

Universidade Santo Amaro

Mestrado em Medicina Veterinária e Bem Estar Animal

Caio Izidoro Campolongo

**Diagnóstico sorológico e molecular de *Leishmania infantum*
baseado no gene de Catepsina L-like de cães mantidos no Centro
de Controle do Zoonoses do município de Marabá, Pará.**

São Paulo

2020

Caio Izidoro Campolongo

Diagnóstico sorológico e molecular de *Leishmania infantum* baseado no gene de Catepsina L-like de cães mantidos no Centro de Controle do Zoonoses do município de Marabá, Pará.

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação Stricto Senso 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

2020

C198 Campolongo, Caio Izidoro
Diagnóstico sorológico e molecular de *Leishmania infantum*
baseado no gene de Catepsina L-like de cães mantidos no Centro de
Controle de Zoonoses do município de Marabá, Pará / Caio Izidoro
Campolongo. – São Paulo, 2020.

63 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Medicina e Bem-Estar Animal) –
Universidade Santo Amaro – 2020.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcil

1. *Leishmania infantum*. 2. Leishmaniose visceral. 3.
Leishmaniose visceral. I. Marcil, Arlei, orient. II. Universidade
Santo Amaro III. Título

Caio Izidoro Campolongo

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOELCULAR DE LEISHMANIA
INFANTUM BASEADO NO GENE CATEPSINA L-LIKE DE CÃES
MANTIDOS NO CENTRO DE CONTROLE DE ZONOSSES DO
MUNICÍPIO DE MARABÁ, PARÁ.**

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, de de 2020.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Arlei Marcili

Prof. Dr. Herbert Soares

Profa. Dra. Fernanda Nieri

Conceito Final: _____

PARECER N.08/2019

Projeto de Pesquisa: "Diagnóstico sorológico e molecular e Leishmania infantum chagasi baseado no gene de Catepsina L-like de cães mantidos no centro de controle do Zoonoses do Município de Marabá "

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Arlei Marcili
Caio Izidoro Campolongo

Curso: Medicina Veterinária

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à 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 **Dispensa** do Projeto **"Diagnóstico sorológico e molecular e Leishmania infantum chagasi baseado no gene de Catepsina L-like de cães mantidos no centro de controle do Zoonoses do Município de Marabá"**.

São Paulo, 26 de março de 2019.



PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONOFRIO
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais –
CEUA UNISA - Universidade Santo Amaro

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**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

VI.1. 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.

Agradecimentos

À Deus, por ter me permitido chegar até aqui, com saúde física e mental, apesar das dificuldades e barreiras encontradas.

Aos meus pais e familiares que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir em frente e serviram de exemplo.

Aos colegas e amigos da turma de mestrado pela força, incentivo e por termos tornado a jornada mais leve.

Ao meu orientador Prof. Dr. Arlei Marcili, pela orientação, paciência, apoio e auxílio na elaboração e execução deste projeto.

Aos colegas do grupo de pesquisa tripanossomas e leishmanias pelo auxílio em diversas partes do trabalho.

A UNISA e seus professores pela possibilidade em realizar esse projeto e o ensino desempenhado.

“Deficiente é quem não consegue modificar a sua vida, aceitando as imposições dos outros e da sociedade, ignorando que é dono do seu destino; Louco é quem não procura ser feliz com o que possui; Cego é aquele que não vê seu próximo morrer de frio, de fome, de miséria e só tem olhos para seus míseros problemas.”

Mário Quintana

RESUMO

As espécies do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios, responsáveis por grave zoonose em todo o mundo, a leishmaniose. No Brasil, a espécie mais importante é *Leishmania infantum*, que tem como principal vetor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Entre os hospedeiros estão mamíferos como canídeos silvestres e domésticos e os seres humanos. No meio urbano os cães domésticos são o principal reservatório do parasita, sendo que casos em cães precedem os casos humanos em uma região. No Brasil a região norte e nordeste do país são as que mais notificam casos de leishmaniose visceral em cães e humanos. Na região norte se destaca o estado do Pará, que vem apresentando mais casos da doença nos últimos anos, tendo o município de Marabá segundo maior número de casos de Leishmaniose visceral em humanos nos últimos anos. O trabalho foi realizado utilizando-se 400 amostras de sangue e soro de cães presentes e atendidos no Centro de Controle de Zoonoses do município de Marabá. As amostras obtidas foram testadas com o método de diagnóstico sorológico DPP, recomendado pelo Ministério da Saúde como método de triagem oficial, e diagnóstico molecular PCR, utilizando gene da Catepsina L-like, tendo melhor especificidade e sensibilidade que outros testes. A prevalência encontrada foi de 75,5 % (302/400) nos testes de pesquisa de anticorpos, representando um número de 302 animais e de 59,25% (237/400) no teste molecular, representando um número de 237 animais. Os resultados demonstram que o parasita *Leishmania infantum* se encontra amplamente distribuído na região de estudo.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, Leishmaniose visceral, Marabá

ABSTRACT

Species of the genus *Leishmania*, are intracellular parasites, responsible for severe zoonosis in the world, the leishmaniasis. In Brazil the most important specie is the *Leishmania infantum*, the main vector is the phlebotomine *Lutzomyia longipalpis*. Among the hosts are mammals like the wild and domestic canids and the humans. In Brazil the north and northeast region are the ones that report more cases of visceral leishmaniasis in dogs and humans. From the north region the state of Pará, stands out with a greater number of cases in recent years, the city of Marabá, in Pará, represents the second largest number of cases of human visceral leishmaniasis in the region in recent years. This study was performed using 400 blood samples from dogs attended and present at the zoonosis control center in the city of Marabá. The samples were tested with serological diagnostic method DPP, recommended by the ministry of health as a screening method in Brazil, and molecular diagnosis PCR, using the cathepsin B-like gene, that has better specificity and sensitivity than other tests. The prevalence found was 75,5% in serological test, representing a number of 302 animals and 59,25 % in molecular test, representing a total of 237 animals. The results show that the parasite *Leishmania infantum* is present in the dog population of the studied region.

Keywords: *Leishmania infantum*, visceral leishmaniasis, Marabá

Lista de Tabelas

Tabela 1-Casos de Leishmaniose Visceral por Município da região Norte.....	28
Tabela 2 – Casos de Leishmaniose Visceral por Municípios do estado do Pará.....	29
Tabela 3- Distrito de Origem dos animais Coletados.....	45
Tabela 4- Quantidade de animais positivos por distrito.....	47

Lista de Figuras

Figura 1- Casos de Leishmaniose Visceral por regiões do Brasil.....	27
Figura 2- Mapa do Município do Pará com seus distritos.....	44
Figura 3- - Mapa com a positividade por distrito de Marabá.....	48

Lista de abreviaturas

DPP®	Dual Path Platform
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
Ggapdh	Proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GP	Proteína de superfície
GIPL	Glicosilinositol
IFN γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
KDNA	DNA do Citoplasma
LPG	Lipofosfolípida
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SSUrDNA	Ácido Desoxirribonucleico da pequena unidade Ribossomal
TFN	Fator de necrose tumoral
TGF	Fator de transformação do crescimento
TH	Linfócito T Helper

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.2 História da doença	13
1.3 Gênero Leishmania	17
1.3.1 Agente Etiológico	19
1.3.2 Vetores	20
1.3.3 Ciclo de vida	23
1.3.4 Sinais e sintomas da leishmaniose visceral	24
1.3.5 Epidemiologia	25
1.3.6 Imunopatologia	32
1.3.7 Métodos diagnósticos de leishmaniose	34
1.3.7.1 Pesquisa de anticorpos	35
1.3.7.2 ELISA	36
1.3.7.3 Teste imunogromatográfico rápido dual path platform	38
1.3.7.4 Diagnóstico molecular	39
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVO	42
4 MATERIAL E MÉTODO	43
4.1 Local do estudo	43
4.2 Obtenção das amostras	45
4.3 Triagem sorológica	46
4.4 Extração de DNA	46
4.5 Marcador molecular para diagnóstico molecular	46
5 RESULTADOS	47
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 Introdução

1.2 História da Doença

As doenças causadas por protozoários em seres humanos são um grande problema de saúde pública no mundo a muitos anos. Entre as que se possa citar estão as leishmanioses, que além de seres humanos acomete também outros mamíferos como os cães. (SILVA e WINCK, 2018).

A leishmaniose representa um complexo grupo de doenças com importante diversidade clínica e epidemiológica, sendo a segunda principal doença causada por protozoários, se destacando pela alta incidência e distribuição de casos (DESJEUX,2014; SILVA e WINCK, 2018).

A leishmaniose visceral é de maior prioridade que a leishmaniose cutânea, pois é uma doença fatal na ausência de tratamento (DESJEUX,2014), sendo considerada uma doença de importância em saúde pública devido à sua diversidade epidemiológica, alta incidência e ampla distribuição geográfica; sendo considerada uma das infecções parasitárias negligenciadas mais frequentes no mundo (WHO,2019).

Os estudos sobre a leishmaniose visceral no Brasil se iniciam em 1934, quando Carlos Chagas, então diretor do IOC, surpreendeu-se com os relatórios de Henrique Penna, médico do Serviço de Febre Amarela da Fundação Rockefeller. As análises histopatológicas de uma quantidade considerável de amostras de fígado que Henrique Penna examinará para diagnosticar a febre amarela no interior do Brasil haviam revelado microrganismos com características de protozoários do gênero *Leishmania* descrito por Ronald Ross em 1903 (GUALANDI,2013).

Ao ser notificado destes achados, Carlos Chagas incumbiu seu filho Evandro Chagas de realizar as investigações sobre a doença (GUALANDI,2013).

Acredita-se que primeiro caso de leishmaniose no Brasil ocorreu em 1936, sendo diagnosticado em uma pessoa viva, por Evandro Chagas, na cidade de Aracaju, Sergipe. (GUALANDI,2013).

O paciente de 16 anos, havia se mudado do interior de Santa Maria, após a morte de sua mãe e irmã, para morar em Sergipe. O jovem apresentava magreza mórbida, aumento abdominal, sentia febre dificuldade para respirar e eventualmente tinha diarreias, assim como seus parentes falecidos.

Na época foi então coletado material do baço do jovem e observado em microscópio, por Henrique Penna que fazia investigações de febre amarela, observando então parasitas do gênero *Leishmania* (BENCHIMOL et al., 2019 ; GUALANDI,2013)

Estudos publicados após esse diagnóstico, Carlos Chagas referia-se à leishmaniose visceral do Brasil como possivelmente diferente daquela observada no Velho Mundo, mesmo sendo impossível diferenciar morfológicamente a *Leishmania* encontrada no Brasil, posteriormente denominada *Leishmania chagasi* , da *Leishmania donovani* na Índia e em outras partes da Ásia e da África e *Leishmania infantum* da região mediterrânea (BENCHIMOL et al., 2019).

Continuando as pesquisas do pai, Evandro Chagas inicia pesquisas na região norte e nordeste do Brasil, encontrando os primeiros casos de leishmaniose visceral em pacientes vivos da região amazônica em cidades do Pará como Piratuba, Marapanim e Soure, no litoral, por viscerotomia, e Moju, por investigação clínica. No mesmo estado foram encontrados alguns cães e um gato naturalmente infectados. Um roedor silvestre foi suspeito de possuir o parasita, porém posteriormente descartado (BARRETO, 2012).

Observava-se, nesta época, que a doença ocorria exclusivamente em áreas silvestres ou em zonas rurais em estreito contato com matas. Na busca pelo vetor, os principais suspeitos eram os flebótomos, e as espécies mais frequentes nas áreas de estudo, dentro das casas e em seus arredores, eram o *Phlebotomus longipalpis* e o *Phlebotomus intermedius* (atualmente classificados como *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia (Lutzomyia) intermedia*). Esses

insetos eram capazes de manter os protozoários em seu trato digestivo, já que ambos eram infectáveis usando-se animais com *Leishmania*, entretanto seu papel na transmissão da doença não foi demonstrado conclusivamente (DEANE, 1958).

