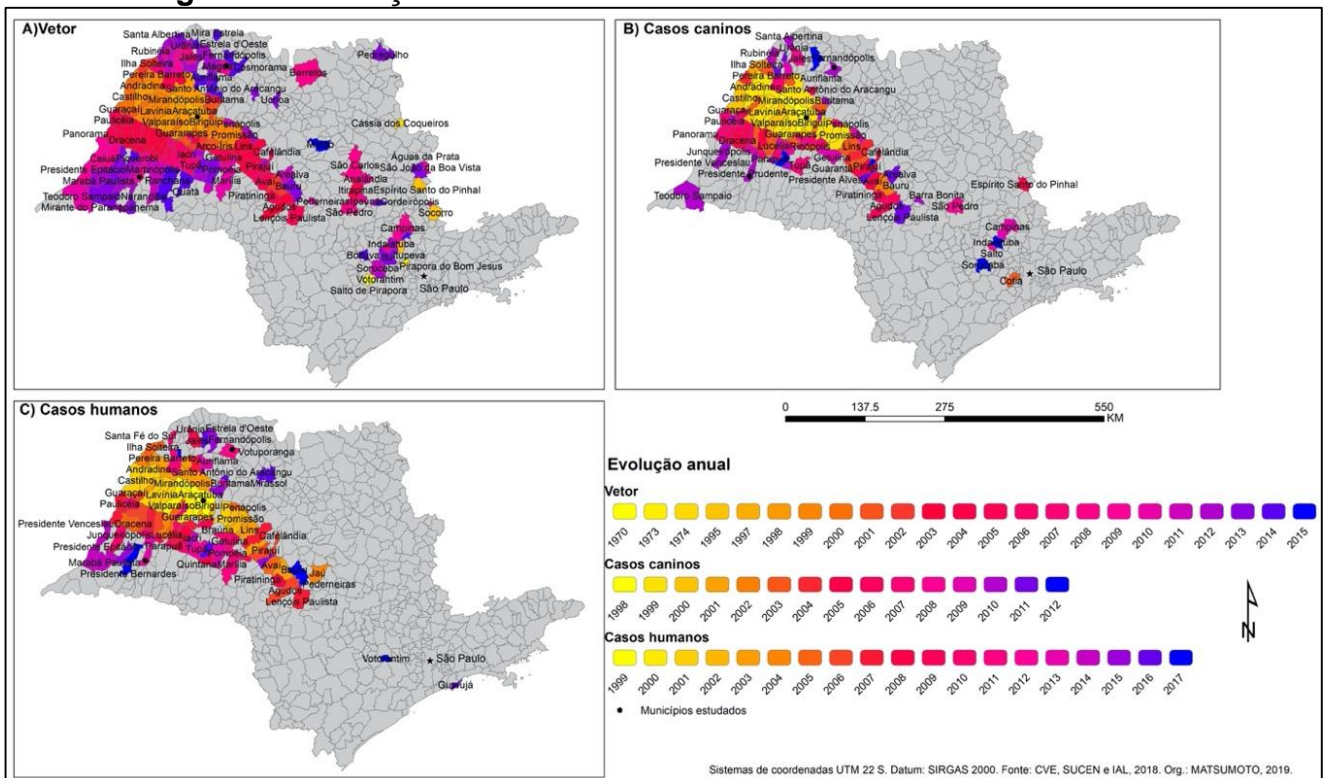
Figura 1 - Disseminação da leishmaniose através dos anos



Fonte: (REVISTA DE SAÚDE PÚBLICA, 2013).

Desse modo, torna-se cada vez mais essencial estudos que busquem identificar a presença da doença nessa região, já que, apesar de não haver casos oficialmente registrados, existe a presença do vetor e o município já é classificado como vulnerável pela Secretaria de Saúde do estado de São Paulo desde 2015 (SÃO PAULO, 2015), assim como várias outras cidades próximas. Além disso, é importante uma investigação epidemiológica antes da ocorrência de casos humanos, visando evitar que a região se torne endêmica, como ocorreu na região do oeste paulista (CARDIM et al., 2013).

Figura 2 - Evolução da leishmaniose no estado de São Paulo



Fonte: (MATSUMOTO, 2019).

3 OBJETIVOS

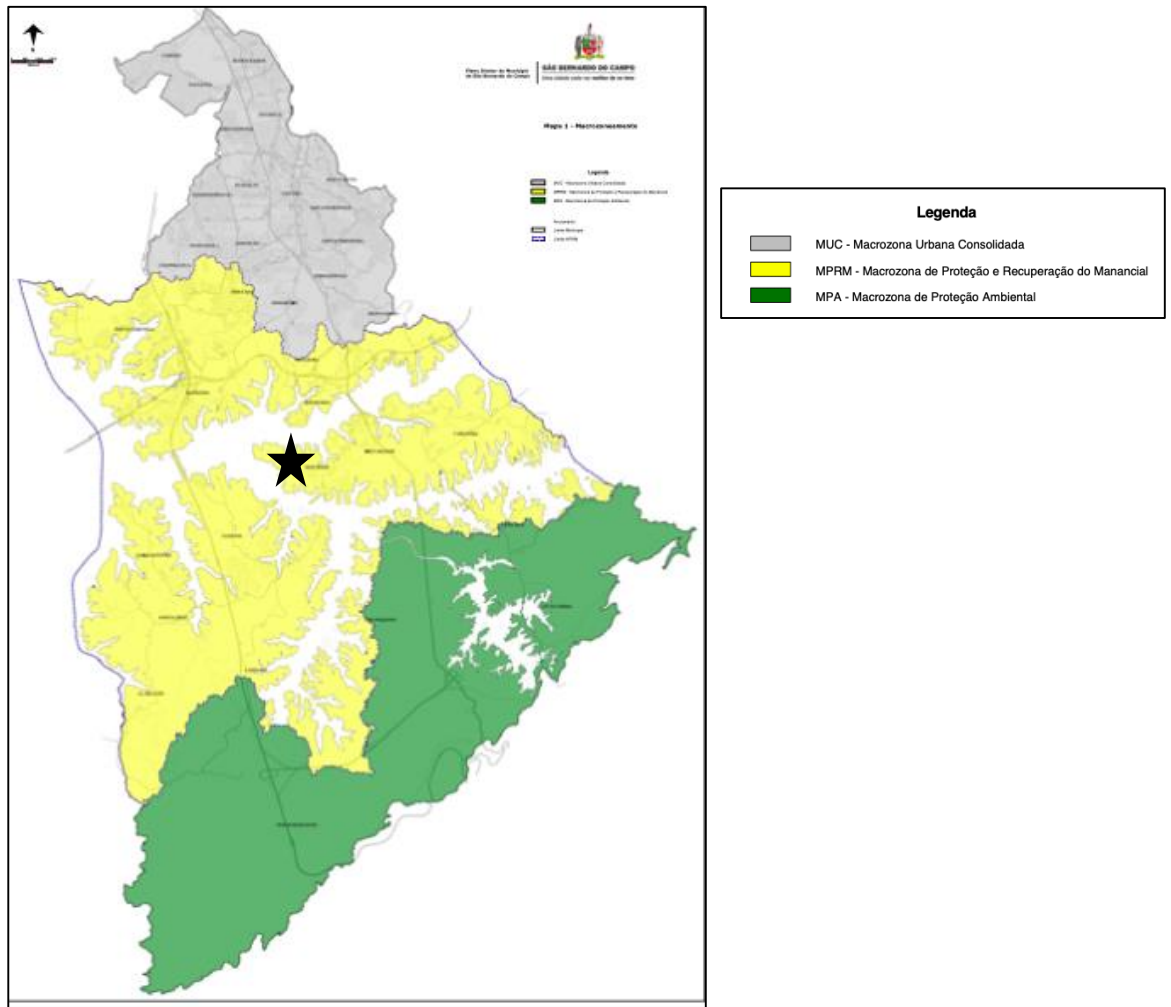
Detecção sorológica, molecular e isolamento de *Leishmania* spp. em cães residentes em um abrigo localizado no município de São Bernardo do Campo – SP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Santo Amaro – UNISA, sob o parecer nº 19/2018, na data de 25 de outubro de 2018, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo animais, conforme a Lei Federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais, e a Lei Estadual nº 11.977/05, que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo.

