

UNIVERSIDADE SANTO AMARO – UNISA
Curso de Pós Graduação *Stricto Sensu*
Mestrado em Medicina e Bem-Estar Animal

Vilma Pereira da Costa

**ISOLAMENTO DE *Trypanosoma caninum*, PARASITAS DO GÊNERO
Leishmania E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Leishmania infantum*
chagasi EM CÃES DA REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO**

São Paulo

2018

Vilma Pereira da Costa

ISOLAMENTO DE *Trypanosoma caninum*, PARASITAS DO GÊNERO *Leishmania* E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Leishmania infantum chagasi* EM CÃES DA REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade de 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
2018**

Costa, Vilma Pereira da

Isolamento de *Trypanosoma caninum*, Parasitas do Gênero *Leishmania* e Diagnóstico Molecular de *Leishmania infantum chagasi* em cães da região metropolitana de São Paulo / Vilma Pereira da Costa – São Paulo, 2018
53 F.

Dissertação (Mestrado em Medicina e Bem-Estar Animal)
Universidade Santo Amaro, 2018

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili

1. *Trypanosoma* . 2. *Leishmania* 3. cães 4. Diagnóstico molecular. 5. filogenia. I. Marcili, Arlei, orient. II. Título

PARECER N.09 / 2016

Projeto de Pesquisa: "ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE TRYPONOSOMA CANINUM EM CÃES DA REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO"

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Arlei Marcili
Vilma Pereira da Costa

Curso: Mestrado em Bem Estar Animal

Prezado Pesquisador:

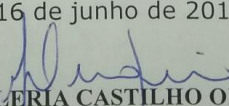
Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

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 **Aprovação** do Projeto " **ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE TRYPONOSOMA CANINUM EM CÃES DA REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO**"

*** Prezados Pesquisadores o CEUA solicita:**

- Relatório da pesquisa ao término do prazo estipulado no cronograma do projeto.
- Ser informado sobre qualquer alteração na metodologia informada no Projeto de Pesquisa.

São Paulo, 16 de junho de 2016


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

CEUA
Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais
UNISA - Universidade de Santo Amaro

Vilma Pereira da Costa

ISOLAMENTO DE *Trypanosoma caninum*, PARASITAS DO GÊNERO *Leishmania* E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Leishmania infantum chagasi* EM CÃES DA REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO

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

Cidade de São Paulo, 10 de dezembro de 2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Arlei Marcili

Prof. Dr. Jonas Moraes Filho

Prof. Dr. Herbert Soares

Conceito final: _____

“ Todo animal tem direito à atenção, aos cuidados e à proteção do Homem ”
(art.2, da Declaração Universal dos Direitos dos Animais)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe por sempre acreditar, incentivar e criar condições para que eu possa me dedicar aos estudos. Por toda força que me deu, mesmo em momentos muito dolorosos para uma mãe.

À minha família, principalmente minhas irmãs Elisabeth e Ângela que justificavam minha ausência e administraram meu consultório enquanto estive fora.

Ao meu cunhado Marcelo Suman que sempre encontra uma solução para os meus desafios.

Agradeço a Deus por ter enviado um anjo para me amparar e me completar nesse período tão difícil. Te agradeço Aguinaldo Souza da Silva por não ter desistido de mim, por me consolar e me incentivar a enfrentar as dificuldades.

Ao grande amigo David Soares Pereira Belém, pela amizade sincera e verdadeira, pelo apoio e solidariedade ao longo desses anos.

Ao meu orientador Arlei Marcili, pela excelente orientação, pela paciência, por não ter me abandonado, por ter permanecido até o fim. Pode ter certeza que o que aprendi é para a vida toda.

Aos colegas Ryan Emiliano da Silva e Juliana Isabel Giuli da Silva Ferreira por terem me ensinado a realizar as técnicas necessárias para obtenção dos resultados deste trabalho e aos colaboradores do VPS/FMVUSP por terem me auxiliado nesta trajetória. Sem vocês este trabalho jamais sairia do projeto.

A todos os estagiários que auxiliaram nos trabalhos de campo.

As técnicas Sheila e Sueli (VPS-FMVZ-USP) pelo sequenciamento das amostras.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

À FAPESP pelo incentivo financeiro.