Em 1953, no Ceará inicia a primeira epidemia de leishmaniose visceral documentada nas américas. Durante a epidemia os casos no Brasil subiram de 34 (total representativo de quatro décadas) para 1832 casos da doença. É durante essa epidemia que começam a mudar alguns fatores relacionados a epidemiologia descrita por Chagas na descoberta da doença. Agora os casos estavam no meio urbano, sendo esporádicos no ambiente rural, a transmissão urbana foi comprovada por doentes que ali se infectavam e sobretudo por inquérito entre os cães, que revelou muitas infecções adquiridas nas cidades e sendo encontrada uma raposa (*Lycalopex vetulus*) com presença de *leishmania*, algo que Chagas ainda não havia conseguido comprovar em 1930 (BENCHIMOL et al., 2019).

Começam a ter maior presença nas pesquisas os protozoologistas Leônidas e Maria Deone, para os quais a pronunciada ação patogênica da *Leishmania* para a raposa, que podia morrer da infecção, não condizia com um parasitismo secular, que teria resultado em relativo equilíbrio entre parasita e hospedeiro. Admitiam, assim, a hipótese de ter sido a leishmaniose visceral importada do Velho Mundo por intermédio de cães ou indivíduos parasitados. (BENCHIMOL et al., 2019).

O casal Deone consegue confirmar suspeita de Chagas sobre o principal vetor fazendo capturas dentro de habitações humanas, abrigos de animais domésticos e ao ar livre nas áreas com mais casos. O resultado dessas capturas foram 12 espécies de flebotomíneos sendo que 97 % eram da espécie *Lutzomyia longipalpis*, sendo muitas vezes o único encontrado dentro das casas com mais de um indivíduo positivo (BENCHIMOL et al., 2019).

Tento em vista o aumento no número de casos e a confirmação da transmissão pelo vetor, começa um plano para tentar eliminar a presença do vetor no ambiente, baseado no que era realizado para controle da malária. Inicia-se então a borrifação intra e extradomiciliar com Dicloro-Difenil- Tricloroetano

(DDT) e a eliminação de cães com sintomas. A borrifação conseguia controlar a presença do vetor dentro das casas, porém no ambiente silvestre e ao ar livre não foi tão útil (BENCHIMOL et al.,2019).

Estima-se que em oito anos utilizando a eliminação de cães como medida profilática, tenham sido eutanasiados 78 929 cães (BENCHIMOL et al., 2019).

Com a evolução da ciência e de técnicas diagnósticas melhores o estudo sobre a leishmaniose visceral tem um grande avanço, sendo que a partir de 1980 estudos confirmam a disseminação em meios urbanos da doença e com número de cães positivos crescente nas mesmas áreas (AZEVEDO, 2019).

Até o ano de 2015, no Brasil, a eutanásia de animais positivos era considerada obrigatória para controle da doença, a partir de então deixou de ser obrigatória e passou a ser recomendada uma vez que passa a existir um fármaco autorizado para seu tratamento (BENCHIMOL et al.,2019).

Atualmente, a Leishmaniose Visceral é uma zoonose de grande importância também para saúde pública, sendo de curso crônico grave, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. O principal agente envolvido na doença é o protozoário *Leishmania infantum*, responsável pela transmissão em diversos países incluindo o Brasil (SILVA, 2017; WHO,2019).

A doença esta presente em diversos continentes, como Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas. Na América Latina a doença já foi descrita em 12 países, sendo que 90% do total de casos ocorrem no Brasil (BRASIL,2014).

Estima-se que aproximadamente 90.000 novos casos de leishmaniose visceral são relatados em regiões endêmicas do mundo, como Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, que levam a 30.000 mortes (WHO,2019).

Hoje, o Brasil é um dos 75 países mais afetados pela leishmaniose visceral, contando com a presença da doença em quase toda distribuição de seu território nacional (GONTIJO ; MELO, 2018; AZEVEDO, 2019)

Estima-se que 14 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas e que, a cada ano, 500 mil desenvolvam a forma visceral da doença ,entretanto, esse número pode estar subestimado, uma vez que as leishmanioses são notificadas somente em 33 dos 88 países nos quais elas ocorrem (FREITAS, 2010).

1.3 Gênero *Leishmania*

De acordo com a taxonomia proposta por Levine et al. 1980, estes parasitas possuem a seguinte posição sistemática :Reino: *Protista*, sub-reino: *Protozoa*, filo: *Sarcomastigophora*, sub-filo: *Mastigophora*, classe: *Zoomastigophorea*, ordem: *Kinetoplastida*, sub-ordem: *Trypanosomatina*, família: *Trypanosomatidae* e gênero: *Leishmania* (PETERS, KILLICK-KENDRICK, 1987; JUNIOR, 2014)

Os tripanossomatídeos são caracterizados pela presença de um flagelo e uma estrutura rica em DNA, o cinetoplasto (FREITAS, 2010). 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 (STEVENS et al., 2001 ; SIMPSON et al., 2006).

Os tripanossomatídeos podem ser heteroxênicos ou monoxênicos e de acordo com as formas apresentadas durante o desenvolvimento, se distribuem em 15 gêneros distintos. Onze destes gêneros compreendem protozoários monoxênicos parasitas de insetos. Já espécies cuja manutenção do ciclo requeira tanto hospedeiro vertebrado quanto hospedeiro invertebrado encontram-se distribuídas nos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*. Temos também o gênero *Phytomonas*, que possui espécies com ciclo heteroxênico, sendo parasita de insetos e hospedeiros vegetais (BORGHESAN, 2013).

O gênero *Leishmania* é constituído por 30 espécies que infectam vertebrados de diferentes ordens (répteis e mamíferos) transmitida por vários invertebrados da família Psychodidae (DESJEUX, 2014).

Os parasitos possuem ampla distribuição sendo que espécies *Leishmania donovani* são encontrada no subcontinente Indiano, Ásia e África, *Leishmania infantum* no Mediterrâneo e *Leishmania chagasi* na América do Sul. Cada espécie possui cadeia epidemiológica com características próprias (BASTOS et al., 2015)

As espécies mais frequentes no Velho Mundo são representadas pela *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica* e *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, causando alterações cutâneas e *Leishmania infantum*, causando alterações mais graves (FREITAS, 2010)

No Novo Mundo, as espécies mais frequentes são *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Viannia) colombiensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) shawi*, causando alterações cutâneas e *Leishmania chagasi* gerando a forma visceral (FREITAS, 2010).

As espécies causadoras de leishmaniose visceral pertencem ao complexo *Leishmania* do subgênero *Leishmania (L.)*, incluindo: *L. donovani*, que causa leishmaniose visceral antroponótica na Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão; *L. infantum*, responsável pela leishmaniose zoonótica na região do Mediterrâneo (Europa e África); *L. chagasi*, que apresenta alta similaridade genética com *L. infantum*, e tem sido correlacionada com leishmaniose zoonótica em diferentes países das Américas (Novo Mundo) (MARCILI et al., 2014).

Devido à complexidade das relações dessas diferentes espécies e suas diferentes origens geográficas, diversos estudos empregando marcadores moleculares, como o espaçador interno transcrito do gene ribossômico (ITS) a proteína de superfície 63 (gp63) mini-exon, cisteíno proteases, citocromo

oxidase II e microssatélites, estão sendo usados para verificar a proximidade dos agentes (MAURÍCIO et al, 2004 ; KUHLS et al., 2008, AZEVEDO,2019).

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).

1.3.1 Agente Etiológico

Há dois tipos de leishmaniose visceral, as quais diferem em suas características de transmissão. A leishmaniose visceral zoonótica, transmitida do animal para o vetor e para o humano e antroponótica, transmitida de humano a humano pelo vetor. No primeiro, humanos são ocasionalmente hospedeiros e animais, principalmente canídeos, são reservatórios do parasito (CHAPPUIS et al., 2007).

As leishmanias apresentam duas formas distintas, amastigota e promastigota (BRASIL, 2010). Nos hospedeiros mamíferos representados na natureza por várias ordens e espécies, com destaque para os cães domésticos, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada, imóvel e com flagelo internalizado que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. Todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da sub-família *Phlebotominae*,

pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo), e *Phlebotomus* (no Velho Mundo) (JUNIOR, 2014 ; SAÚDE, 2017).

Nos flebotomíneos as leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo na forma promastigotas, que é flagelada, possuem seu corpo alongado medindo entre 14 e 20 mm, a presença de um flagelo livre (ALMEIDA et al., 2010).

É no trato digestivo do vetor que as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas, sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada (SAÚDE, 2019).

1.3.2- Vetores

Os flebotomíneos são os vetores naturais de alguns agentes etiológicos causadores de doenças humanas e de animais, tais como protozoários do gênero *Leishmania* (ALMEIDA et al., 2010).

Esse grupo de insetos distribui-se por quase todas as regiões faunísticas do mundo, com aproximadamente 800 espécies já descritas, 60% na região Neotropical e cerca de 229 registradas para o Brasil (ALMEIDA et al., 2010).

Os flebotomíneos são holometábolos e seu desenvolvimento a partir do ovo passa por quatro estágios larvais, pupa e adulto. São insetos pequenos medindo de 2 à 3 mm, de cor amarelada, apresentam um par de asas e um par de pequenas estruturas, chamados de halteres ou balancins, responsáveis pela estabilidade do voo, sendo que seu voos são em curtos saltos, possuem o zumbido característico dos dípteros, o corpo coberto por cerdas , hábito crepuscular, sendo mais frequentes ao anoitecer e ao amanhecer (FONSECA, 2013 ; DESJEUX, 2014 ; LAVITSCHKA et al., 2018).

Flebotomíneos adultos estão adaptados a viver em abrigos úmidos e escuros, como os observados nas florestas tropicais. Contudo, seus criadouros são de difícil localização na natureza, sendo que as larvas se alimentam de matéria orgânica do solo e os adultos, tanto fêmeas quanto machos, de fontes

naturais de açúcar (seiva de plantas, secreções de afídeos e néctar). Além de açúcar, as fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para a ovogênese (FERRO et al., 1997 ; FREITAS, 2010).

Da fase de ovo a fase adulta em condições ideais o ciclo leva um período de aproximadamente 30 a 40 dias (BRASIL, 2014).

A maioria das espécies de flebotomíneos são gonotróficas concordantes, que fazem somente um repasto por ovoposição. Espécies que fazem mais de um repasto por ovoposição são gonotróficas discordantes. Esse comportamento possibilita um aumento do contato vetor hospedeiro e, conseqüentemente, aumenta as chances de o inseto tornar-se infectado e transmitir *Leishmania*. Além disso, o desenvolvimento dos parasitos no intestino do vetor parece não ser afetado pela ocorrência de múltiplos repastos em um único ciclo gonotrófico (EINAIEM et al., 1994).

Os flebotomíneos pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae e sub família Phebotominae (FARIA et al. , 2012).

A subfamília Phebotominae é composta por seis gêneros, sendo *Phebotomus*, com cerca de 94 espécies, *Sergentomyia*, com cerca de 258 espécies, *Chinius*, com cerca de três espécies, *Lutzomyia* , com mais de 400 espécies, *Brumptomyia*, com cerca de 24 espécies, *Warileya* com cerca de oito espécies e *Hertigia*, como ao menos uma espécie (ANDRADE, 2010).

Os gêneros *Phebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* são presentes no Velho Mundo, enquanto *Brumptomyia*, *Warileya*, *Hertigia* e *Lutzomyia* estão presentes no Novo Mundo, sendo este último o de maior importância epidemiológica e ampla distribuição geográfica (ANDRADE, 2010).

O primeiro registro de dípteros da subfamília Phebotominae datam do Cretácio Inferior e o nome foi dado a partir do gênero *Phlebotomus*, cujas fêmeas hematófagas sugam sangue de diversos animais e do homem. São referidos na literatura como flebotomíneos ou flebótomos (ANDRADE, 2010).

O crescente desaparecimento das florestas deu lugar ao aparecimento do fenômeno da domiciliação de vetores, alterando a condição de exposição do homem ao parasito (RÊGO, 2013).

Mais de 900 espécies de flebotomíneos já foram descritas, e destas, cerca de 500 são encontradas nas Américas, mas apenas 30 são consideradas participantes do ciclo das leishmanioses (DESJEUX, 2004; JACQUES, 2014).

Do gênero *Phlebotomus*, são vetores de leishmaniose o *Phlebotomus (Euphlebotomus) argentipes*, *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus*, *Phlebotomus (Larrousius) aiasi* e *Phlebotomus (Larrousius) neglectus* (FREITAS, 2010).