Figura 5 – Plano Diretor do município de São Bernardo do Campo – SP.



LEG: A estrela mostra a localização aproximada do abrigo.

Fonte: (PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO BERNARDO DO CAMPO, 2018)

Figura 6 – Localização do abrigo



LEG: Área de fragmentação de Mata Atlântica cercada pela represa Billings

Fonte: (GOOGLE MAPS, 2019).

Os abrigos são rústicos, feitos de madeira, cercados e cimentados, e toda a área destinada aos animais é cercada por mata nativa da região (figura 7).

Figura 7 – Abrigos dos animais



LEG: Abrigos rústicos cercados por Mata Atlântica fragmentada

Fonte: (PRÓPRIA AUTORA, 2019).

Outros animais, além de cães, também se encontram presentes no abrigo, como gatos e um suíno (figura 8).

Figura 8 – O Filhotes de gatos que estavam no abrigo no dia da coleta



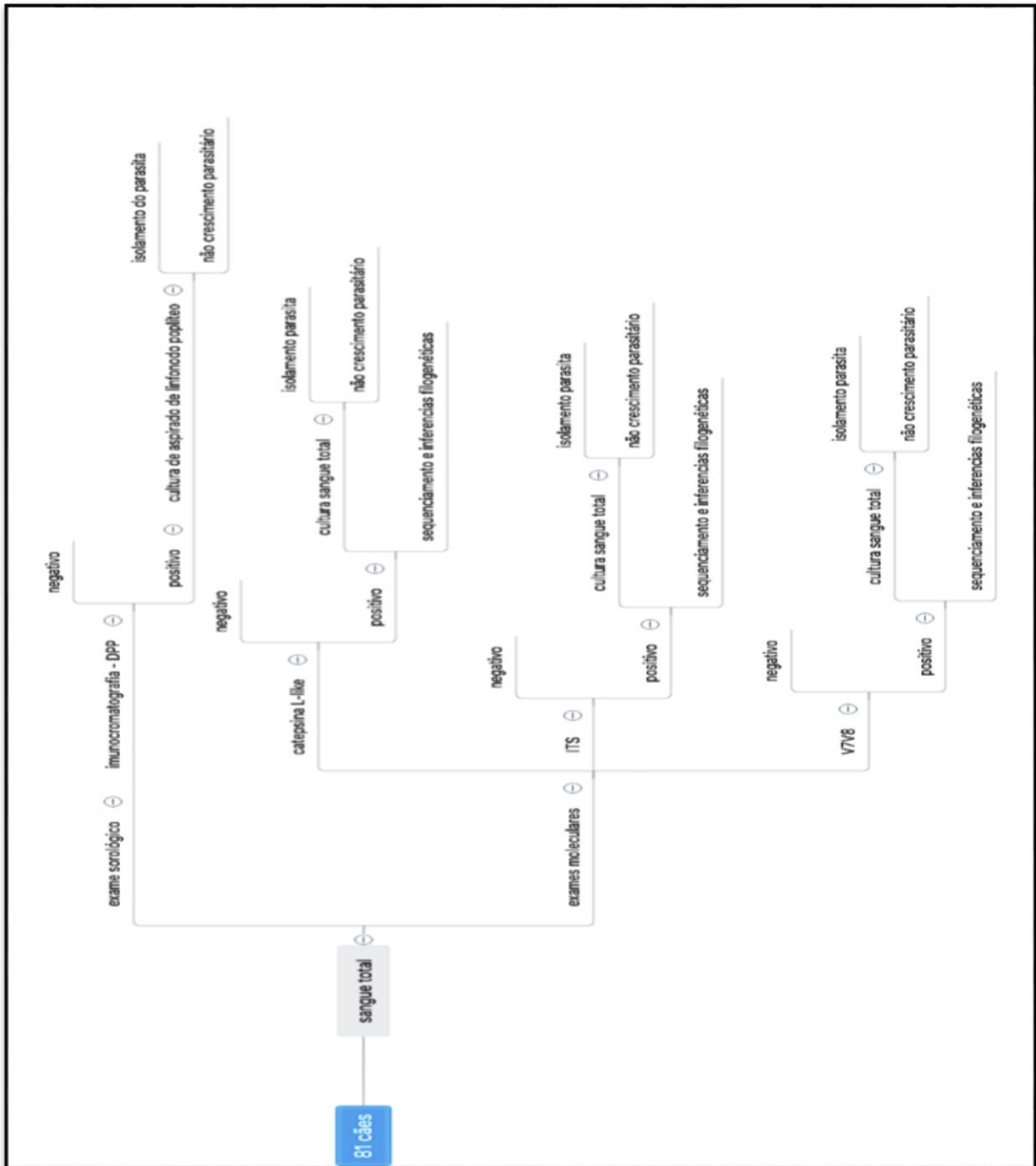
Fonte: (PRÓPRIA AUTORA, 2019).

Os cães presentes no abrigo são os mais diversos possíveis. Há animais SRD que foram abandonados em várias localidades nas proximidades; cães que já nasceram no próprio abrigo, vindos de cadelas que chegaram prenhas; animais que já foram adotados mais de uma vez e devolvidos por falta de adaptação dos tutores; e até mesmo espécies de raça pura que faziam parte de canis clandestinos ou que foram abandonados por terem nascido com deformidades ou deficiências.