RESUMO

Os tripanossomatídeos são parasitas, protozoários que apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, infectam animais invertebrados e vertebrados. Estão distribuídos em quinze gêneros, destes *Trypanosoma* e *Leishmania* possuem maior importância na medicina humana e veterinária. São mais de trinta espécies de *Leishmania*, vinte capazes de causar leishmaniose doença transmitida por flebotomíneos a lagartos e mamíferos incluindo o Homem. A leishmaniose pode ser cutânea, forma em que pode ocorrer cura espontânea ou visceral, forma severa que pode causar a morte. O cão oferece risco real no ciclo de transmissão ao homem por ser considerado o principal reservatório que vive próximo ao humano. Como forma de controle da doença o Ministério da Saúde recomenda a eutanásia de animais soropositivos, porém, estudos comprovam que na presença de tripanossomatídeos, cães podem apresentar resultados positivos para doença devido à reação cruzada nos testes sorológicos. Como agravante uma nova espécie foi isolada em 2006, o *Trypanosoma caninum*, que habita a pele de cães e que até o momento parece não causar nenhuma doença, mas os animais parasitados por ele ao serem submetidos aos testes de diagnóstico para leishmaniose, apresentam resultados positivos. Na região metropolitana de São Paulo não há estudos sobre a ocorrência do *T. caninum* e *Leishmania i. chagasi*. Os objetivos deste trabalho foram detectar e isolar estes parasitas através de diagnóstico molecular baseado no gene catepsina L-like para *Leishmania*. O isolamento utilizou meio axênico e a caracterização molecular foi realizada utilizando os marcadores SSUrDNA e gGAPDH, além de análise filogenética baseado nas sequências SSUrDNA e gGAPDH. Foram coletadas duzentas e uma amostras de pele de cães por biópsia com punch de três mm para isolar *T. caninum* e *L. i. chagasi*; punção por agulha fina de linfonodo poplíteo para isolar *L. i. chagasi* e um ml de sangue venoso para realização das PCRs de cães de sete dos trinta e nove municípios da região metropolitana de São Paulo, incluindo São Paulo capital. Todas as biópsias de pele foram negativas para *T. caninum* e uma positiva para *Leishmania i. chagasi*. Das punções dos linfonodos poplíteos nove foram positivas e cinquenta amostras de sangue venoso foram positivas nas reações de PCRs. Na análise filogenética dos isolados 100% de similaridade com a espécie *Leishmania infantum chagasi*. Um dos isolados é de um cão residente no município de São Paulo. Dos cães incluídos no estudo 90% são residentes ou residiram em abrigos, nenhum deles havia sido submetido a nenhuma técnica para diagnóstico de leishmaniose e muitos já haviam sido expostos em feiras de adoção. Não há nenhuma lei que regulamente as feiras de adoção no sentido de atestar saúde do animal, assim como não há legislação que regulamente o trânsito de animais domésticos que inclua testes para a doença. Esse cenário é muito preocupante se considerar que o número de casos entre humanos é crescente e o Brasil representa 90% dos casos registrados nas Américas. É necessário que mais estudos sejam realizados para que as autoridades de Vigilância Sanitária tenham mais recursos para traçar novas formas de combate à doença.

Palavras chave: *Trypanosoma caninum* , *Leishmania*, Cães, diagnóstico molecular, filogenia.