No Brasil já se tem a presença descrita dos seguintes espécies de flebótomos: *Migonomyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Psychodopygus lloydi*, *Pintomyia fischeri*, *Lutzomyia amarali*, *Lutzomyia cruzi*, *Nyssomyia whitmani* e *Lutzomia longipalpis* (LAVITSCHKA et al., 2018 ; BRASIL, 2014 ; CARVALHO ; BACELAR, 2005).

O *Lutzomia longipalpis* é considerado o principal vetor da leishmaniose visceral no Brasil, sendo conhecido popularmente como mosquito palha, birigui e mosquito do rio (FREITAS, 2010; ANDRADE, 2010 ; JUNIOR, 2017 ; SILVA 2017 ; LAVITSCHKA et al., 2018).

Apesar de serem conhecidos vulgarmente como “mosquito palha” ou “mosquito do rio”, eles não são mosquitos, uma vez que apresentam características exclusivas, que os incluem na família Psychodidae e não na família Culicidae (ANDRADE, 2010).

Entretanto, outras espécies que são incriminados como vetores da doença no país, como: *Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi*, *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* e *Lutzomyia (Lutzomyia) forattinii*. Já foi identificado o agente em exemplares de *Migonomyia migonei* e acredita-se que *Pintomyia fischeri* também esteja relacionado na transmissão uma vez que em algumas localidades do país com a doença não foi encontrado o principal vetor (FREITAS, 2010; JUNIOR, 2017 ; SILVA 2017 ; LAVITSCHKA et al., 2018 ; MARCILI et al., 2014; CECILIO et al., 2020).

O *Lutzomyia (L.) longipalpis* apresenta ampla distribuição geográfica desde o Sul do México até o Norte da Argentina e Paraguai, distribuição coincidente com a presença de LV nessas regiões. Esse inseto também tem habilidade de ocupar diversos nichos ecológicos, incluindo aqueles resultantes de ação antrópica (YOUNG e DUNCAN, 1994).

1.3.3 Ciclo de vida

A *Leishmania* mantém seu ciclo de vida através da transmissão entre os flebotomíneos e os mamíferos, apresentando características distintas no hospedeiro e no vetor (FONSECA, 2013).

O ciclo de desenvolvimento desse protozoário envolve duas formas bem definidas, promastigotas e amastigota

A forma promastigotas, flagelada, é associada ao vetor, no qual ocorre uma série de transições morfológicas. A forma promastigotas procíclica sofre um alongamento no interior da matriz peritrófica precedendo o aparecimento das formas nectomonas. Estas são encaminhadas para o exterior da matriz peritrófica se aderindo ao epitélio intestinal no qual completam a diferenciação nas formas leptomonas. Só então as leptomonas se diferenciam nas formas haptomonas ou em formas promastigotas metacíclicas, indivisíveis e dotadas de mobilidade, passando a ser a forma infectiva para os vertebrados (PETERS, KILLICK-KENDRICK, 1987; FREITAS, 2010).

As formas promastigotas se referem a forma infectantes, e são inoculadas quando as fêmeas flebotomíneas, realizam repasto sanguíneo e uma vez no tecido do hospedeiro as formas promastigotas transformam-se em forma amastigota, encontradas internalizadas nas células fagocíticas mononucleares de hospedeiros vertebrados (ROCHA et al. , 2020 ; SILVA, 2017).

No macrófago hospedeiro a *Leishmania* encontra-se com uma forma mais arredondada, com seu núcleo possuindo uma coloração basofílica, com ausência de flagelo externo, sendo chamada de forma amastigota (ROCHA et al. , 2020).

Uma vez dentro do macrófago o parasita se múltipla de forma binária, posteriormente rompe a célula ficando livre e podendo infectar outras células. Quando o vetor se alimenta do sangue desse animal pode ingerir esta forma amastigota, se infectando (DIAS, 2008; ROCHA et al., 2020).

No tubo digestivo dos flebotomíneos, as amastigotas são liberadas dos macrófagos lisados e diferenciam-se em promastigotas (DIAS,2018; COSTA, 2018). No ambiente doméstico o cão é considerado o principal elo na cadeia de

transmissão, servindo como fonte de infecção para os vetores da Leishmaniose (DIAS, 2008 ; CAMPINO ; MAIA 2008).

A infecção em cães e no homem são similares, entretanto em cães além do comprometimento dos órgãos viscerais, temos também lesões cutâneas e mucocutâneas nos infectados sintomáticos (ROCHA et al., 2020).

Após a inoculação das formas promastigotas metaciclíca no hospedeiro, inicia-se o processo de resposta do organismo com essas formas do parasita sendo fagocitadas por macrófagos, e multiplicando-se nas formas amastigotas dentro dos fagolisossomos, que separam dos mecanismos de defesa celular do hospedeiro, com ruptura dos macrófagos as formas amastigotas penetram em outras células, disseminando-se do local da picada para outros locais do organismo (FONSECA, 2013 ; COSTA, 2018).

O parasita tem predileção por órgãos hemolinfáticos, como baço, linfonodos, medula óssea e fígado, podendo também atingir regiões dérmicas, estabelecendo assim uma infecção sistêmica (COSTA, 2018)

1.3.4 Sinais e Sintomas da Leishmaniose Visceral

As manifestações clínicas da doença no cão são inespecíficas, mimetizando outras enfermidades (ALBUQUERQUE et al., 2007)

Nos casos clínicos os principais sintomas apresentados são: febre prolongada e intermitente, emagrecimento, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, lesões cutâneas, lesões oftálmicas, anemia severa, leucopenia, dor abdominal e caquexia (DIAS, 2008 ; SILVA, 2018).

De acordo com a espécie envolvida o infectado poderá apresentar alguns sinais e sintomas, sendo que na Leishmaniose temos duas formas, a cutânea, que inclui a forma difusa e muco-cutânea, e a forma visceral, mais grave (FREITAS,2010).

Os sinais cutâneos em canídeos são alopecia, dermatites descamativas e equimose (principalmente em plano nasal e orelhas), onicogribose, úlceras de pele e hiperqueratose (FONSECA, 2013 ; SANTIAGO, 2011).

Os cães são tidos como principais reservatórios epidemiológicos da leishmaniose visceral, sendo o quadro nesses animais caracterizados por

alterações bioquímicas na urina, onicogrifose, emagrecimento progressivo, formação de áreas alopecicas seguidas de descamação, presença de lesões pustulares esfoliativas ou ulcerativas, adenite, febre alta, substancial perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia. Podendo levar à morte se não tratada. (FONSECA, 2013; SILVA et al., 2019).

Em humanos a hipergamaglobulinemia, leucopenia, tosse seca, quadros febris, anemia são sintomas característicos da doença, que pode evoluir para casos mais graves, onde diarreia, pancitopenia, anemia e edemas periféricos se mostram presentes (ALBUQUERQUE et al., 2007 ; FONSECA, 2013).

Os cães podem ser classificados como expostos, infectados ou doentes, de acordo com achados clínicos e 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 ou ainda como, sadio exposto, quando a sorologia 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 (SOLANO-GALEGO et al., 2011 ; BRASILEISH, 2018).

1.3.5 Epidemiologia

A LV é uma doença de ampla distribuição, principalmente em países de clima subtropical e tropical. A ocorrência da doença em uma população depende da presença do vetor específico e um reservatório susceptível (TELES, 2011).

O reservatório da *L. infantum* no ambiente silvestre é principalmente a raposa, mas outros mamíferos silvestres podem apresentar a infecção também; na área urbana, o cão infectado é a principal fonte de infecção para os flebotomíneos (CAMPINO; MAIA 2008 ; TELES, 2011).

Transformações ambientais associadas a movimentos migratórios e ao processo de urbanização podem explicar, em parte, porque a LV, originalmente uma doença restrita às áreas rurais, passou a ocorrer de forma endêmica e epidêmica nas áreas urbanas de grandes cidades do norte brasileiro. O processo desordenado de ocupação urbana resultou em condições precárias de vida e destruição ambiental, fatores que também podem ter influenciado a emergência da doença no meio urbano (SILVA e GAIOSO, 2013).

No Brasil, a doença é presente em 21 das 27 unidades da federação, atingindo as cinco regiões brasileiras (BRASIL, 2010). Nos últimos dez anos, a média anual de casos de LV foi de 3.379 casos e a incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes. A letalidade aumentou de 3,4%, em 1994, para 5,5%, em 2008, o que representou um incremento de 61,8%. A letalidade média nos últimos 4 anos foi 6,3%. A doença é mais frequente em menores de 10 anos (58%) e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (61%) (SILVA, 2019).

No Brasil, aproximadamente 37.209 indivíduos foram acometidos por leishmaniose visceral entre 2001 e 2011, com uma taxa de letalidade de 6,8% (2.549 mortes), no estado do Pará houveram no mesmo período 3362 casos confirmados, no triênio 2014 à 2016 o estado foi o que mais relatou casos de pessoas doentes na região Nordeste do país (OPAS/OMS, 2019).

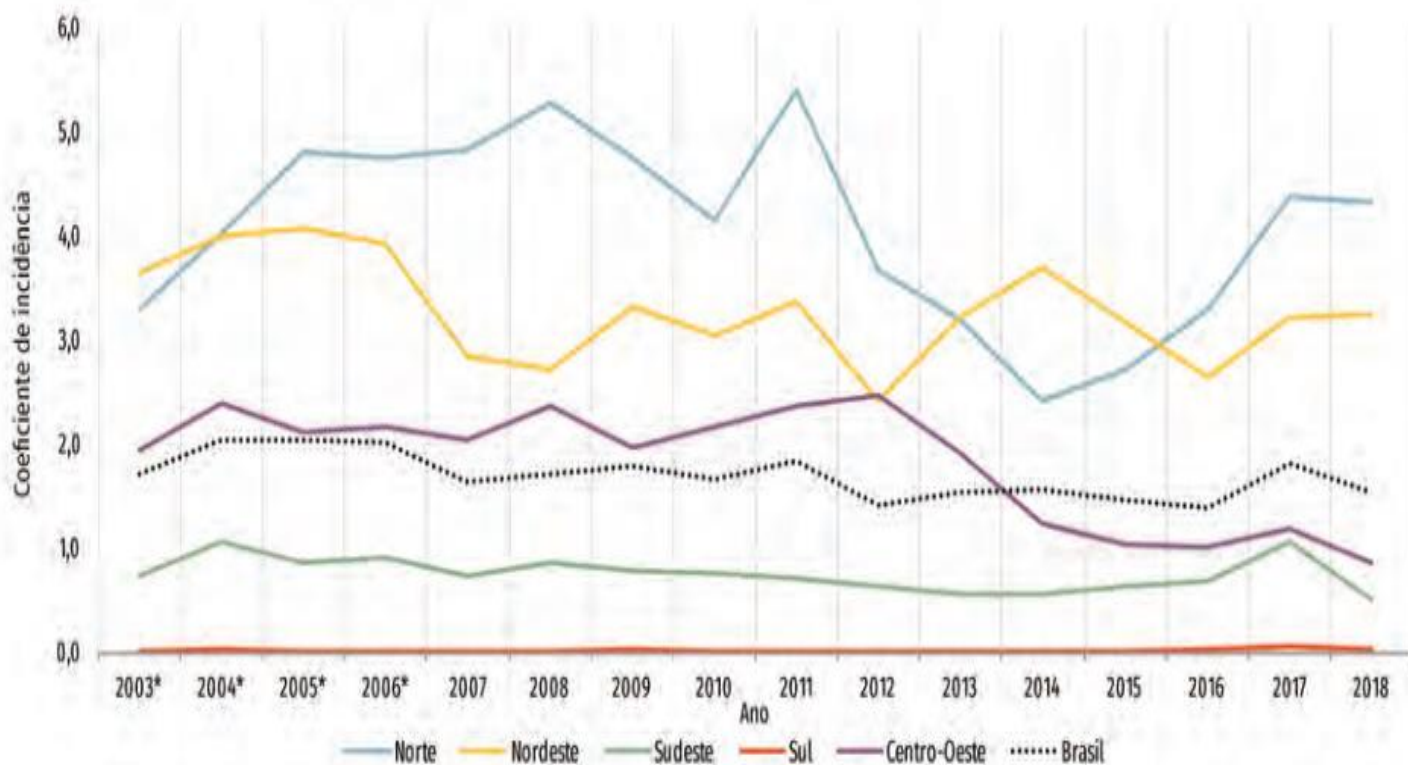
A partir dos anos 90, os estados Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro Oeste) e Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil (SILVA, 2019).