Foi realizada coleta de sangue total periférico de 81 cães no dia 15 de janeiro de 2019.

Baseado nos resultados sorológicos e moleculares dos animais em que houve resultado positivo, no mesmo dia foi realizada a punção de linfonodo poplíteo por agulha fina e coleta de sangue total para a tentativa de isolamento do parasita (figura. 9)

Figura 9 – Fluxograma da pesquisa



Fonte: (PRÓPRIA AUTORA, 2019).

4.3 Triagem sorológica

O exame sorológico para triagem dos cães foi realizado com sangue total periférico, imediatamente após a coleta, pelo método de imunocromatografia, utilizando-se o Kit de diagnóstico rápido DPP[®] para Leishmaniose canina, Biomanguinhos/Fiocruz para detecção de anticorpos anti-amastigotas K9/K26/K39, segundo instruções do fabricante (figura. 9).

4.4 Extração de DNA

Para a extração do DNA, foi utilizado o kit comercial “PureLink Genomic DNA Mini Kit” (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 Marcadores moleculares para diagnóstico

Para o diagnóstico molecular específico de *Leishmania infantum chagasi*, foram usados os ensaios de PCR's utilizando os genes de Catepsina L-like (Cat-L) (SILVA et al., 2019), e do espaçador ribossomal interno (ITS 1) (SCHONIAN et al., 2003) (figura 9).

O PCR pelo gene ITS1 de rDNA está entre os mais usados comercialmente para o diagnóstico da Leishmaniose (SCHÖNIAN et al., 2010). Ele permite o diagnóstico inter e intra específico, embora reações cruzadas possam ocorrer (Graça, 2011).

A Catepsina é uma cisteíno protease responsável pelos mecanismos de defesa das leishmanias, sendo única em cada espécie, de modo que, no seu uso

para análises moleculares não ocorra reações cruzadas inter ou intra-específicas. A PCR pelo gene da Catepsina L-like usa como iniciadores as sequencias **5'GACAACGGCAACCGTCGGCGCCAAAATAAAAG 3'** como fita senso e **5' CAGTACGGCGGTTTCGCTTGTCTGTTGAAGC 3'** como fita anti-senso (SILVA, et al, 2019). Foram realizados 43 ciclos de amplificação, com as etapas de desnaturação a 94° c por 1m; anelamento a 64° c por 1 min e extensão a 72° c por 45 segundos, segundo descrito por Silva et al., 2019.

Para a detecção de outras espécies de tripanossomatídeos, foi utilizada a região V7V8 do gene de SSUrDNA, considerado o Barcode de tripanossomatídeos (MAIA DA SILVA et al., 2004) (figura 9). A caracterização dos possíveis isolados seria realizada por meio de sequências dos genes SSUrDNA e gGAPDH (MARCILI et al., 2014).

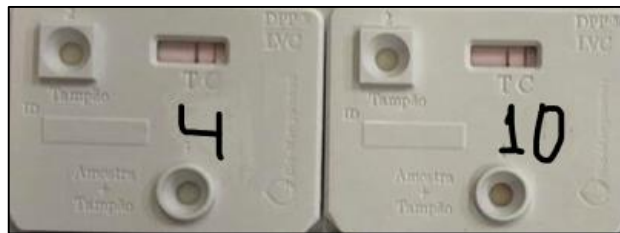
4.6 Isolamento e manutenção de parasitas do gênero *Leishmania*

Dos cães positivos no exame sorológico e/ou molecular, foi realizada a tentativa de isolamento, pela punção aspirativa por agulha fina de linfonodo poplíteo (MARCILI et al., 2014). As amostras coletadas pela punção por agulha fina foram inoculadas em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (*blood agar base*, com 15% sangue de coelho) e fase líquida de meio LIT ou RPMI (contendo soro fetal bovino e antibióticos).

5 RESULTADOS

As 81 amostras foram submetidas ao teste rápido DPP[®] distribuído pelo Ministério da Saúde. Destas, as amostras de número 4 e 10 (figura 10) tiveram resultados positivos, o que representa um total de 2,46% (2/81) das amostras.

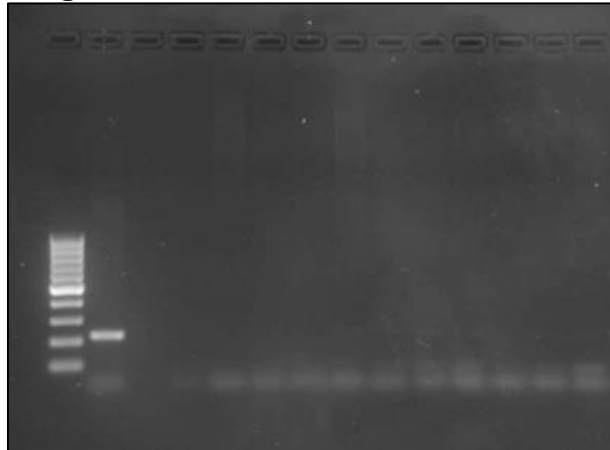
Figura 10 – Exames Sorológicos



LEG: Resultados positivos dos exames sorológicos pelo DPP[®].

Fonte: (PRÓPRIA AUTORA, 2019)

Os testes moleculares para a região de “barcode” de tripanossomatídeos (V7V8 SSUrDNA) e o gene gGAPDH foram negativos para todas as amostras. Os marcadores moleculares específicos para o diagnóstico do gênero *Leishmania* (ITS1 SSUrDNA) e para a espécie *L. infantum chagasi* (Catepsina L-like) (figura 11) também foram negativos para todas as amostras testadas.

Figura 11 – Gel de Eletroforese

LEG: Foto de catL PCR, onde banda 1= marcador de peso molecular, banda 2= controle + , banda 3= controle neg., e demais bandas as amostras testadas. Peso molecular CattL= 233Pb.

Fonte: (PRÓPRIA AUTORA, 2019).

Foi realizada a punção por agulha fina de linfonodo poplíteo dos animais que tiveram reação positiva ao teste imunocromatográfico para a tentativa de isolamento dos parasitas. Não houve crescimento parasitário nas culturas semeadas.

Além dos animais positivos na triagem sorológica, um terceiro animal com diagnóstico sorológico prévio de leishmaniose e com lesões clínicas compatíveis com leishmaniose, como onicogrifose, linfadenomegalia, dermatite esfoliativa em pina auricular e blefarite bilateral (figura 12) também foi submetido a coleta por agulha fina de linfonodo poplíteo para o isolamento do parasita e apresentou resultado negativo.

Figura 12 – Cão participante da pesquisa.