ABSTRACT

Trypanosomatids are protozoa parasites, that present a great diversity of hosts, infecting invertebrate and vertebrate animals. They are distributed in fifteen genera, among which *Trypanosoma* and *Leishmania* have the most significance in human and veterinary medicine. There are more than thirty species of *Leishmania*, and twenty are able to transmit leishmaniasis disease through bites of sandflies to lizards and mammals including man. Leishmaniasis can be cutaneous, a form which can have spontaneous cure, or visceral a severe form that can cause death. The dog offers real risk in the cycle of transmission, because it is considered the main reservoir and lives close to the human. As a form of control of the disease, the Ministry of Health recommends the euthanasia of seropositive animals, however, studies show that in the presence of any kind of trypanosomatids, dogs may present positive results for leishmaniasis due to cross-reaction in the serological tests. As an aggravating factor, a new species was isolated in 2006, *Trypanosoma caninum*, that inhabits the skin of dogs and that, to the present moment, does not seem to cause any type of disease, but the parasitized animals present positive serology for leishmaniasis. In the metropolitan region of São Paulo there are no studies on the occurrence of *T. caninum* and *Leishmania i. chagasi*. The aim of this studies were to detect and isolate these parasites by molecular diagnosis based on the cathepsin L-like gene for *Leishmania*. Isolation used axenic ways and the molecular characterization was performed using the SSUrDNA and gGAPDH markers, also phylogenetic analysis based on the SSUrDNA and gGAPDH sequences. Two hundred and one dog skin samples were collected by three millimeter punch biopsy in face to isolate *T. caninum* and *L. i. chagasi*; also was dided needle puncture of the popliteal lymph node to isolate *L. i. chagasi* and It was also collected one milliliter of venous blood to perform the PCRs of dogs from seven of the thirty nine cities of the metropolitan region of São Paulo, including the capital, São Paulo. All skin biopsies were negative for *T. caninum* and one was positive for *Leishmania i. chagasi*. Nine popliteal lymph node punctures were positive and fifty venous blood samples were positive in PCR reactions. In the phylogenetic analysis of the isolates, we have 100% similarity with the species *Leishmania infantum chagasi*. One of the isolates is from a resident dog in the municipality of São Paulo. Of the dogs included in the study, 90% are residents or have resided in shelters, none of them had undergone any diagnostic technique for leishmaniasis, and many had already been exposed at adoption fairs. There is no law that regulates adoption fairs to attest animal health at the disposal of adoption, just as there is no legislation regulating the transit of domestic animals that includes tests for the disease. This scenario is very worrying, considering that the number of cases of humans with leishmaniasis is increasing and Brazil represents 90% of the cases registered in all Americas. further studies are needed to enable health authorities to devise new ways of combating disease.

Key words: *Trypanosoma caninum*, *Leishmania*, Dogs, molecular diagnosis, phylogeny.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAB	Blood Agar Base
CBT	Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos
DPP	Dual Path Platform
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
gGAPDH	Gliceraldeido-3-fosfato-desidrogenase glicossomial
gp63	Glicoproteína 63
LIT	Liver Infusion Tryptose
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SSUrDNA	DNA ribossomal de subunidades pequenas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Gênero <i>Leishmania</i>	14
1.2 Gênero <i>Trypanosoma</i>	18
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4 MATERIAIS E MÉTODO	
4.1 Área de Estudo	25
4.2 Identificação e Exame Físico	26
4.3 Obtenção de Amostras Biológicas	26
4.4 Isolamento do <i>T. caninum</i>	27
4.5 Isolamento de <i>Leishmania</i>	28
4.6 Preservação dos Isolados	28
4.7 Extração de DNA e Reações de Amplificação	28
4.8 Purificação e Sequenciamento	29
4.9 Alinhamento das Sequências Obtidas e Inferências Filogenéticas...29	
5 RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO	52

Introdução

O gênero *Trypanosoma* pertence à Família Trypanosomatidae, que compreende protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida (HONIBGERG,1963). Os organismos da ordem Kinetoplastida estão divididos em duas subordens: a) Bodonina, que compreende parasita e espécie de vida livre; b) Trypanosomatina, que apresenta apenas a família Trypanosomatidae, cujos membros são todos parasitas.

A família Trypanosomatidae alberga protozoários flagelados do Filo Euglenozoa, classificados tradicionalmente na ordem Kinetoplastida. Esses organismos compreendem espécies de importância médica humana e veterinária e são de interesse ecológico e ambiental. Esse grupo de protistas está posicionado nas árvores filogenéticas em um grande clado de flagelados denominado Excavata, que é formado além do filo Euglenozoa, por protozoários que não apresentam mitocôndria (exemplo, *Giardia* e *Trichomonas*) e pelos flagelados denominados “jakobids” (CAVALIER- SMITH, 2004).

Os tripanossomatídeos apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, infectando animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens. Estes organismos, depois dos nematóides, são os eucariotos que apresentam a maior variedade de hospedeiros e distribuição geográfica (VICKERMAN, 1976; 1994; STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006).