As razões para o aumento progressivo na casuística da Leishmaniose visceral na Amazônia brasileira nos últimos 30 anos não são completamente conhecidas, porém, alguns fatores parecem desempenhar papel essencial no desenvolvimento desse fenômeno, tais como: o desequilíbrio ambiental provocado pelo intenso desflorestamento, resultando na invasão do ambiente peridoméstico pelo flebotomíneo vetor, o processo socioeconômico advindo da intensa imigração de indivíduos não imunes ou infectados de outras regiões em busca de melhores condições de sobrevivência, a urbanização desordenada na

periferia das cidades com precárias condições sanitárias, a presença de grandes populações do cão doméstico errante, disseminando a infecção para o homem, o aprimoramento dos métodos de diagnóstico laboratorial e a melhora da performance no diagnóstico clínico da doença (SILVEIRA et al., 2016).

Atualmente, a região norte é a principal notificadora de casos de L. visceral no Brasil (figura 1), sendo que da região, nos últimos anos o estado com maior casos notificados de leishmaniose é o Pará, conforme pode ser visto na tabela 1.

Figura 1- Casos de LV por regiões geográficas no Brasil.



Nota: *Região de residência - após este período, dados tabulados por região de infecção.

Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)/MS. Data de atualização: 15/05/2019.

Tabela 1- Casos de Leishmaniose Visceral por cada 100 mil habitantes por estado da região norte do Brasil de 2013-2017.

Casos de Leishmaniose Visceral Notificados por UF na Região Norte de 2013-2017

Região Norte	2013	2014	2015	2016	2017
Rondônia	1203	1148	1044	851	959
Acre	923	1030	1058	800	963
Amazonas	1429	1801	1645	828	1865
Roraima	524	463	467	89	153
Pará	3058	4356	3610	1649	3231
Amapá	761	958	525	623	485
Tocantins	509	631	590	235	203

Fonte: DATASUS/2018

Em 2004, o Pará registrou com relação à leishmaniose visceral 368 casos confirmados, com incidência de 5,5 por 100.000 habitantes e letalidade de 28%, destacando que em 2005 a letalidade reduziu para 5,4%. Os municípios de Barcarena, Tomé-Açu e Santarém contribuíram com aproximadamente 30% dos casos. (BRASIL, 2000).

Em 2009, foram confirmados 275 casos de LV com um coeficiente de incidência de 3,7 casos por 100.000 habitantes. A letalidade foi de 2,9%, 56% evoluíram para cura clínica e 93,8% foram confirmados por critério laboratorial. O maior percentual de casos foi registrado no município de Conceição do Araguaia (14,6%), seguido dos municípios de Cametá (7,6%) e Barcarena (7,3%) (BRASIL, 2011).

Em 2011, os municípios que apresentam maior número de casos foram: Redenção (23,2), Tomé 23 Açu (20,4), Conceição do Araguaia (22,2), Cametá (25,8) e Igarapé Miri (20,2) (BRASIL, 2011).

Em 2015, foi notificado o primeiro caso humano da doença, assim como do primeiro caso canino na Região Metropolitana de Belém, capital do Estado, mais precisamente na ilha de Cotijuba, sendo a doença canina confirmada pelo Laboratório de Leishmanioses "Prof. Dr. Ralph Lainson", da Seção de Parasitologia do IEC. A partir desse achado, a Secretaria de Estado de Saúde Pública (SESPA) e a Secretaria Municipal de Saúde de Belém (SESMA),

juntamente com o Laboratório de Leishmanioses "Prof. Dr. Ralph Lainson", realizaram inquérito epidemiológico com vistas à vigilância da infecção canina por *L. infantum chagasi*, cujos resultados apontaram elevada prevalência (60%) na referida ilha, evidenciando uma situação bastante preocupante do ponto de vista epidemiológico, uma vez que a infecção canina já se encontra estabelecida na Região Metropolitana da Capital, requerendo medidas urgentes para conter sua expansão para a população humana (SILVEIRA et al., 2016).

Atualmente, no estado do Pará a leishmaniose visceral encontra-se instalada de forma endêmica e/ou epidêmica em dezenas de municípios do norte (Soure, Salvaterra e Ponta de Pedras, na ilha de Marajó), nordeste (Barcarena, Bujaru, Moju, Acará, Oeiras do Pará, Igarapé-Miri), oeste (Santarém, Juruti e Belterra), sudeste (Marabá e Parauapebas) e sul (Conceição do Araguaia e Redenção) do Estado do Pará, conforme pode ser visto na tabela 2 (SILVA, 2019).

Tabela 2- Casos de LV por municípios do estado do Pará.

LEISHMANIOSE VISCERAL - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação por município do estado do Pará-Brasil de 2016-2019

Município de Notificação	2016	2017	2018	2019	Total
Abaetetuba	9	7	6	4	26
Acará	4	5	10	3	22
Alenquer	0	0	0	1	1
Altamira	0	0	0	3	3
Ananindeua	27	17	21	15	80
Aurora do Pará	1	1	1	3	6
Baião	1	4	0	1	6
Barcarena	5	2	9	3	19
Belém	25	26	31	23	105
Belterra	0	0	0	1	1
Bom Jesus do Tocantins	0	0	1	0	1
Bragança	1	0	1	0	2
Breu Branco	0	0	0	1	1

Tabela 2 (continuação)

LEISHMANIOSE VISCERAL - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação por município do estado do Pará-Brasil de 2016-2019

Município de Notificação	2016	2017	2018	2019	Total
Bujaru	0	6	2	0	8
Cametá	20	28	30	8	86
Canaã dos Carajás	3	9	53	19	84
Castanhal	0	1	2	1	4
Conceição do Araguaia	9	39	21	3	72
Concórdia do Pará	0	4	5	4	13
Cumaru do Norte	0	1	1	0	2
Curionópolis	0	7	12	5	24
Dom Eliseu	1	2	3	1	7
Eldorado do Carajás	1	76	42	13	132
Floresta do Araguaia	0	0	13	2	15
Garrafão do Norte	3	1	4	1	9
Igarapé-Açu	0	0	0	2	2
Igarapé-Miri	12	9	4	8	33
Ipixuna do Pará	0	0	1	1	2
Irituia	0	0	0	1	1
Itupiranga	1	4	2	1	8
Jacundá	0	1	1	0	2
Juruti	0	0	1	0	1
Limoeiro do Ajuru	0	1	1	1	3
Mãe do Rio	0	3	1	0	4
Magalhães Barata	0	0	1	0	1
Marabá	92	90	58	42	282
Marituba	0	1	2	1	4
Mocajuba	0	9	1	2	12
Moju	3	6	6	6	21
Monte Alegre	0	0	0	2	2
Muaná	0	1	0	0	1
Novo Repartimento	0	0	1	5	6
Oeiras do Pará	6	1	3	0	10
Ourém	0	0	1	0	1
Ourilândia do Norte	0	0	0	4	4
Palestina do Pará	0	0	0	2	2
Paragominas	0	3	1	3	7
Parauapebas	2	14	78	58	152
Pau D'Arco	0	8	0	1	9
Piçarra	0	0	1	1	2
Ponta de Pedras	1	5	2	0	8
Portel	0	0	0	1	1

Tabela 2 (continuação)

LEISHMANIOSE VISCERAL - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação por município do estado do Pará-Brasil de 2016-2019

Município de Notificação	2016	2017	2018	2019	Total
Primavera	1	0	0	0	1
Redenção	68	75	37	14	194
Rio Maria	0	3	11	2	16
Rondon do Pará	0	0	0	1	1
Rurópolis	0	1	0	0	1
Salvaterra	1	2	1	0	4
Santa Izabel do Pará	1	0	0	0	1
Santa Maria das Barreiras	2	0	0	2	4
Santana do Araguaia	1	2	0	0	3
Santarém	16	7	14	10	47
São Domingos do Araguaia	0	9	3	0	12
São Domingos do Capim	0	13	6	1	20
São Félix do Xingu	0	1	1	1	3
São Geraldo do Araguaia	3	6	4	3	16
São João do Araguaia	0	0	2	1	3
São Miguel do Guamá	0	1	2	0	3
Sapucaia	0	0	0	2	2
Tailândia	4	8	8	2	22
Tomé-Açu	4	21	12	9	46
Tucumã	0	1	0	1	2
Tucuruí	14	7	8	11	40
Ulianópolis	0	1	0	1	2
Vitória do Xingu	0	0	1	0	1
Xinguara	0	13	18	4	35
Total	342	563	562	322	1789

Fonte : Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net2020

De acordo com o Ministério da Saúde os municípios do Pará que mais notificaram casos de leishmaniose no ano de 2019, conforme a tabela 2, foram: a capital Belém com 23 casos, Marabá com 42 casos e Paraupébas com 58 casos.

As cidades de Alenquer, Breu Branco, Belterra, Igarapé -Açu, Irituia , Monte Alegre, Ourilândia do Norte, Palestina do Pará, Portel e Rondon do Pará passaram de nenhum caso desde 2016 para cidades com a presença da doença em 2019, demonstrando um avanço da leishmaniose visceral pela região.

1.3.6 Imunopatologia

A presença de agentes patológicos em constante contato com os seres vivos levaram ao desenvolvimento de mecanismos de defesa contra patógenos, uma vez que estas características conferem vantagens adaptativas ao hospedeiro para sua prevenção (GASQUES et al., 2013).

Em animais, os principais processos estão associados ao sistema imune, que incluem a produção de anticorpos e macrófagos, a resposta imune (VAUX. STRASSER, 1996).

A resposta imune é fundamental para a defesa contra a maioria de agentes infectantes, entretanto em alguns casos os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune anormal. Em muitas dessas situações existe uma reação de hipersensibilidade com resposta imune exagerada e não modulada, causando sinais e sintomas e inflamação exacerbada na região e como consequência dano tecidual (MACHADO et al., 2004).

Em infecções ocasionadas por protozoários que atuam como parasitas intracelulares, o sistema imune do hospedeiro geralmente não é eficiente, contudo, em alguns casos o organismo pode contra-atacar por meio da morte programada das células infectadas, a apoptose (GASQUES et al., 2013).

Alguns parasitas conseguiram desenvolver um mecanismo de escape do sistema imune, entre outras ações inibindo as vias apoptóticas para conseguirem sobreviver por mais tempo. Entre os mais conhecidos protozoários que desenvolveram mecanismos para inibir as vias apoptóticas encontram-se o *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.*, *Theileria sp.*, *Cryptosporium parvum* e *Nosema algaerae* (MACHADO et al., 2004 ; GASQUES, et al., 2013).

No caso das infecções por *Leishmania sp.* ocorre uma ativação específica da resposta imunológica por parte do hospedeiro. Há uma expansão de vários tipos de células, que pode ser caracterizada pelo aumento de células T CD4⁺, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2. Se a resposta for do tipo Th1, citocinas como IL-2, IFN γ , TNF- α e IL-12 serão produzidas, ativando os macrófagos e, conseqüentemente, levando a destruição dos parasitos. Mas, se a resposta for do tipo Th2 serão produzidos IL-4 e IL-10, que inibem a ativação macrofágica e, conseqüentemente, as formas clínicas aparecerão (REIS, 2010).

Como mecanismo de proteção a *Leishmania* é capaz de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela persistência da infecção (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; REIS., 2010).

Paralelamente à existência de uma resposta imunológica por parte do hospedeiro, a sobrevivência e a persistência parasitária dependem de estratégias de escape da resposta imune inata e adaptativa (REIS et al., 2006). O parasita é capaz de interferir no metabolismo e na ativação dos macrófagos, especificamente nas cascatas bioquímicas de sinalização intracelular, na produção de óxido nítrico, no burst respiratório (produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófago) e na produção de citocinas, modulando negativamente a resposta imune, por meio da interação das moléculas expressas na sua superfície LPG (lipofosfoglicana) e gp 63 (glico proteína de superfície) com receptores presentes na superfície dos macrófagos (SOUZA, 2004).