LEG: Cão participante da pesquisa apresentando sintomatologia clínica clássica de leishmaniose canina: onicogrifose, linfadenomegalia, dermatite esfoliativa em pina auricular, blefarite bilateral.

Fonte: (PRÓPRIA AUTORA, 2019)

6 DISCUSSÃO

O primeiro relato de leishmaniose humana no Brasil ocorreu em 1934, em análises histológicas feitas em fígados de pacientes que supostamente haviam falecido de febre amarela alguns anos antes (PENA, 1934). Surpreendentemente, em 30 de setembro de 2019 foi publicado um relato da descoberta de um novo parasita, encontrado após análises moleculares em pacientes que tiveram resultados positivos em provas sorológicas para leishmaniose, mas não responderam a nenhum dos tratamentos conhecidos e vieram a óbito (MARUYAMA et al., 2019). Esses casos ilustram que, mesmo passados 85 anos, o diagnóstico da leishmaniose ainda não é preciso e existe muito a ser feito nessa área.

A leishmaniose, em todas as suas formas, tanto humana quanto canina, é uma das zoonoses mais importantes hoje em todo o Brasil, devido à sua complexidade de sintomas e apresentações que dependem de uma imensidade de fatores, que envolvem a espécie de leishmânia, o vetor e o hospedeiro mamífero. (BRACHELENTE et al., 2005 ; BORJA et. al., 2016; MARTÍNEZ-ORELLANA et al., 2017; QUINNELL et al., 2003; QUILEZ et al., 2012; PEDROSO et al., 2015). Também por essa complexidade de fatores, seu diagnóstico se faz tão difícil, já que a interação parasita/hospedeiro, que engloba todo o sistema imune do animal, as comorbidades existentes, assim como fatores externos, como a saliva do flebótomo, interferem em todo o ciclo de desenvolvimento ou não na doença (LESTINOVA et al., 2017; LUZ et al., 2018; GOMES et al., 2016; DA SILVA et al., 2017; TURCHETTI et al, 2015; SANTOS-GOMES et al., 2002; MAIA, CAMPINO, 2012, WHEAT et al, 2017).

Apesar de o termo leishmania, quando colocado em sites de buscas apresentar um alto número de pesquisas recentes, elas nem sempre visam melhorar o diagnóstico, controle ou tratamento da doença, independente da espécie acometida. Esse fato corrobora a classificação da leishmaniose como doença tropical negligenciada e segunda maior causa de óbitos por doenças parasitárias em todo o mundo. (DESJEUX, 2004; GONTIJO, MELO, 2019; WHO, 2019 a,b).

O primeiro teste que realizamos foi o DPP[®], que hoje é o teste de triagem recomendado pelo Ministério da Saúde no Programa de vigilância e controle da

leishmaniose visceral, e é utilizado em inquéritos epidemiológicos oficiais em todo o país (BRASIL, 2014).

Nesse primeiro teste, o DPP[®], obtivemos dois animais positivos entre os 81 testados, o que equivale a 2,4% da população analisada. Para confirmação do nosso diagnóstico, realizamos provas moleculares por PCR utilizando diversos alvos genéticos. A catepsina L-like, que é uma cisteíno protéase responsável pelos mecanismos de defesa do parasito, e por isso extremamente importante na patogênese da doença, foi utilizada por ser extremamente específica para a *L. infantum chagasi* e também extremamente sensível (SILVA et al., 2019). Atualmente, o marcador baseado na região de ITS SSUrDNA tem sido comercialmente o mais utilizado no Brasil, de modo ser imprescindível a comparação da sua eficácia com outros primers alvos. Os marcadores baseados nos genes de SSUrDNA e gGAPDH são específicos para a Família Trypanosomatidae, entretanto são marcadores filogenéticos e possuem pouca sensibilidade (MAIA DA SILVA et al., 2004). Tal fato diminui sua eficácia em amostras diretas.

Todas as análises moleculares apresentaram resultados negativos, o que, de acordo com a maior parte da literatura consultada, não é comum. O que se espera é que os testes sorológicos apresentem resultados negativos e as análises moleculares positivas, já que os testes sorológicos costumam ter especificidade variando entre 77% - 90%, sensibilidade 87% - 93%, (TRAVI et al., 2018; MENEZES-SOUZA et al., 2015; LOPES et al., 2017) enquanto nos moleculares, mesmo com as variações decorrentes dos diferentes alvos usados, esses valores costumam ficar mais altos (e= 95-100; s= 89-100) (TRAVI et al., 2018; LIMA et al., 2019).

A positividade nos testes sorológicos pode decorrer de reações cruzadas com outros patógenos. O que mais comumente se encontra na literatura são reações com outros tripanossomas, como *T. caninum* (ALVES et al., 2012), outros patógenos, como a *Babesia sp.* (LAURENTI et al., 2014) e em animais que foram vacinados contra leishmaniose (SOLANO-GALLEGO et al., 2017; MARCONDES et al., 2013). Essas reações cruzadas, embora ainda muito controversas em todo o meio científico, pode nesse caso, justificar o ocorrido.

Na tentativa de identificar o parasita, foi realizada uma tentativa de cultura a partir de aspirado de linfonodo dos dois animais positivos, que não tiveram nenhum resultado após o tempo previsto para o crescimento parasitário. A proprietária do

abrigo nos relatou que um dos animais havia sido entregue a ela já com um diagnóstico positivo para leishmaniose. De posse dessa informação, e tendo esse animal específico apresentado sintomatologia que justificasse a suspeita, mesmo com o resultado da sorologia negativa, também foi realizada a cultura de aspirado de linfonodo, obtendo resultado negativo, assim em como todas as provas moleculares realizadas.

O Brasil é hoje responsável por 90% dos casos de leishmanioses, somando tanto a visceral quanto o complexo tegumentar, de toda a América, e o principal meio de controle da doença recomendado pelo Ministério da Saúde é a eutanásia de cães positivos (OPAS, 2019; BRASIL, 2014). Mesmo com essa rígida medida, muitas vezes eticamente criticada, o número de casos, tanto canino quanto humano, vem crescendo e se disseminando pelo país a cada ano. Isso demonstra falhas no processo de diagnóstico, tanto na identificação de cães positivos assintomáticos, quanto de cães que não têm a doença e que apresentam resultados falso-positivos nos exames oficiais (ARRUDA et al., 2019; VON-ZUBEN, DONALÍSIO, 2016; TEIXEIRA et al., 2019; MENDONÇA et al., 2017; LOPES et al., 2017; BELO et al., 2017), a exemplo do que ocorreu nesse trabalho.