Os tripanossomatídeos podem ser parasitas monoxênicos ou heteroxênicos e, de acordo com as formas apresentadas durante o

desenvolvimento, estão distribuídos em quinze gêneros: onze compreendem protozoários monoxênicos parasitas de insetos *Angomonas*, *Blastocrithidia*, *Blechomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Paratrypanosoma*, *Rynchoidomonas*, *Sergeia*, *Strigomonas* e *Wallaceina* (PODLIPAEV, 1990; SVOBODOVA et al., 2007; BORGHESAN, 2013; GOMES, 2014; ISHEMGULOVA et al., 2017); três albergam espécies heteroxênicas cujos ciclos ocorrem em alternância entre hospedeiros invertebrados (geralmente artrópodes hematófagos) e vertebrados (*Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*) ou entre invertebrados, insetos fitófagos; um hospedeiro vegetal (*Phytomonas*) (WALLACE, 1966; HOARE, 1972; VICKERMAN, 1976; CAMARGO, 1998). Os gêneros *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas* são polifiléticos e necessitam de revisões taxonômicas (MERZLYAC et al. 2001; HUGHES & PIONTKIVSKA 2003a; 2003b; HOLLAR & MASLOV1997).

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitam vertebrados de todas as classes (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos,) com ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias, enquanto os parasitas de anfíbios e peixes são transmitidos por sanguessugas e insetos. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* são transmitidos apenas mecanicamente nas Américas. As espécies desse gênero apresentam vários estágios, presentes em diferentes combinações, no sangue e/ou tecidos, nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (HOARE,1972, VICKERMAN,1994, STEVENS et al. 2001, SIMPSON et al. 2006).

1.1 Gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* constitui um grupo importante de parasitas transmitidos pela picada de flebotomíneos infectados para espécies de lagartos e mamíferos incluindo a espécie humana. (MARCILI et al., 2014 e SUZUKI et al, 2016). Este gênero abriga trinta espécies, até o momento, e vinte capazes de causar uma doença complexa denominada leishmaniose (SUZUKI et al, 2016).

As leishmanioses constituem um grupo de doenças parasitárias com ocorrência em países tropicais e subtropicais em ciclos zoonóticos e antroponóticos. A severidade da doença varia em acordo com a forma: a cutânea é mais branda, causa lesões na pele e pode apresentar cura espontânea; já a visceral é a mais grave (SOLANO et al, 2009 e MARZOCHI et al, 1985).

Estes protozoários apresentam duas formas morfológicas em seu ciclo: amastigota e promastigota. A promastigota é encontrada no tubo digestivo dos flebotomíneos (fêmeas) e as amastigotas são formas intracelulares obrigatórias das células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) dos vertebrados (ALVES, et al, 2012).

As fêmeas dos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo ingerem os macrófagos ou monócitos com as formas amastigotas através do sangue ou linfa intersticial em vertebrados hospedeiros (DIAS, 2015). No tubo digestivo dos flebotomíneos, as amastigotas são liberadas do interior dos macrófagos lisados e diferenciam-se em promastigotas (DIAS, 2015).

As formas promastigotas prendem-se à parede do tubo digestivo através de lipofosfoglicanos expressos na membrana do parasita após atravessarem a matriz peritrófica. Ocorrem múltiplas divisões e é desencadeado o processo de

metaciclogênese. Neste processo, as promastigotas sofrem modificações nos lipofosfoglicanos expressos em sua superfície e perdem sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino dos insetos. As formas promastigotas metacíclicas migram para a faringe e cavidade bucal do inseto e são transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo (DIAS, 2015).

As formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas inicialmente por neutrófilos e, posteriormente, por macrófagos ou células dendríticas (POLI, et al., 2002; BANETH, et al., 2008). No interior dos vâcuolos parasitóforos, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária levando ao rompimento da célula parasitada macrófago; as amastigotas liberadas devido ao rompimento dos macrófagos são fagocitadas por outros macrófagos (PENNA, 1934). O ciclo continua quando flebotomíneos realizam repasto sanguíneo em animais vertebrados portadores de leishmanias e são infectados, transmitindo-as a novos hospedeiros vertebrados.

As espécies de *Leishmania* estão distribuídas no Velho e Novo mundo, sendo que as espécies que causam leishmaniose na América Latina estão divididas em dois grupos: o grupo que compreende o subgênero *Viannia*, constituído pelas espécies *Leishmania (Viannia) brazilienses*, *Leishmania (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, responsáveis pelas infecções cutâneas e mucocutâneas e o grupo formado pelo subgênero *Leishmania* constituído pelas espécies *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsáveis pelas lesões cutâneas difusas (LOPES et al, 2016).