A *Leishmania* também é capaz de diminuir a atividade da proteína quinase C (PKC) dos macrófagos, da interação do LPG, presente na superfície dos promastigotas, ou por meio dos fosfolipídeos de glicosilinositol (GIPL) encontrados na superfície dos amastigotas (MAUEL ; RANSIJIN, 1997). As formas amastigotas são capazes ainda de inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos através dos GIPLs presentes em sua superfície (MAUEL ; RANSIJIN, 1997).

Além disso, o parasita é capaz de modular a produção de citocinas pelos macrófagos, induzindo a produção de TGF- β pelos macrófagos e inibindo a produção de interleucina 12, necessária para que ocorra a ativação de resposta imune Th1 e efetiva eliminação do parasita (MAUEL ; RANSIJIN, 1997; SOUZA, 2004).

1.3.7 Métodos Diagnósticos de Leishmaniose

Na leishmaniose, como em muitas outras infecções sistêmicas, a detecção do agente é de suma importância para a confirmação da infecção em animais soropositivos e em estudos realizados com vetores e animais de vida livre para identificar reservatórios de infecção (LOPES et al., 2016).

O diagnóstico da leishmaniose visceral compreende a associação de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos (DIVE-SC, 2018).

Para a leishmaniose visceral os métodos diagnósticos que podem ser utilizados são ELISA, Imunocromatografia direta, PCR e teste de aglutinação direta, sendo que para o ministério da saúde já foram preconizados dois testes, um sorológico e outro parasitológico (PEREIRA, 2006 ; LOPES, 2018 ; DESJEUX, 2014 ; DIVE-SC, 2018).

Atualmente, o MAPA recomenda que sejam realizados 2 testes sorológicos para o diagnóstico da doença (DIVE-SC, 2018).

As duas técnicas sorológicas preconizadas pelo ministério da saúde são teste imunocromatográfico (TR DPP®) e ELISA, sendo o primeiro um teste rápido para triagem e o segundo confirmatório, devendo ser realizados pelo laboratório central do estado (LACEN) (DIVE-SC, 2018).

Também pode-se usar a detecção de antígenos, a identificação direta de amastigotas em esfregaços de biópsias, raspados ou esfregaços com coloração de Giemsa. A observação do parasita em análises citológicas, exame parasitológico, é considerado padrão ouro para o diagnóstico da leishmaniose. Os amastigotas são observados como corpos redondos ou ovais, com núcleos e cinetoplasto característicos (ELMAHALLAWY et al., 2014).

A sensibilidade da medula óssea corada é de cerca de 60 a 85%, já nos aspirados esplênicos a sensibilidade é de 93% (ELMAHALLAWY et al., 2014)

Existem estudo demonstrando a presença de antígeno leishmania na urina de pacientes com leishmaniose, um teste de aglutinação do látex (Katex, Kalon Biological, UK) para detecção deste antígeno se mostrou bom, com especificidade de 82-100%, porém sensibilidade baixa a moderada 47-95% (SARKARI et al., 2008 ; ELMAHALLAWY et al. , 2014).

O diagnóstico sorológico específico é baseado numa resposta específica. Os testes sorológicos, principalmente usados, são baseados em 4 formas, principalmente, o teste de imunofluorescência indireta, ELISA, western blot e teste de aglutinação direta (SARKARI et al., 2008 ; BRASIL, 2010)

1.3.7.1- Pesquisa de Anticorpos

Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da Leishmaniose Visceral humana e canina. Os testes diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes (SOUZA et al., 2013)

A detecção de anti corpos circulantes anti-leishmania utilizando técnicas sorológicas constitui-se um método importante de diagnóstico para a Leishmaniose Visceral Canina, onde animais doentes desenvolvem resposta imune humoral e produzem altos títulos de Imunoglobulina G anti-leishmania (JUNIOR, 2014).

Níveis elevados de imunoglobulina G2 (IgG2) foram associados a respostas protetoras, enquanto o aumento da produção de IgG1 foi considerado como mau prognóstico, IgE e IgA parecem ser detectadas principalmente em casos de doença ativa, mas com baixo valor preditivo e em cães assintomáticos (MIRÓ et al., 2018).

A performance dos testes diagnósticos é limitada pelo antígeno utilizado na técnica. De uma forma geral, são utilizados parasitos totais ou lisados, o que interfere na expressão da especificidade do teste, impedindo que alcance 100% (ALVES ; BEVILACQUA, 2004).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é um dos métodos diagnósticos aprovados para diagnóstico da doença pela Fundação Nacional de Saúde, embora apresente menor sensibilidade que outro teste sorológico, o ELISA (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

Apesar das divergências quanto a confiabilidade do RIFI e ELISA , essas duas técnicas são recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soro prevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, o ELISA já foi

recomendado para triagem de cães sorologicamente negativos e a RIFI para confirmação de cães soro-reagentes ao teste de ELISA (VIDAL, 2008).

Atualmente o ministério da saúde também reconhece como teste rápido para triagem o teste de imunocromatografia (DPP) do instituto Biomanguinhos (AZEVEDO, 2019). Na década de 1990, houve a introdução de técnicas cromatográficas no diagnóstico imunológico, surgindo assim a imunocromatografia para leishmaniose visceral. Essa técnica possui vários pontos positivos, como a rapidez com que o resultado é indicado, a facilidade de uso e a aplicabilidade em campo.

Em estudo conduzido em Minas Gerais o teste imunocromatográfico apresentou resultados, com sensibilidade entre 94 e 96% e especificidade de 100%, em teste realizado em 50 amostras de soro canino (FARIA e ANDRADE, 2012).

O ministério da Saúde, por meio da Nota Técnica Conjunta 01/2011, substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC, sendo utilizado o DPP® como teste de triagem e o ELISA como teste confirmatório. Sendo a eutanásia recomendada para animais positivos, falhas nesses resultados podem causar a eliminação de um número desconhecido de animais não infectados, e, por outro lado, não detectar casos positivos. Observa-se então que, apesar da grande variedade de métodos disponíveis para diagnóstico canino, ainda não se dispõe de um método bastante sensível, simultaneamente específico e de fácil execução (MORENO ; ALVAR , 2002 ; FARIA e ANDRADE, 2012).

1.3.7.2 ELISA

O teste de ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay), é um teste sorológico rápido e de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI e permite a triagem de um grande número de amostras utilizando microplacas revestidas de antígeno e um espectrofotômetro que determina os títulos de anticorpos por densidade óptica. (SOUZA, 2013 ; MIRÓ, 2018). A necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez com que o teste de ELISA sofresse

aprimorações e avaliações. Com isso começou-se a utilizar antígenos recombinantes ou purificados como glico proteínas de membrana gp63, gp72, gp70 e rK39, específicas do gênero *Leishmania*, melhorando a sensibilidade e a especificidade da técnica. Entretanto as reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos ainda pode ocorrer (ALVES e BEVILACQUA, 2004 ; MIRÓ, 2018).

O teste ELISA pode apresentar, dependendo do antígeno empregado, podemos ter uma sensibilidade que varia de 80 e 99,5% e uma especificidade entre 81 e 100 %. A sensibilidade e a especificidade deste método dependem do tipo de antígeno empregado (MIRÓ, 2018).

Métodos que usam antígenos promastigotas brutos são altamente sensíveis à detecção de infecções clínicas e subclínicas, mas têm especificidade menor do que os métodos que empregam outros antígenos. As proteínas recombinantes são consideradas bons antígenos candidatos para o diagnóstico de campo porque são facilmente adsorvidas e resultam em resultados confiáveis (RHALEM et al., 1999).

Entre eles, o antígeno de maior sucesso que passou do ambiente acadêmico para o clínico foi o rK39. Essa repetição de 39 aminoácidos de uma proteína relacionada à cinesina é altamente conservada e presente em espécies de *leishmania* (RHALEM et al., 1999 ; MIRÓ et al. , 2018)

O Programa Especial da OMS para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) avaliou cinco testes diagnósticos diferentes usando rK39 recombinante ou proteína recombinante derivada do gene cinesina de *L. donovani* da África Oriental, Brasil e Índia. As sensibilidades variaram de 36,8 a 100% e as especificidades de 90,8 a 100% em todas as regiões e condições (SOUZA et al., 2015 ; ELKAHOURY, 2008).

O potencial para quantificação absoluta de anticorpos torna o ELISA uma ferramenta poderosa e menos suscetível ao erro do operador. Um de seus pontos fortes é a possibilidade de usar combinações de múltiplos antígenos, aumentando assim a sensibilidade e / ou a especificidade do método (VIDAL, 2008).

1.3.7.3 Teste Imunocromatográfico Rápido - Dual Path Platform (TR-DPP ®)

O teste recomendado para diagnóstico da doença pelo MAPA foi registrado pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos BioManguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, sendo nomeado de DPP® Leishmaniose Visceral Canina, que fornece resultados em cerca de 15 minutos. O teste DPP® utiliza duas proteínas recombinantes K26 e K39 como antígeno, o que, aparentemente, pode promover maior sensibilidade e especificidade ao teste (JUNIOR, 2014).

No teste DPP® pode ser utilizado sangue, plasma ou soro de cães e pode ser indicado como um teste de triagem, permitiria que apenas casos positivos fossem levados para confirmação pelo ELISA, desonerando o Programa Nacional de Controle de Leishmaniose (PNCL). A partir de 2011 o MAPA pelo PNCL recomenda então que o DPP® seja utilizado como teste de triagem obrigatório para o diagnóstico da leishmaniose (ELMAHALLAWY et al., 2014)

Foi observado que todos os testes de detecção de anticorpos compartilham as mesmas desvantagens; os anticorpos permanecem positivos por muitos meses após a cura do paciente e não diferenciam entre a infecção atual e a passada, reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, além da possibilidade de teste positivo por conta de anti corpos maternos (BRAGA et al., 1998 ; JUNIOR, 2014 ; ELMAHALLAWY et al. , 2014).

Mesmo assim, a detecção de anticorpos circulantes anti-Leishmania utilizando técnicas sorológicas constitui-se em um instrumento importante no diagnóstico da doença. Animais doentes desenvolvem resposta imune humoral e produzem alto títulos de IgG anti-Leishmania. A soro conversão ocorre, aproximadamente, três meses após a infecção. Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100 % sensíveis e específicos, falhando ao detectar cães infectados no período pré-patente da doença (FERRER, 1999 ; JUNIOR, 2014)

Estes problemas podem ser solucionados com a utilização de técnicas mais sensíveis para detecção do parasita, como imuno-histoquímica e a PCR (JUNIOR, 2014).

1.3.7.4 Diagnóstico Molecular

Após a década de 1980, foram desenvolvidas diversas técnicas de biologia molecular para detectar e identificar parasitas do gênero *Leishmania*, sem a necessidade de se isolar o parasito em uma cultura. Esses estudos moleculares, conduzidos, sobretudo, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), é baseada na amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência conhecida do parasito (ANDRADE e FARIA, 2012).

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 (TRAVI, 2018 ; AZEVEDO, 2019).

A especificidade e sensibilidade do diagnóstico, irão depender da técnica utilizada (TRAVI, 2018 ; AZEVEDO, 2019).

Os alvos de amplificação mais comumente usados são o DNA nuclear, como o gene ribossômico (SSUrDNA) , DNA extra cromossômico, como DNA repetitivo de cinetoplastídeo (*kDNA*), genes de mini-exon e região do espaçador interno transcrito (*ITS*) ribossômico e mais recentemente o gene de catepsina L-like (SUNDAR; SINGH , 2018 ; ANDRADE e FARIA, 2012 ; SILVA et al. , 2019)

Estudos demonstram que a sensibilidade e especificidade da PCR para detecção de parasitemia de baixo nível são significativamente melhoradas através da realização de PCR Nested e Semi-Nested, que envolve dois conjuntos de iniciadores. Uma desvantagem da PCR nested é que este teste está propenso a contaminação e não são recomendados, exceto em laboratórios credenciado, mesmo assim, a sensibilidade e especificidade da PCR aninhada usando SSUrDNA no diagnóstico de LV são relatadas como 97% e 100%, respectivamente (SALAM et al., 2010).

Como mais recente dos marcadores temos a Catepsina L-like, pertencente ao grupo das cisteíno proteases, sem as quais as formas amastigotas e promastigotas não sobrevivem (MARKUS et al., 2020).