Já existem inúmeros trabalhos comprovando que os animais positivos assintomáticos têm um papel crucial na disseminação da doença, já que, mesmo aqueles que fizeram a soroconversão, sendo negativos nas provas oficiais do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral, podem manter parasitas na pele, desempenhando, assim, um papel crucial em toda a cadeia de propagação da doença (LAURENTI et al., 2013; DANTAS-TORRES, OTRANTO, 2014; ESTEVA, VARGAS, DE LEÓN, 2017;).

Deste modo, torna-se imprescindível que novos meios de diagnósticos sejam aplicados, para que os resultados possam ser um retrato o mais fiel possível da situação real do ambiente estudado, ajudando nas medidas de controle e evitando ainda mais o alastramento dessa doença.

7 CONCLUSÃO

- Não há circulação de *Leishmania infantum chagasi* nos animais residentes no abrigo durante o estudo.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. E. Profilaxia do calazar no Ceará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 1961. v 3, p. 175-180.
- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of this incidence. **PLoS One**, 2012, n.5, v.7.
- ALVES, A. S. et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Res Vet Sci.**, dez. 2012, n. 93, v. 3, p. 1329-33.
- ARRUDA, R.M.F.; CARDOSO, D.T.; TEIXEIRA-NETO, R.G. et al. Space-time analysis of the incidence of human visceral leishmaniasis (VL) and prevalence of canine VL in a municipality of southeastern Brazil: Identification of priority areas of surveillance and control. **Acta Trop.** 2019. v.197
- ASHFORD, R. W; SEAMAN, J.; SCHORSCHER, J.; PRATLONG, F. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: identity and systematic position of the parasites from patients and vectors. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** n.86, v.4, 1992, p. 379-80.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol.**, 2000, n.30, v.12-13, p. 1269-81.
- BELO, V.S.; GREGÓRIO, E.A.; TEIXEIRA-NETO, R.G. et al. Reliability of techniques used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the national control program in Brazil: A survey in an area of recent transmission. **Preventive Veterinary Medicine.** 2017. V.146, 10-15.
- BORJA, L.S.; DE SOUSA, O.M.F.; SOLCÀ, M.S.; BASTOS, L.A.; BORDONI, M.; MAGALHÃES, J.T.; LARANGEIRA, D.F.; BARROUIN-MELO, S.M.; MOTHÉ-FRAGA, D.B.; VERAS, P.S.T. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infatum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Vet Paras.** 2016. v.229, 110-117.
- BRACHELENTE, C.; MÜLLER, N.; DOHERR, M.G.; SATTLER, U.; WELLE, M. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T Helper -2-biased immune response. **Vet Pathology.** 2005. n.42 v.2 166-175.
- BRASIL. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia - Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde. Brasília, 2000.
- BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2ª edição. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2014. 120p. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf Acesso em: 10 ago. 2018.

BRASILEISH – GRUPO DE ESTUDOS EM LEISHMANIOSE ANIMAL. **Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina**. Brasileish, 2018. Disponível em: https://www.brasileish.com.br/assets/files/diretrizes_TODOS.pdf Acesso em: 17 jun. 2018.

BRAZIL, Reginaldo Pecanha. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 46, n. 3, p. 263-264, jun. 2013 Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822013000300263&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 16 nov. 2019.

CAJUEIRO, A. P. B. et al. Homeopathic medicines cause Th1 predominance and induce spleen and megakaryocytes changes in BALB/c mice infected with *Leishmania infantum*. **Cytokine**, v. 95, 2017, p. 97-101. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466617300467> Acesso em: 30 abr. 2019.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. de; KATZ, G. Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 1999, n. 32 (Supl.II), p. 63-64.

CARDIM, M. F. M; RODAS, L. A. C; DIBO, M. R; GUIRADO, M. M; OLIVEIRA, A. M; CHIARAVALLI NETO, F. Introdução e expansão da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, 1999-2011. **Rev. Saúde Pública**, 2013, n. 47, v.4, p. 691-700.

CARMO, E. V. de S.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Neutrophils Reduce the Parasite Burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-Infected Macrophages. **PLoS ONE**, n. 5, v. 11, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013815> Acesso em: 15 mai. 2019.

CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? **Biosystems**, 1981, n.14, p. 461-81.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiol Rev.**, 1993, n.57, v.4, p. 953-94.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proceedings: Biological Sciences**, 2004, n.271, p. 1251-1262.

CHAGAS, E. Visceral leishmaniasis in Brazil. **Science**, out., n. 30, 1936, p.397-398.

Chagas, E. Primeira verificação em indivíduo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil. **Bras Méd.** 1936. 50: 221-222

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; CASTRO, G. O.; FERREIRA, L. C.; ROMAÑA C. Leishmaniose visceral americana (Nova entidade mórbida do homem na América do Sul). Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose visceral americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 32, 1937, p.321-385.

COELHO, Thais Oliveira. **Ocorrência e análise da infecção natural de espécies da subfamília Phlebotominae na Fercal, Distrito Federal, Brasil/DF**. 2017. xiii, 115 f., il. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

COSTA, L. E. da. **Diversidade de Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) e detecção molecular de parasitas do gênero Leishmania no município de Bom Jesus dos Perdões, estado de São Paulo**. 2016. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidad de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: doi:10.11606/D.10.2017.tde-11012017-102725. Acesso em: 16 out. 2019.

COSTA, V. P. da. **Isolamento de Trypanosoma caninum, Parasitas do Gênero Leishmania e Diagnóstico Molecular de Leishmania infantum chagasi em cães da região metropolitana de São Paulo**. 2018, 48 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Bem-Estar Animal) – Universidade Santo Amaro, São Paulo.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**, 2002, n.125, v.5, p. 407-414.

DAHROUG, M. A.; ALMEIDA, A. B.; SOUSA, V. R.; DUTRA, V.; TURBINO, N. C.; NAKAZATO, L.; DE SOUZA, R. L. *Leishmania*(*Leishmania*) *chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 2010, n. 04, v.1, p. 73-74.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. When is an "asymptomatic" dog asymptomatic? **Vet Parasitol.**, mai. 2014, n. 202, v. 3-4, p. 341-2.

DA COSTA, A. I.; CASANOVA, C.; RODAS, L. A.; GALATI, E. A. Update on the geographical distribution and first record of *Lutzomyia longipalpis* in an urban area in São Paulo State, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, 1997, n. 31, v. 6, p. 632-633.

DA SILVA, L.G.; COSTA-JUNIOR, C.R.L.; FIGUEIREDO-JÚNIOR, C.A.S. et al. Canine β -defensin-1 (CBD1) gene as a possible marker for *Leishmania infantum* infection in dogs. **Parasites Vectors**. 2017. n.10, 199.

DE CARVALHO, M. R.; VALENÇA, H. F.; DA SILVA, F. J.; DE PITA-PEREIRA, D.; DE ARAÚJO PEREIRA, T.; BRITTO, C.; BRAZIL, R. P.; BRANDÃO FILHO, S. P. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State. **Brazil Acta Tropica**, n. 116, v. 1, p. 108-110, 2010.