As espécies causadoras de leishmaniose visceral são: *L. (L.) donovani*, na Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão; *L. (L.) infantum*, na região do Mediterrâneo (Europa e África) e *L. (L.) chagasi* em diferentes países da América (Novo Mundo) (LAINSON, 1983). Recentemente a taxonomia da espécie causadora de leishmaniose visceral nas Américas foi revista e sugeriu-se o uso de *L. (L.) infantum chagasi*, pois diversos estudos baseados em biologia celular e molecular não conseguiram distinguir *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* sendo o principal vetor *Lutzomyia longipalpis* (MAURÍCIO et al., 1999; MAURÍCIO et al., 2000; KUHLS et al., 2005; QUISPE-TINTAYA et al., 2005).

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

O complexo *Leishmania donovani* que inclui todas as espécies capazes de causar sintomatologia visceral principalmente e tegumentar possui ampla distribuição (Velho e Novo Mundo). Assim, para o entendimento das relações destas diferentes espécies e diferentes origens geográficas foram realizados diversos estudos utilizando vários marcadores moleculares, como o espaçador interno transcrito do gene ribossômico (MAURÍCIO et al., 2004; KUHLS et al., 2008), gp63 (MAURÍCIO et al., 2001; QUISPE TINTAYA et al., 2004), mini-exon

(MAURÍCIO et al., 2004), cisteíno proteases (QUISPE TINTAYA et al., 2004), citocromo oxidase II (IBRAHIN et al., 2001) e microssatélites (KUHLS et al., 2007; LUKES et al., 2007). Estes 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 SSU rDNA e 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 através dos valores de divergência destas sequências e história evolutiva de seus hospedeiros vertebrados (MARCILI et al., 2013) contrastando com o cenário de introdução mais antiga com *L. chagasi* sendo uma espécie nativa das Américas (LAINSON e SHAW, 1978).

O vetor envolvido na transmissão da leishmaniose visceral canina (LVC), ao cão e ao homem, é da espécie *Lutzomyia longipalpis*, conhecido popularmente no Brasil como mosquito palha (JUNIOR, 2011).

Estima-se que a leishmaniose visceral humana tenha maior prevalência em países da América do Sul. Inicialmente era descrita como doença de ambiente silvestre ou rural, porém hoje em dia, já é apontada como doença reemergente, com incidência crescente e em processo de urbanização em grandes e pequenas cidades (JUNIOR, 2011).

No Brasil, a Leishmaniose visceral é uma doença endêmica e em expansão. O Ministério da Saúde do Brasil, na busca do controle da LV, preconiza a eutanásia de cães soropositivos, controle de vetor, diagnóstico precoce e

tratamento de casos humanos como está disposto no Decreto nº 51838 de 14 de março de 1963; porém essas medidas não têm surtido o efeito esperado na redução dos casos humanos (Ministério da Saúde, 2006).

A nota técnica nº11/2016 CPV/DFIP/DAS/GM/MAPA, autoriza registro do produto Milteforam para tratamento de leishmaniose em cães, porém o Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) orienta os médicos veterinários que realizem a eutanásia de cães positivos por entender que o tratamento não impede a transmissão. O CFMV afirma que faltam estudos que comprovem que não há risco de transmissão da doença em cães sob tratamento.

O cão é o principal reservatório doméstico do protozoário *Leishmania*, ou seja, é portador assintomático, não apresenta sinais da enfermidade (WOO, 2010, da COSTA et al, 2015).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença crônica e grave, tem alto potencial zoonótico, é uma enfermidade de grande importância para a saúde pública no Brasil e em outros países emergentes.

1.2 Gênero *Trypanosoma*

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitam vertebrados de todas as classes (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos) com ciclo de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias, enquanto os parasitas de anfíbios e peixes são transmitidos por sanguessugas e insetos. As espécies desse gênero apresentam vários estágios,

presentes em diferentes combinações, no sangue e/ou tecidos, nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (HOARE,1972, VICKERMAN, 1994, STEVENS et al. 2001, SIMPSON et al. 2006).