As sequências de Catepsina L-like têm sido utilizadas para inferir relacionamentos genéticos de diferentes espécies de tripanossomatídeos, conseguindo reproduzir coerentemente as deduções construídas com base nas sequências de SSU rDNA e gGAPDH (RODRIGUES, 2010).

O da Catepsina L-like conseguiu revelar uma variabilidade interespecífica em distintas espécies do gênero *Trypanossoma*, apresentando elevadas taxa de especificidade e sensibilidade (SILVA et al., 2019).

No gênero leishmania os estudos com esta cisteino protease eram realizados principalmente com algumas espécies de *Leishmania*, incluindo a *L. infantum* (SILVA, et al. 2019).

Em estudo realizado por SILVA et al., 2019 utilizou a catepsina L-Like como marcador para o diagnóstico de *L. infantum*. Utilizando estas sequências a análise in sílico destes iniciadores conseguiu demonstrar homologia apenas com sequências de *L. infantum*, não sendo observada complementariedade com outras espécies contidas no banco de dados, não sendo encontrado nem mesmo reações cruzadas com outros parasitas como *Trypanossoma*, *Ehrlichia* e *Babesia* (SILVA et al., 2019).

2. Justificativa

Sendo a leishmaniose uma zoonose presente em todo mundo, considerada uma doença parasitária grave e negligenciada, que é transmitida por um vetor de difícil controle, possuindo os cães domésticos, no meio urbano, como a principal fonte de infecção é de grande importância avaliar métodos diagnósticos e conseguir diagnosticar casos na população canina uma vez que os casos em cães ocorrem antes dos casos humanos (HENRICH, 2017)

No Brasil temos grande crescimento no número de casos diagnosticados, porém com a presença diversos métodos diagnósticos da doença disponíveis e recomendados, sendo que alguns podem apresentar reação cruzada com outras doenças ou então sensibilidade e especificidade não tão boas quanto necessário, se faz necessário maiores estudos para se conseguir uma escolha diagnóstica ideal, que consiga unir sensibilidade e especificidades altas em um único exame (HENRICH, 2017).

Segundo dados do ministério da saúde a região norte e nordeste do Brasil são as que possuem a maior presença de casos de leishmaniose visceral na região norte, sendo o estado do Pará com o maior número de casos nos últimos anos (GONTIJO ; MELO, 2018)

O município de Marabá é considerado endêmico, estando acima da média estipulada pela OMS que é de 5,23 casos para cada 100 mil habitantes, sendo portanto importante conseguir se fazer uma relação atualizada sobre o cenário de tal zoonose no município (DANTAS, 2019; HENRIQUES, 2019).

Apesar de estudos diagnósticos realizados em cães e dos casos notificados em humanos, não há estudos de prevalência de Leishmaniose Visceral Canina no município de Marabá.

3. Objetivo

Diagnosticar casos da Leishmaniose Visceral Canina causada por *Leishmania infantum* em cães do Centro de Controle de Zoonoses do município de Marabá, estado do Pará.

4. Material e Métodos

O estudo foi realizado no município de Marabá, estado do Pará, onde foram coletadas 400 amostras sangue e soro de animais do Centro de Controle de Zoonose, representando a população de cães da região.

4.1 Local de Estudo

O estado do Pará situa-se na região norte do Brasil, sendo o segundo maior estado do país em extensão territorial, com cerca de 1 247 954,666 km² sendo considerado o estado mais populoso da região com cerca de 8 690 745 pessoas no censo de 2020 e possuindo cerca de 50% da floresta Amazônica.

O estado do Pará é dividido em 144 municípios divididos em três regiões metropolitanas, Região Metropolitana de Belém com cerca de 1,5 milhões de habitantes, Região Metropolitana de Marabá com cerca de 284 mil habitantes e Região metropolitana de Santarém com cerca de 300 mil habitantes (MARABÁ, 2019)

O presente estudo realizou-se no município de Marabá, que se estende por 15 128,4 km², contando com 283 542 habitantes no último censo (2020).

O município de Marabá encontra-se no sudeste do estado do Pará, estando distante da capita Belém 485 km e localiza-se entre dois grandes rios, Itacaíunas e Tocantins (MARABÁ,2019)

A cidade é dividida em cinco núcleos urbanos distintos (distritos), Marabá Pioneira ou Velha Marabá localizada as margens dos rios, Cidade Nova, onde situa-se o aeroporto, Nova Marabá, onde os bairros recebem nomes de folhas numeradas , São Félix I e II, situados depois da ponte sobre o rio Tocantins e Morada nova, a 20 km de Marabá (figura 2).

O município é o quarto mais populoso do estado, com o terceiro maior PIB da região, sendo forte na pecuária e mineração.

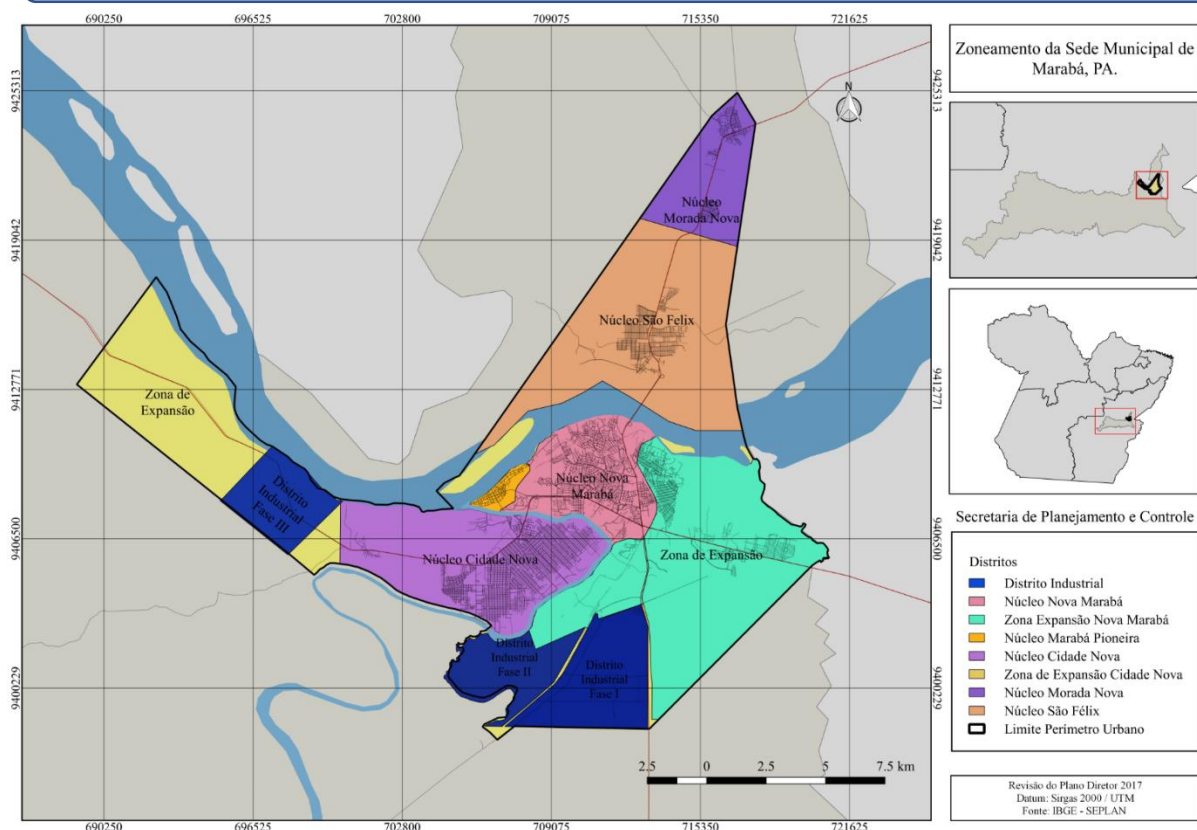
A região possui uma vegetação bem diversifica e com grande extensão de florestas, sendo representada por três principais tipos de florestas: floresta ombrófila aberta e densa, mais úmidas, e a floresta antrópica, onde já existe a

ação do ser humano sobre a vegetação nativa (BARROS,2009). É na região de Marabá que encontramos as maiores reservas florestais do país, sendo representadas pela Reserva Biológica do Tapirapé, com 1030 km², Floresta Nacional do Tapirapé-Aquiri, com 1900 km² e a terra indígena Mãe Maria com 644 880 km² (BARROS,2009). Atualmente a cidade possui uma área desmatada de aproximadamente 15161 km², segundo o Prodes (BRAZ,2010)

O clima na região é tropical semi úmido com temperatura média compensada anual em torno dos 27 °C, baixas amplitudes térmicas e índice pluviométrico elevado, próximo aos 1 900 milímetros anuais, concentrados entre os meses de dezembro e abril (BRAZ,2010)

Com mais de 2 200 horas de insolação, a umidade do ar é relativamente elevada, porém na estação seca (junho a setembro), conhecida como "verão amazônico", quando são registradas as maiores temperaturas do ano e as chuvas se tornam mais escassas, os valores despencam, aumentando a ocorrência de queimadas e ocasionando maiores áreas desmatadas (BARROS,2009).

Figura 2- Mapa do município de Marabá contendo seus distritos.



4.2 Obtenção das amostras de Cães

O número mínimo dos cães no município de Marabá foi estatisticamente calculado considerando uma população canina de 25000, frequência esperada de 50%, efeito do desenho 1.0 com nível de confiança de 95%.

Deste modo, foram coletadas amostras de sangue de 400 cães, sendo 189 fêmeas e 211 machos, recebidos ou atendidos no Centro de Controle de Zoonoses do município, provenientes de diferentes bairros, pertencentes a cinco núcleos urbanos que fazem parte do Distrito Sede Municipal.

As amostras coletadas foram de animais que em algum momento foram atendidos ou capturados pela equipe do Centro de Controle de Zoonoses.

De todos estes animais era obtido o distrito de origem. Assim, 223 são provenientes do distrito Cidade Nova, 97 do Nova Marabá, 16 do São Félix, 22 do Morada nova, 1 do Marabá Pioneira e 7 animais do Velha Marabá e 34 não tiveram sua origem informada (Tabela 3).

Tabela 3- Distrito de origem dos animais amostrados

Distrito de Origem dos Animais Coletados	
Nome do distrito	Quantidade de Animais
	N (%)
Sem Distrito	34 (8,5)
Cidade Nova	223 (55,75)
Nova Marabá	97 (24,25)
São Felix	16 (4)
Morada Nova	22 (5,5)
Marabá Pioneira	1 (0,25)
Velha Marabá	7 (1,75)
Total	400 (100)

Destes 400 animais foram obtidas amostras biológicas (sangue total e soro) obtidas através punção da veia safena lateral após antissepsia com álcool 70% com seringa de 3ml com agulha 20X5,5mm. Após a colheita o material, uma alíquota do sangue total foi acondicionada em microtubos e preservado em álcool absoluto (v/v). A amostra de soro foi separada por centrifugação e alíquotada em microtubo e congelada a -20C e enviado ao Unisa Research Center (URC LabVet) da Universidade de Santo Amaro.

4.3 Triagem sorológica

O exame sorológico para triagem dos pacientes foi realizado utilizando o soro dos cães, pelo método de imunocromatografia, utilizando o Kit de diagnóstico rápido DPP® para Leishmaniose canina, Biomanguinhos/Fiocruz para detecção de anticorpos anti-amastigotas K9/K26/K39, segundo instruções do fabricante.

4.4 Extração de DNA

Foi utilizado o método de extração e purificação de DNA através do Kit comercial Purelink (Thermofisher) das amostras de sangue total preservado em etanol absoluto dos animais amostrados, conforme instruções do fabricante.

4.5 Marcador molecular para o diagnóstico molecular

Para o diagnóstico molecular foi utilizado o gene de catepsina *L-like* através dos primers CatLeishF 5' GACAACGGCACCGTCGGCGCCAAAATAAAAG 3' e CatLeishR 3' CAGTACGGCGGTTTCGCTTGTCTGTTGAAGC 5'. 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 e colaboradores (2019).

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1.5%) em tampão TAE a 50V/100 mA. Após a eletroforese os géis foram corados com Syber Safe (Termofisher) e fotografados em transluminador de luz U.V

5. Resultados

Dos 400 cães amostrados, 78,5% (302/400) foram positivos para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pelo método de imunocromatografia (DPP®) e 59,3% (237/400) no diagnóstico molecular. Houve positividade em ambos os testes (sorológico e molecular) em 45,5% (182/400) das amostras.