DEANE, L. M. **Leishmaniose Visceral no Brasil**. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro, 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **Hospital**, 1954, v. 45, p. 419-421.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório de *Leishmania donovani* em área endêmica de Calazar no Ceará. **Hospital**, 1955. v. 48, p. 61-76.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, 2004, n.27, v.5, p. 305-18.

DOTTA, Silvia Cristina Nardy; ZAPPA, Vanessa. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 7, n. 12, jan. 2009. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/8vL99vVT7TfhQmJ_2013-6-21-11-53-38.pdf Acesso em: 10 set. 2019.

ESTEVA, L.; VARGAS, C.; LEÓN, C.V.; The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation. **Mathematical Biosciences**, v. 293, nov. 2017.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba-São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, ano 5, n. 28, 2000. p. 36-44.

FERRO, Rodrigo Sala. **Novo cenário da distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral no estado de São Paulo, com ênfase no oeste paulista**. 2018. 53 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2018.

FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; FEDULO, L. P.; MENEZES R. C.; BALTHAZAR, D. A.; SCHUBACH, T.M.; MADEIRA, M. F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 2008, n.102, v.2, p. 200-201.

FORATTINI, O.P.; RABELLO, E.X.; PATTOLI, D.G.B. Sobre o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz; Neiva, 1912) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 4, n. 1, p. 99-100, 1970.

FRAGA, D. B. M; PACHECO, L. V.; BORJA, L. S.; TUY, P. G. de S. E.; BASTOS, L. A.; SOLCÀ, M. de S. et al. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **PLoS Negl Trop Dis**, n.10, v. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004333> Acesso em: 4 abr. 2019.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 23-51.

GALIMBERTI, M. Z.; KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V. L. F. de; RODAS, L. A. C.; CASANOVA, C.; COSTA, I. P.; ARAÚJO, M. F. L.; TA-NIGUCHI, H. H.; BARBOSA, J. A. R.; BARBOSA, J. E.; TOLEZANO, J. E.; PINTO, P. L. S. Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 1999, n.32 (Suplemento), p. 217-218.

GALVIS-OVALLOS, F.; SILVA, M. D.; BISPO, G. B. S.; OLIVEIRA, A. G.; GONÇALVES NETO, J. R.; MALAFRONTA, R. S.; GALATI, E. A. B. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, Paris, v. 24, n. 2, p. 1-10, jan. 2017.

GOMES, R.; CAVALCANTI, K.; TEIXEIRA, C.; CARVALHO, A.M.; CRISTAL, J.R.; MUNIZ, A.C.; MIRANDA, J.C.; DE OLIVEIRA, C.L.; BARRAL, A. Immunity to *Lutzomyia whitmani* saliva protects against experimental *Leishmania braziliensis* infection. **PLoS Negl Trop Dis**. 2016. n.3 v.10 (11).

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 14 set. 2019. Disponível em: https://www.scielo.org/scielo.php?pid=S1415-790X2004000300011&script=sci_arttext&tlng=es#ModalArticles Acesso em: 20 out. 2019.

GRAÇA, Grazielle Cardoso. **Desenvolvimento e avaliação comparativa de metodologias baseadas na PCR para o diagnóstico molecular e identificação específica de agentes etiológicos de leishmaniose tegumentar que circulam em áreas endêmicas brasileiras**. Dissertação (Mestrado) – Medicina Tropical. Rio de Janeiro – RJ: Instituto Oswaldo Cruz, 2011.

HOARE, C. A. **The trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972.

HONIGBERG, B M. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: LUDVIK, J.; LOM, J.; VAVRA, J (ed.). **Progress in Protozoology**. New York: Academic Press, 1963.

IBRAHIM, M.E.; BARKER, D. C. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. **Infect Genet Evol.**, 2001, n.1, v.1, p. 61-68.

IVERSSON, L. B.; PIRES, R. B. R.; RIBEIRO, M. A.; ESCRIVÃO-JUNIOR, A.; TOLEZANO, J. E.; BURALLI, G. M. Investigação epidemiológica de um novo caso de leishmaniose visceral ocorrido na Grande São Paulo, Brasil. **Rev. de Saúde Pública**, 1982, n.16, p. 205-219.

KAUFER, A.; ELIS, J.; STARK, D.; BARRAT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasit and vectors**, 2017, n.10, v.1, p. 287.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, n. 141, v. 12, p. 1544-1562, 2014.

KUHLS, K.; KEILONAT, L.; OCHSENREITHER, S.; SCHAAR, M.; SCHWEYNOCH C.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes Infect.**, 2007, n.9, v.3, p. 334-343.

KUHLS, K.; CHICHARRO, C.; CAÑAVATE, C.; CORTES, S.; CAMPINO, L.; HARALAMBOUS, C.; SOTERIADOU, K.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; MAURICIO, I.; MILES, M.; SCHAAR, M.; OCHSENREITHER, S.; RADTKE, O. A.; SCHÖNIAN, G. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. **PLoS Negl Trop Dis.**, 2008, n.9 v. 2(7), p. 261.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2005, n. 100, v. 8, p. 811-827.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (eds). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. Vol. I. London: Academic press, 1978; 1987. p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, C. Z. Leishmaniasis in Brazil, IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania (L.) donovani* in Pará State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 1969, n.63, p. 741-745.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 1983, n. 77, v. 5, p. 569-596.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Vet Parasitol.**, set. 2013, n. 196, v. 3-4, p. 296-300.

LAURENTI, M. D. et al. Comparative evaluation of the DPP(®) CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol.**, out. 2014, n. 205, v. 3-4, p. 444-50.

LAVITSCHKA, Cecília de Oliveira; CERETTI-JUNIOR, Walter; MARRELLI, Mauro Toledo. Occurrences of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Phlebotomidae) Potentially Associated with Leishmaniasis Transmission in Urban Parks in the City of São Paulo, Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, jun. 2018, Vol. 34, n. 2, p. 151-153.

LESTINOVA, T.; ROHOUSOVA, L.; SIMA, M.; DE OLIVEIRA, C.L.; VOLF, P. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. **Plos Negl Trop Dis**. 2017. n.11, v.7.

LIMA, T. et al. Diagnostic performance of a qPCR for *Leishmania* on stained cytological specimens and on filter paper impressions obtained from cutaneous lesions suggestive of canine leishmaniasis. **Vet dermatology**, mai. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vde.12757> Acesso em: 07 jul. 2019.

LIMA, H.; RODRÍGUEZ, N.; BARRIOS, M. A.; AVILA, A.; CAÑIZALES, I.; GUTIÉRREZ, S. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2008, n.10, v.4, p. 412-414.