As espécies do gênero *Trypanosoma* que são parasitas de mamíferos foram separadas em Seções: Salivaria e Stercoraria, de acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado. A Seção Stercoraria compreende os subgêneros *Schizotrypanum* (espécie-tipo *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) e *Megatrypanum* (*T. theileri*) (HOARE, 1972). Na Seção Salivaria as formas infectantes estão presentes na glândula salivar no inseto vetor e são inoculados no hospedeiro vertebrado, enquanto na Seção Stercoraria as formas infectantes estão presentes na porção final do tubo digestivo e são eliminadas juntamente com as fezes (HOARE, 1972).

No subgênero *Schizotrypanum* as espécies são morfologicamente indistinguíveis e parasitam exclusivamente morcegos, com exceção de *T. cruzi*, que infecta o homem, mamíferos silvestres e domésticos (HOARE, 1972). *Herpetosoma* é um subgênero que compreende tripanossomas que não são patogênicos para seus hospedeiros mamíferos. As espécies deste subgênero são representadas por dois grupos principais: i) *T. lewisi* : grupo constituído por parasita de rato e mais de 80 espécies de animais silvestres; ii) *T. rangeli*: grupo relacionado constituído por isolados humanos, de triatomíneos e de animais silvestres (HOARE, 1972).

Os tripanossomas do subgênero *Megatrypanum* infectam animais domésticos e silvestres, abrangendo praticamente todas as ordens de mamíferos,

incluindo diversas espécies de animais silvestres das ordens Artiodactyla, Rodentia, Marsupialia, Chiroptera, Edentata e Primata (HOARE, 1972).

Os cães domésticos podem ser parasitados por diferentes espécies de tripanossomas. Na região Norte e Centro-Oeste do Brasil os cães são parasitados por *T. cruzi*, *T. rangeli* e *T. evansi* (FREITAS et al., 2018; VALLEJO et al., 2007; SAVANI et al., 2005) e nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste foi descrito a infecção por *T. caninum* (MADEIRA et al., 2009)

As formas biológicas do *T. caninum* presentes no vertebrado, seu hospedeiro, vetor e seu ciclo natural ainda são desconhecidos. Contudo, a caracterização molecular mostra que não está relacionada com *T. cruzi* ou *T. rangeli*, e a análise de sequências do gene SSUrDNA (18S) apontam para *T. pestanai* e *Trypanosoma sp. wombat* como espécies mais próximas (BARROS et al., 2012).

Os primeiros relatos de *T. caninum* fora do Rio de Janeiro nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás que somados aos casos do estado do Rio de Janeiro chegam a 53 casos de infecção natural pelo parasita, o que chama a atenção para um cenário epidemiológico recém descrito no Brasil (BARROS et al., 2012).

O número de casos de LV em humanos tem aumentado nas últimas décadas no Brasil tendo maior prevalência em centros urbanos e é responsável por 90% dos casos nas Américas. Ainda que um grande número de portadores seja assintomático, quando não há tratamento um quadro de infecção progressiva se instala e geralmente evolui para o óbito (FUKUTANI et al. 2014).

Há limitações nas técnicas utilizadas para diagnóstico que dificultam a obtenção de um diagnóstico preciso. Os cães domésticos podem ser parasitados por *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* e *T. rangeli* e recentemente, uma nova espécie foi descrita parasitando cães, o *Trypanosoma caninum* (MONTENEGRO et al., 2002 e DS PINTO, 2010). A presença desses parasitas pode causar reação cruzada em testes como a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) (LUCIANO et al., 2009).

Em regiões endêmicas para doença de chagas por exemplo, a RIFI utilizada para diagnosticar leishmaniose pode apresentar reação cruzada com antígenos de *T. cruzi* principalmente pela proximidade filogenética dos parasitos (LUCIANO et al., 2009).

O *T. caninum*, isolado pela primeira vez a partir de pele saudável de um cão infectado por *Leishmania visceral brazilienses* no município do Rio de Janeiro (MADEIRA et al., 2006), mostra se importante nos inquéritos epidemiológicos, visto que pode apresentar reação cruzada com *Leishmania sp*.