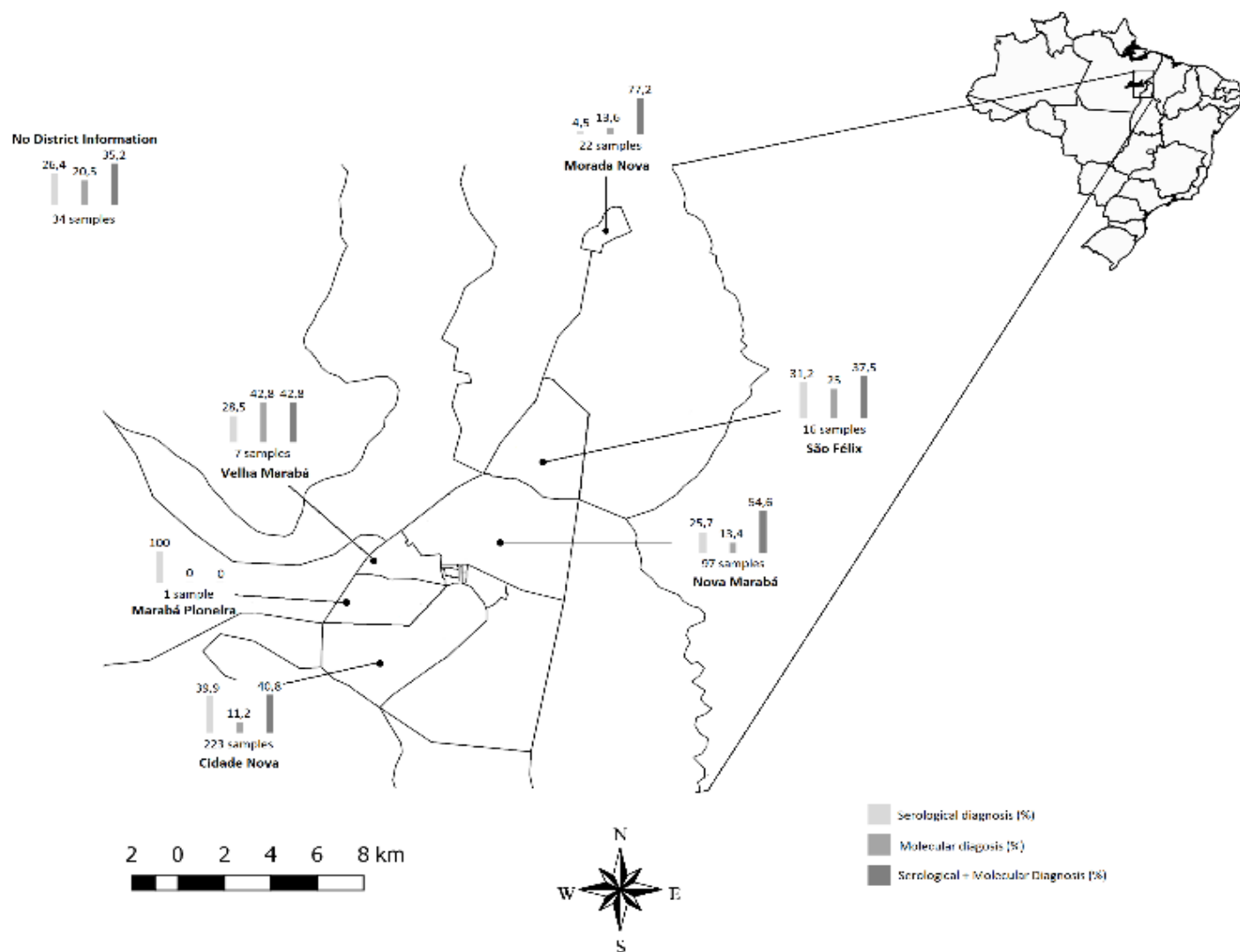
Tabela 4- Positividade dos cães amostrados por distrito pelos métodos sorológico e molecular.

Distrito	Positividade			
		DPP	PCR	DPP + PCR
	N	N (%)	N (%)	N (%)
Cidade Nova	223	78 (34,9)	25 (11,2)	91 (40,8)
Morada Nova	22	1 (4,5)	3 (13,6)	17 (77,2)
Nova Marabá	97	25 (25,7)	13 (13,4)	53 (54,6)
São Felix	16	5 (31,2)	4 (25)	6 (37,5)
Sem distrito	34	9 (26,4)	7 (20,5)	12 (35,2)
Velha Marabá	7	2 (28,5)	3 (42,8)	3 (42,8)
Marabá Pioneira	1	1 (100)	0 (0)	0 (0)
Total	400	120 (30)	55 (13,75)	182 (45,5)

N, número de animais

Dentre os distritos amostrados no estudo, Marabá Pioneira apresentou a maior positividade no diagnóstico sorológico (100% de positividade), enquanto Morada Nova apresentou maior positividade do diagnóstico molecular (77,2% de positividade). A maior positividade (77,2%) na associação de ambos os diagnósticos foi no distrito de Morada Nova (Tabela 4; Figura 3).

Figura 3- Distribuição geográfica das amostras positivas por distrito pelos diferentes métodos diagnósticos.



6. Discussão

Leishmaniose é uma zoonose transmitida por insetos flebotomíneos que estão representadas por cerca de 700 espécies distribuídas pelo mundo, das quais 400 espécies ocorrem no continente americano. Esta zoonose que pode causar a morte de seres humanos, cães, gatos e outros mamíferos (SUCEN, 2018). Os cães desempenham um papel importante na transmissão da Leishmaniose visceral por possuírem uma proximidade com o ser humano (BECK, 2013).

Este estudo foi realizado na área urbana do município de Marabá, que está situado na margem esquerda do rio Tocantins, sudeste do Estado do Pará, região pertencente ao bioma Amazônico. Este bioma vem sofrendo um processo de degradação contínuo por ações antrópicas (Castello & Macedo, 2016). Tais fatores favorecem a disseminação de algumas doenças, como a Leishmaniose visceral (GONTIJO & MELO, 2018).

O estado do Pará apesar do grande crescimento econômico e em urbanização, apresentado nos últimos anos, ainda apresenta grandes problemas sociais e ambientais. É considerado pelo ONU como a segunda pior educação pública do Brasil por meio do Programa da Nações Unidas para o Desenvolvimento (UNPD). Além disso, de acordo com o último boletim do desmatamento da Amazônia legal (julho/2020), o estado apresentou desmatamento de 1147 km².

O presente estudo mostrou uma prevalência de 78,5% (302/400) para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* e 59,3% (237/400) no diagnóstico molecular. Tais resultados demonstram a presença de ciclo epidemiológico bem estabelecida na região. Estudos anteriores detectaram a presença de anticorpos anti- *Leishmania* em 43,2% e 47,8% nos cães amostrados nos anos de 2016 e 2017, respectivamente (TRINDADE, 2019).

Os casos notificados pelo Ministério da Saúde em seres humanos tiveram um incremento superior a 100% no estado do Pará entre os anos de 2018 e 2019 (SAÚDE, 2019). Na região em estudo, município de Marabá, os números de casos de leishmaniose visceral humana são altos, sendo que em 2017 foram notificados 93 casos, 53 em 2018 e no ano de 2019, 40 casos (SAÚDE, 2019).

Mesmo com essa queda no número de casos no município, a região ainda é considerada endêmica, estando acima da média estipulada pela OMS que é de 5,23 casos para cada 100 mil habitantes, sendo importante uma relação atualizada sobre o cenário de tal zoonose no município (DANTAS, 2019; HENRIQUES, 2019).

Apesar do seu grande território florestal, a cidade de Marabá apresenta um grande aumento nos índices de desmatamento, tendo aumentado nos últimos 10 anos, passando de 8250,5 km² em 2010 para 8794,8 em 2019 conforme dados do PRODES, 2020 e quando comparados a outras cidades da região esse índice se mantém representativo.

Esse desmatamento pode ser justificado pois a cidade de Marabá vem crescendo seu território urbano e juntamente com a bovinocultura de leite e corte além da mineração, alavancam o crescimento econômico da região, mas ao mesmo tempo acabam sendo responsáveis em parte pela perda do grande território florestal da região.

A cidade de Marabá é definida por 12 distritos administrativos, um distrito Sede Municipal e 11 distritos que abrangem a zona rural e o município é cortado pelo Rio Tocantins. Dentre os distritos amostrados no estudo, Marabá Pioneira, Velha Marabá, Morada Nova e São Felix apresentaram os maiores índices de positividade nos diferentes testes (Tabela 4).

Os distritos de São Félix e Morada Nova situam-se no norte do município e na margem norte do Rio Tocantins e é caracterizado pela presença de assentamentos precários (ocupações irregulares), com áreas alagáveis e de proteção ambiental (PARÁ, 2018).

Nestas localidades, não apenas do ponto de vista habitacional, mas também da não existência de equipamentos públicos, como fonte de renda e a informalidade, determinam a necessidade da existência de outros núcleos mais consolidados (ONU-HABITAT, 2010). O distrito de Velha Marabá sofreu processos de inundações, com uma de grandes proporções na década de 80 o que favoreceu o surgimento dos distritos de Cidade Nova e Nova Marabá às margens da rodovia Transamazônica.

Estudos tem demonstrado a importância das rodovias no processo de expansão da Leishmaniose Visceral no Brasil (Matsumoto, 2019; Ferro, 2018; Paula et. al., 2016).

A leishmaniose visceral é considerada uma zoonose negligência pela Organização Mundial da Saúde e os dados obtidos neste estudo torna esta classificação evidente. A transmissão da leishmaniose esta normalmente relacionada a populações não assistidas com ausência de políticas públicas voltadas a interrupção da cadeia epidemiológica da doença, mas também sem assistência a saúde ou mesmo habitação tornando a população mais susceptível ao contato com o vetor e do vetor com os reservatórios do parasita. Soma-se a estes fatores, o processo contínuo de desmatamento do bioma amazônica que favorece a adaptação e colonização destas áreas com principal vetor da leishmaniose visceral.

7. Conclusão

A prevalência encontrada foi de 75,5 % (302/400) de positividade nos testes sorológicos e de 59,25% (237/400) de positividade no teste molecular.

A prevalência de animais positivos para os testes sorológico e molecular foi de 45,5% (182/400).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P.S. de et al. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v :54(2), p: 304–310, jun. 2010.

ALVES, W.A. ; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v: 20(1), p. 259-265, jan-fev, 2004.

ANDRADE, A.J.de . **Ecologia química de flebotomíneos (Diptera : Psychodidae: Phlebotominae): desenvolvimento de uma armadilha e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das espécies**. Orientador: Álvaro E. Eiras. 2010. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte,2010.

BARROS, V. L. C. **Caracterização da Pesca Artesanal no Município de Marabá-PA**. Orientadora: Ylana Priscila da Costa Melo. 2009. Trabalho de conclusão de curso para graduação em licenciatura plena em Biologia. Universidade do Estado do Pará, Belém, 2009.

BASTOS, T. S. A et al. Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral. Enciclopédia Biosfera, **Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 11, n.22, p 293-318, 2015.

BENCHIMOL, J. L.; GUALANDI, F. C. da ; BARRETO, D.C dos S. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930-1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências humanas**, Belém, v.14, n. 2, p. 611-626, maio-ago, 2019.

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.28 (1), p.121-134, jan, 1998.

BORGHESAN, T.C **Diversidade e filogenia de tripanossomatídeos parasitas de dípteros**. Orientadora: Marta Maria Geraldês Teixeira. 2013. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.São Paulo,2013.

BRAZ, A. Especial Marabá 96 anos: Lendas e mitos. **Marabá Online**, abril,2010. Disponível em: <http://www.marabaonline.com.br/maraba/lendas.html> Acesso em 15 outubro de 2020.

Braga M. D. M. *et al.* Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães soro reagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31(5), p. 419-424, 1998.

BRASIL, M. S. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2014.

BRASIL, M. S. **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, M. S. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2010.

GRUPO DE ESTUDOS EM LEISHMANIOSE ANIMAL (BRASILEISH). **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 set 2020.

CAMPINO, L. ; MAIA, C. Methods for diagnosis of canine Leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, n 158 (2008), p. 274-287, jul, 2008.