LOPES, E. G. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiol Infect.**, set. 2017, n. 145, v. 12, p. 2436-2444.

LOURENÇO, L. S. de A. **Avaliação da carga parasitária e fatores de virulência em lesões de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana correlação com a forma clínica e resposta à terapêutica**. 2015. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2015

LUCIANO, R.; LUCHEIS, S.; TRONCARELLI, M.; LUCIANO, D.; LANGONI, H. Cross reaction evaluation of *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi* antigens in dogs' serologic response by indirect immunofluorescence test (IIF). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181-187, 1 jun. 2009.

LUKEŠ, J.; BUTENKO, A.; HASHIMI, H.; MASLOV, D. A.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: clues from the expanded family tree **Trends in Parasitology**, 2018, n. 6, v. 34, p. 466-480.

LUKES, J.; MAURICIO, I.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K. W.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 2007, n.29, v.104(22), p. 9375-9380.

LUZ, N.F.; DE SOUZA-VIEIRA, T.; DE CASTRO, W.; VIVARINI, A.C.; PEREIRA, L.; FRANÇA, R.R.; SILVEIRA-MATTOS, P.S.; COSTA, D.L.; TEIXEIRA, C.; MENESES, C.; BOVENTURA, V.S.; DE OLIVEIRA, C.I.; LOPES, U.G.; ARONSON, N.; ANDRADE, B.B.; BRODSKYN, C.L.; VALENZUELA, J.G.; KAMHAWI, S.; BORGES, V.M. *Lutzommmia longipalpis* saliva induces heme oxygenase-1 expression at bite sites. **Front Immunol.** 2018. n.28 v.9:2779.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. **Journal of Tropical Medicine.** 2012. v. 7.

MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C. V.; COURA, J. R.; AÑEZ, N.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, 2004, n.129, v.5, p. 549–561.

MARCILI, Arlei et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: taxonomic revision of

Leishmania (L.) infantum chagasi in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, 2014, v.25, p. 44-51.

MARCONDES, M. et al. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Vet Parasitol.**, nov. 2013, n.197, v.3-4, p. 649-52.

MARTÍNEZ-ORELLANA, P.; QUIROLA-AMORES, P.; MONTSERRAT-SANGRÀT, S.; et al. The inflammatory cytokine effect of Pam3CSK4 TLR2 agonist alone or in combination with *Leishmania infantum* antigen on ex-vivo whole blood from sick and resistant dogs. **Parasites Vectors**. 2017. v. 10, n.123.

MARUYAMA, S. R, DE SANTANA, A. K. M.; TAKAMIYA, N. T.; TAKAHASHI, T. Y.; ROGERIO, L. A.; OLIVEIRA, C. A. B. et al. **Non-Leishmania parasite in fatal visceral leishmaniasis-like disease**, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2511.181548> Acesso em: 10 out. 2019.

MATSUMOTO, P. S. S. **A Geografia é uma forma de pensar: padrões espaciais e epidemiológicos da leishmaniose visceral em Araçatuba, Presidente Prudente e Votuporanga – SP, Brasil**. 2019. Tese (Doutorado em Geografia). Universidade Estadual Paulista – Unesp, Presidente Prudente, SP.

MATSUMOTO, P. S. S.; LIMA, J. de; CASAGRANDE, B. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo: aplicações cartográficas e estatísticas. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 9, n. 17, 27 dez. 2013.

MAURÍCIO, I. L.; GAUNT, M. W.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, 2001, n. 122, v.4, p. 393-403.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. **Parasitology**, 2004, n.128, v.3, p. 263-267.

MELÉNDEZ-LAZO, A. et al. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Res Vet Sci.**, abr. 2018, n. 117, p. 18-27.

MENDONÇA, I.L.; BATISTA, J.F.; WERNECK, G.L. et al. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. **Rev Bras Med Trop**. 2017. v. 50, n.4, 483-488.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin I-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. **PLoS Negl Trop Dis.**, jan. 2015 n. 9, v. 1.

NASCIMENTO, M. S. L. et al. NOD2-RIP2-mediated signalling contributes to shape adaptive immunity in visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, dez. 2017, n. 11, v. 214, p. 1647-1657.

NASCIMENTO, M. S. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; RYFFEL, B.; DUTHIE, M. S.; DE JESUS, A.; ALMEIDA, R. P. de, SILVA, J. S. da. Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon γ to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, 15 mar. 2015, p. 1015–1026. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu531> Acesso em: 20 jan. 2019.

NASCIMENTO, M. S. L.; FERREIRA, M. D.; QUIRINO, G. F. S.; MARUYAMA, S. R.; KRISHNASWAMY, J. K.; LIU, D. et al. NOD2- RIP2-Mediated Signaling Helps Shape Adaptive Immunity in Visceral Leishmaniasis. **J Infect Dis.**, 2016, n. 214, v. 11, p. 1647–57.

NASCIMENTO, M. S. et al. Impairment of Interleukin-17A Expression in Canine Visceral Leishmaniasis is Correlated with Reduced Interferon- γ and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. **Journal of Comparative Pathology**, nov. 2015, n. 4, v. 153, p. 197-205.

NASCIMENTO, M. S. L. **Papel de linfócitos Th17 durante a infecção experimental por *Leishmania infantum chagasi***. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, 2012.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS/OMS. LEISHMANIOSES. Informe Epidemiológico das Américas. **Informe de Leishmanioses**, N. 7 – mar. 2019. Disponível em: www.paho.org/leishmaniasi Acesso em: 05 jun. 2019.

PACHECO, L. V. et al. Comparação dos testes preconizados pelo ministério da saúde para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 3, 2014.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **J Am Vet Med Assoc.**, jun. 2010, n236, v. 11, p. 1184-91.

PAULA, E. M. N.; CRUZ, C. A; OLIVEIRA, I. J.; MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; CARVALHO, A. A. B. Análise espacial da Leishmaniose visceral Canina no Estado de São Paulo, Brasil. In: 1º congresso de pesquisa em Saúde Animal e Humana. **Anais...** Universidade Estadual de Londrina, out. 2016.

PEDROSO, M. F.; CASAGRANDE, B.; GUIMARÃES, R. B. Co Infection with HIV / AIDS and visceral leishmaniasis in the state of São Paulo: movements in the course of time / space. VII Simpósio Nacional de Geografia da Saúde, set. 2015. **Anais...**

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, n. 48, p. 949-950, 1934.

PORTES, A.; GIESTAL-DE-ARAUJO, E.; FAGUNDES, A., PANDOLFO, P.; GERALDO, A de S.; LIRA, M. L. F.; AMARAL, V. F.; LAGROTA-CANDIDO, J.