CARVALHO, E.M ; BACELAR, O. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75 (1), p. 24-34, jan-jun, 2005.

CARVALHO; M.R. de *et al.* Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica** v.116, p. 108-110, 2010.

CECÍLIO, P. *et al.* Exploring *Lutzomyia longipalpis* sand flies vector competence to *Leishmania major* parasites. **Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America**, v.222 (7), p. 1199-1203, out, 2020.

COSTA, V.P. da. Isolamento de *Trypanosoma caninum*, parasitas do gênero *Leishmania* e diagnostico molecular de *Leishmania infatum chagasi* em cães da região metropolitana de São Paulo. 2018. Orientador: Arlei Marcili. Dissertação de mestrado. Universidade Santo Amaro. Faculdade de Medicina Veterinária, São Paulo, 2018.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs or diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v.5,p.873-881, nov, 2007.

DANTAS, Amanda Sthefanie Ferreira et al. **O PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NA CIDADE DE MARABÁ- PARÁ NO PERÍODO DE 2007 A 2017**. Simpósio de doenças infecto-parasitárias na Amazônia. Belém/PA, 2019. Disponível em: <https://www.doity.com.br/anais/sdipa/trabalho/70510>. Acesso em: 18/09/2020

DEANE, Leônidas de Mello. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Rio de Janeiro, v. 10 (4), p. 431-444, 1958.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, mar, 2014.

DIAS, C. A. **Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com Leishmaniose Visceral naturalmente infectados no Distrito Federal**. Orientador :Marcio Botelho de Castro. 2008. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária,2008.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SANTA CATARINA (DIVE-SC). **Guia de orientação para vigilância da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**. Guia de Orientação Santa Catarina. Santa Catarina, 2018.

ELKHOURY, A. N. S. M. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24(12), p. 2941-2947, dez, 2008.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of Leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.8 (8), p. 961-972, mai, 2014.

ELNAIEM, D. A.; WARD, R.D. ; YOUNG, P.E. Development of *Leishmania chagasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the second blood-meal of its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). **Parasitology Research**, v.80, p. 414-419, jan, 1994.

FARIA, A. R; ANDRADE, H. M. de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3(2), p. 47-57, 2012.

FERRO, R. S. **Novo cenário da distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral no estado de São Paulo, com ênfase no oeste paulista**. Orientador: Luiz Euribel Prestes Carneiro. 2018. Dissertação de Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade do Oeste Paulista(UNOESTE), Presidente Prudente, 2018.

FONSECA, A. M. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral utilizando proteínas de *Leishmania infantum* com função desconhecida**. Orientadora: Héli da Monteiro de Andrade. 2013. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, 2013.

FREITAS, V. C. *et al.* *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. **International Journal for Parasitology** v. 41, p. 333-342, nov, 2010.

GASQUES, L. S.; GALVANINI, P. A.; FAVARETTO, F.; SANTANA T. F.; PAMPHILE, J. A. Independência ou morte: a apoptose como mecanismo de defesa. **Arg. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 1, p. 49-53, jan-abr. 2013.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7 (3), 2018.

GUALANDI, F. da COSTA. **Medicina tropical no Brasil: Evandro Chagas e os estudos sobre a Leishmaniose Visceral Americana na década de 1930**. Orientadora: Simone Petraglia Kropf. 2013. Dissertação de mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

HENRIQUES, O. Saúde: **Número de casos de Leishmaniose continua reduzindo em Marabá**. Assessoria de comunicação de Marabá, agosto, 2019. Disponível em <https://maraba.pa.gov.br/saude-numero-de-casos-de-leishmaniose-continua-reduzindo-em-maraba/> . Acesso em 09 setembro, 2020.

HENRICH, A. *et al.* **Leishmaniose canina**. XXII Seminário Institucional de Ensino , Pesquisa e Extensão, Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), Rio Grande do Sul, 2017.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) **Base de dados por municípios das Regiões Geográficas Imediatas e Intermediárias do Brasil 2017**.

JÚNIOR, A. F. da S. ; ARAÚJO, E. J. ; AMORIM, E. S. ; MATOS, P. C. M. Levantamento dos casos confirmados de Leishmaniose Visceral no estado do Pará em 2018. **Atas de Saúde Ambiental**, v. 8, p. 122-133 , jan-dez, 2017.

JÚNIOR, E. F. L. **Leishmaniose: vacina , tratamento ou sacrifício animal como estratégia de saúde única**. Encontro nacional de defesa sanitária animal do MAPA. 2017, Belém/Pará.

JUNIOR, E. A. M.; OLIVEIRA, R.C. ; SILVA, J. dos S. V. **O município de Marabá, PA frente ao zee na Amazônia Legal: Avaliação das taxas de desmatamento**. XVII Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada. Instituto de Geociências UNICAMP, Campinas, 2014.

JÚNIOR, F. E. F. de L. **Cenários da Leishmaniose Visceral no Brasil.** Simpósio Internacional Leishmaniose Visceral: Desafios para controle no contexto da diversidade de cenários. São Paulo, 2018.

JUNIOR, G.G. *et al.* Ensaio de campo da eficácia da vacina Leish-tec contra leishmaniose canina causada por *Leishmania infantum* em área endêmica com altas taxas de transmissão. **PLoS ONE**, v.12 (9) , set, 2017.

JUNIOR, M. V. de S. L. **Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP-Biomanguinhos com ELISA e RIFI no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.** Orientadora: Marcia Dalastra Laurenti. 2014. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, São Paulo, 2014.

JUNIOR, N. L.S ; MATION, L. F. ; SAKOWSKI, P. A. M. Efeito do desmatamento sobre Malária e Leishmaniose na Amazônia. **Desafios do Movimento**, ano 13, ed. 87, jun,2016.

KUHLS, K. *et al.* Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2(7), p. 261-278, 2008.

LAVITSCHKA, C. de O. *et al.* Occurrences of Phlebotomine sand flies (Diptera : Psychodidae) potentially associated with Leishmaniasis transmission in urban parks in the city of São Paulo, Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 34 (2), p. 151-153 , 2018.

MACHADO, P. R. L.; ARAUJO, M. .I. A. S. ; CARVALHO, L. CARVALHO, M. E. **Immune response mechanisms to infections.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 79 (6), p. 647-664, nov-dez,2004.

MARCILI, A. *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** v. 25 , p. 44-51 , 2014.

MARKUS, D. V. *et al.* Analysis in silico of Catepsin L-like of *Leishmania braziliensis*: search for new target for molecular diagnosis. **Brazilian Journal of Development**, v. 6 (6), p. 33264-33274, jun, 2020.

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.** Orientador : Raul Borges Guimarães.2019. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2019.

MAUEL, J. ; RANSIJN, A. *Leishmania spp.*: Mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Experimental Parasitology**, n. 87, p. 98-111, 1997.

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

MIRÓ, G. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, jan, 2018.

MORENO, J. ; ALVAR, J. Canine leishmaniasis:epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18 (9), p. 399-405, set, 2002.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS(ONU)-HABITAT. **Relatório ONU estados das cidades do mundo 2010/2011: Unindo o urbano dividido**. Relatório mundial ONU-HABITAT 2010/2011, 2010.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OPAS/OMS). Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas. **Informe de Leishmanioses n. 7**, março, 2019.

PAULA, E. M. N. *et al.* Análise espacial da leishmaniose visceral canina no estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, p. 156-159, 6 out. 2016.

PEREIRA, Y. N. O. *et al.* Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania sp* in sandflies (Psychodidae, Lutzomyia) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39(6), p. 540-543, nov-dez, 2006.

PETERS, W. ; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine: Biology and epidemiology**, vol 1, Orlando, Florida: Academic Press, 1987.

PREFEITURA MUNICIPAL DE MARABÁ. **Marabá- A cidade**. 2019 Disponível em: <https://maraba.pa.gov.br/a-cidade/>. Acesso em 05 out 2020.

PROJETO de ESTIMATIVA do DESFLORESTAMENTO DA AMAZÔNIA (PRODES). **PRODES 2020**. Disponível em: <http://www.dpi.inpe.br/prodesdigital/prodesmunicipal.php> . Acesso em 10 out 2020.

RÊGO, F. D. **Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil**. Orientadora: Célia Marai Ferreira. 2013. Dissertação de mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, 2013.

REIS, A. B. *et al.* Immunity to Leishmania and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Cell Press. Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n.7, p. 341-349,2010.

REIS, L. de C. , *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana . **Revista de Patologia Tropical**. v. 35 (2), p 103-115, 2006.

ROCHA, S. T. F da ; SHIOSI, R. K. ; FREITAS, A. B. M. Canine Visceral Leishmaniasis-Literatura review. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, ano XVII, n. 34 , jan-jun, 2020.

RODRIGUES, A. C. *et al.* Cysteine proteases of trypanossoma (Megatrypanum) theileri : cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. **Parasitology International**, v.59 (3),p. 318-325, set, 2010

RHALEM, A. *et al.* Immune response against Leishmania antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 81, p. 173-184, mar-out, 1999.

SALAM, M. A. *et al.* PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh. **Acta Tropica**, v. 113, p. 52–55, ago-set, 2010.

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

SARKARI, B. *et al.* A comparative study of antigen and antibody detection in visceral leishmaniasis using serum and urine-based ELISA. **Tropical Biomedicine**, v. 25 (2), p. 96-99, 2008

SAÚDE, M. da. Vigilância em saúde no Brasil 2003/2019. **Boletim epidemiológico do Ministério da Saúde**, n. especial, p.42-43, set, 2019.

SILVA, A. B. da **Ocorrência e aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Humana e Canina no município de Marabá, estado do Pará/Brasil, no período de 2015 a 2017**. Orientadora: Nazaré Fonseca de Souza. 2019. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, 2019.

SILVA, C. M. H. de S. ; WINCK, C.A. Leishmaniose visceral: uma revisão e literatura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16 (1) , jan-jul, 2018.

SILVA, E. S. ; GAIOSO, A. C. I. Visceral Leishmaniasis in Pará state. **Revista Paraense de Medicina**, v. 27 (2), abr-jun, 2013.

SILVA, L. A. M. T. **Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum***. Orientador: Milena de Paiva Cavalcante. 2017. Dissertação de mestrado em biociências e biotecnologia em saúde. Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

SILVA, R. E. da *et al.* Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19 (895), 2019.

SILVA, R. P. *et al.* The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 9–16, jan-fev, 2019.

SILVEIRA, F. T *et al.* Reviewing the trajectory of American visceral leishmaniasis in Brazilian Amazon: from Evandro Chagas to the current days. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v 7, p. 15-22, 2016.

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

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Histological and Immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected Dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, p. 7-12 , 2004.

SOUZA, D. M *et al.* Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9 (1), jan, 2015.

SOUZA, P. R. K. *Leishmania spp*: Mecanismos de infecção e evasão da resposta imune. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, ano II, n. 3, jan- jun, 2004.

SOUZA, Y. C. P. D. de ; CARVALHO, A. F. S. de ; MANSUR, V. F. R. Testes diagnósticos para Leishmaniose Visceral- Atualidade e Perspectivas. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, ano XI, n. 21 , jul-dez, 2013.

STEVENS, J. R. ; NOYES, H. A. ; SCHOFIELD, C. J. ; GIBSON, W. The Molecular evolution of Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, v. 48, 2001.

SUNDAR, S. ; SINGH, O. P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 22 (14) , p. 443-457 , ago, 2018.

TELES, E. J. C. **Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral em Barcarena, um município minerário no estado do Pará, Brasil**. Orientadora: Maria Garces dos Santos Silveira. 2011. Dissertação de mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, Belém, 2011.

TRAVI, B. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12 (1); p. 1-13 ; jan, 2018.

TRINDADE, E. L. *et al.* Desafios para o controle da Leishmaniose Visceral humana no Pará. **Brazilian Journal of health Review**, v.2 (6); p. 5488-5499; nov-dez, 2019.

VAUX, D. L. ; STRASSER A. The molecular biology of apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 93 , p. 2239-2244, mar, 1996.

VIDAL, I. F. **Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose visceral canina em Campina Grande, Paraíba, Brasil.** Orientador: Leucio Câmara Alves. 2008. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Manual of procedures for surveillance and control Leishmaniasis in the Americas. **Manual of procedures, surveillance and control.** Washington, D.C. 2019.