Leishmania amazonensis infection induces behavioral alterations and modulates cytokine and neurotrophin production in the murine cerebral cortex, **Journal of Neuroimmunology**, V. 301, 2016, p. 65-73, Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165572816304003> Acesso em: 15 mai. 2019.

QUEIROZ, Nina M. G. P. de et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32-38, mar. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?> Acesso em: 02 set. 2018.

QUILEZ, J.; MARTÍNEZ, V.; WOOLLIAMS, J.A.; SANCHEZ, A.; PONG-WONG, R.; et. al. Genetic control of canine leishmaniasis: Genome-wide association study and genomic analysis. **PLoS ONE**. 2012. v.7, n.4.

QUINNELL, R.J.; KENNEDY, L.J.; BARNES, A.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.M.; SHAW, M.A.; CARTER, S.D.; THOMSON, W.; OLLIER, W.E.R. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dogs is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**. 2003. v.55, n.1, 23-28.

QUISPE TINTAYA, K. W.; YING, X.; DEDET, J. P.; RIJAL, S.; DE BOLLE, X.; DUJARDIN, J. C. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. **J Infect Dis.**, 2004, n.189, v.6, p. 1035-1043.

RIBEIRO, R. R. et al. Canine leishmaniasis- an overview of the current status and strategies of control. **Biomed Research International**, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29789784> Acesso em: 10 abr. 2019.

SANTANA, Marília de Andrade. **Estresse oxidativo em cães (Canis familiaris) Linnaeus, 1758, naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) infantum chagasi (Cunha e Chagas, 1937) Shaw, 2002, submetidos a tratamento experimental**. 2017. 43 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SANTIAGO, M. E. B. **Efeitos imunomodulatórios do P-MAPA em cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2011.

SANTOS, F.N. et al. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune® vaccine. **Vaccine**, v. 25, n. 33, 2007, p. 6176-6190. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X07006810> Acesso em: 22 mar. 2019.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression. During the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet Immunology and immunopathology**. 2002. v.88, n.1-2, 21-30

SÃO PAULO (Estado). Classificação Epidemiológica dos Municípios Segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Estado de São Paulo, dezembro de 2014. **BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista**, n.143, v.12, nov. 2015.

SÃO PAULO (Estado). Governo do Estado de São Paulo. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação – 2014 a 2018.**

Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv1418_lpi.pdf Acesso em: 13 out. 2018.

SÃO PAULO (Estado). Governo do Estado de São Paulo. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação – 2014 a 2019.**

Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv1419_lpi.pdf Acesso em: 1 out. 2019.

SAVANI, E. S.; DE OLIVEIRA CAMARGO, M. C.; DE CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI R. A.; DOS SANTOS, M. G.; D'AURIA, S. R.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol.**, 2004, n.25, n.120, v.3, p. 229-233.

SHCÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 47, 2003, p. 349-358.

SHCÖNIAN, G. et al. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, n.138 (4), 2010. p. 405-425.

SILVA, J. R. **Leishmaniose Visceral (Calazar)**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1957.

SILVA, R. E.; SAMPAIO, B. M.; TONHOSOLO, R.; DA COSTA, A. P.; COSTA, L. E. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPERANÇA, M. A.; MARCILI, A. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. **BMC Infectious Diseases**, n.19, v.895, published online on october, 2019.

SIMPSON, A G.; ROGER, A. J. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. **Mol Phylogenet Evol.**, 2004, n. 30, p. 201–212.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.**, 2006, n.22, v.4, p. 168-174.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and Immunoistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum*- infected Dogs. **Journal Comparative of Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. **Trends Parasitol.**, sey. 2017, n. 9, p. 706-717.

SOLANO-GALEGO, L.; MIRÓ,G.; KOUTINAS,A.; CARDOSO,L.; PENNISI, M.G.; FERRER,L.; BOURDEAU,P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LesihVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, n.4, v. 86, 2011. Disponível em: <http://www.leishvet.org/publications/canine-leishmaniosis-guidelines/> Acesso em: 17 jun. 2019.

SOUZA, A. P.; SOTO, M.; COSTA, J. M.; BOAVENTURA, V. S; DE OLIVEIRA, C. I.; CRISTAL, J. R.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. **PLoS One**, jun. 2013, n. 12, v. 8.

SPINELLI, Renan Monnerat. **Comparação de metodologias diagnósticas para leishmaniose visceral em cães domésticos provenientes de área de baixa transmissão nas cidades de Niterói e Maricá, Rio de Janeiro.** Dissertação (Mestrado) - Microbiologia e Parasitologia Aplicadas. Niterói – RJ: Universidade Federal Fluminense, 2018.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol Cell Biol**, n. 85, p.138-147, 2007.

STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; SCHOFIELD, C. J.; GIBSON, W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Adv Parasit.**, 2001, n.48, p. 1-56.

TEIXEIRA, A.I.P.; SILVA, D.M.; VITAL,T. et al. Improving the reference standart for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2019. v. 114.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Negl Trop Dis.**, jan. 2018, n. 12, v. 1.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONCALVES, A.; VELEZ, I. D. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. **Am J Trop Med Hyg.**,1994, n.50, v.5, p. 557-565.

TURCHETTI, A.P.; COSTA, L.F.; ROMÃO, E.L.; FUJIWARA, R.T.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Vet Immunology and immunopathology**. 2015. v. 163, n. 1-2, 67-76.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: LUMDSEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the kinetoplastida**. New York: Academic Press, 1976.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **Int J Parasitol.**, 1994, n.24, v.8, p. 1317-1331.

VIOL, M. A. et al. Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. **Parasitology Research**, 2016. n. 9, v. 115, p. 3479-3484.

VON-ZUBEN, A.P.B.; DONALÍSIO, M.R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cad. Saúde Pública**. Jun 2016. v.32, n.6.

VOTÝPKA, J.; D'AVILA-LEVY, C. M.; GRELLIER, P.; MASLOV, D. A.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends in Parasitology**, 2015, n. 10, v. 31, p. 460-469.

WALLACE, F. G. Biology of the Kinetoplastida of Arthropods. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (ed.). **Biology of the Kinetoplastida**. New York: Academic Press, 1979.

XAVIER, S. C. et al. Comparison of paraffin – embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 17, p. 1-7, 2006.

WHEAT, W.H.; ARTHUN, E.N.; SPENCER, J.S.; TITUS, R.G.; DOW, S.W. Immunization against full-length protein and peptides from the *Lutzomyia longipalpis* sand fly salivary component maxadilan protects against *Leishmania major* infection in a murine model. **Vaccine**. 2017. n.35, v.48; 6611-6619.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases**. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/en/ . Acesso em: 05 jun. 2019 a

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/> . Acesso em: 05 jun. 2019 b