Em 2009, dos 19 cães em que foram isolados *T. caninum* no estado do Rio de Janeiro, 18 apresentaram boa clínica e condições dermatológicas que sugerem que este parasita não seja patogênico. O parasita não pode ser isolado por hemocultura, mostrando não ter preferência por sangue periférico. A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* apresentou reatividade sendo que parasitas do gênero *Leishmania* não foram encontrados nestes animais indicando reação cruzada (DS PINTO et al., 2010; ALVES, 2012).

Os testes sorológicos podem não ser eficientes e levar a eutanásia cães que não sejam portadores de leishmaniose já que outras espécies de

tripanossomatídeos podem estimular o sistema imunológico humoral de cães infectados produzindo anticorpos específicos que possam reagir de forma cruzada com *Leishmania* em testes sorológicos (BARROS *et al.*, 2012; HIRSCHMANN *et al.*,2015).

Em um estudo em que se avaliou a reação cruzada em testes sorológicos, cães infectados naturalmente por *T. caninum*, e somente por esta espécie, foram positivos sorologicamente para *Leishmania* (ALVES *et al.*,2012).

2 JUSTIFICATIVA

Na região metropolitana de São Paulo não há estudos sistematizados sobre a ocorrência de *Trypanosoma caninum* e *Leishmania infantum chagasi*. Entretanto, diversas espécies de flebotomíneos foram identificadas na região do Horto Florestal e Parque Estadual da Serra da Cantareira. Além disso, existem relatos em diversas clínicas da região metropolitana de São Paulo de atendimento a cães com sintomatologia correspondente a leishmaniose visceral canina e com exames sorológicos e moleculares positivos, mas nunca foram obtidos isolados deste parasita.

O único estudo conduzido no município de Cotia descreveu pela primeira vez nas Américas um caso autóctone de *Leishmania infantum chagasi* em felinos (SAVANI et al., 2004).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo principal detectar *Trypanosoma caninum* e *Leishmania* em cães domésticos amostrados da região metropolitana de São Paulo.

3.2 Objetivos específicos

1. Isolamento em meio axênico de parasitas da espécie *Trypanosoma caninum* e *Leishmania* de cães domésticos da região metropolitana de São Paulo;
2. Diagnóstico molecular de *Leishmania infantum chagasi* baseado no gene de Catepsina L-like em cães domésticos da região metropolitana de São Paulo;
3. Caracterização molecular através de marcadores clássicos (SSUrDNA e gGAPDH) para o grupo dos isolados obtidos de *Trypanosoma caninum* e *Leishmania* de cães domésticos da região metropolitana de São Paulo;
4. Posicionamento filogenético baseado em sequencias dos genes ribossômico (SSUrDNA), e gliceraldeído fosfato desidrogenase (gGAPDH) pelos métodos de máxima parcimônia e Bayesiana.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Área de estudo

A região metropolitana de São Paulo compreende 39 municípios, sendo eles Caieiras, Cajamar, Francisco Morato, Franco da Rocha e Mairiporã na região Norte; Arujá, Biritiba-Mirim, Ferraz de Vasconcelos, Guararema, Guarulhos, Itaquaquecetuba, Mogi das Cruzes, Poá, Salesópolis, Santa Isabel e Suzano na região leste; Cotia, Embu das Artes, Embu-Guaçu, Itapeverica da Serra, Juquitiba, São Lourenço da Serra, Taboão da Serra, e Vargem Grande Paulista na região sudoeste; Carapicuíba, Itapevi, Jandira, Osasco, Pirapora do Bom Jesus e Santana de Parnaíba na região oeste e Diadema, Mauá, Ribeirão Pires, Rio Grande da Serra, Santo André, São Bernardo do Campo, e São Caetano do Sul na região sudeste. No presente estudo foram coletadas amostras de cães residentes nos municípios de Barueri, Carapicuíba, Cotia, Embu, Osasco, São Bernardo do Campo, São Paulo e Vargem Grande Paulista.

Exceto pela capital São Paulo e o município de São Bernardo do Campo localizado na zona sul do Estado, os outros municípios estão localizados na zona oeste. Os municípios mais próximos à região central apresentam pouca cobertura vegetal nativa, exemplo dessa escassa cobertura é o município de Osasco que segundo o IBGE (2016) possui 2% de mata nativa. Já os que se localizam a sudoeste possuem cobertura vegetal nativa visivelmente mais abundante (fig.1).

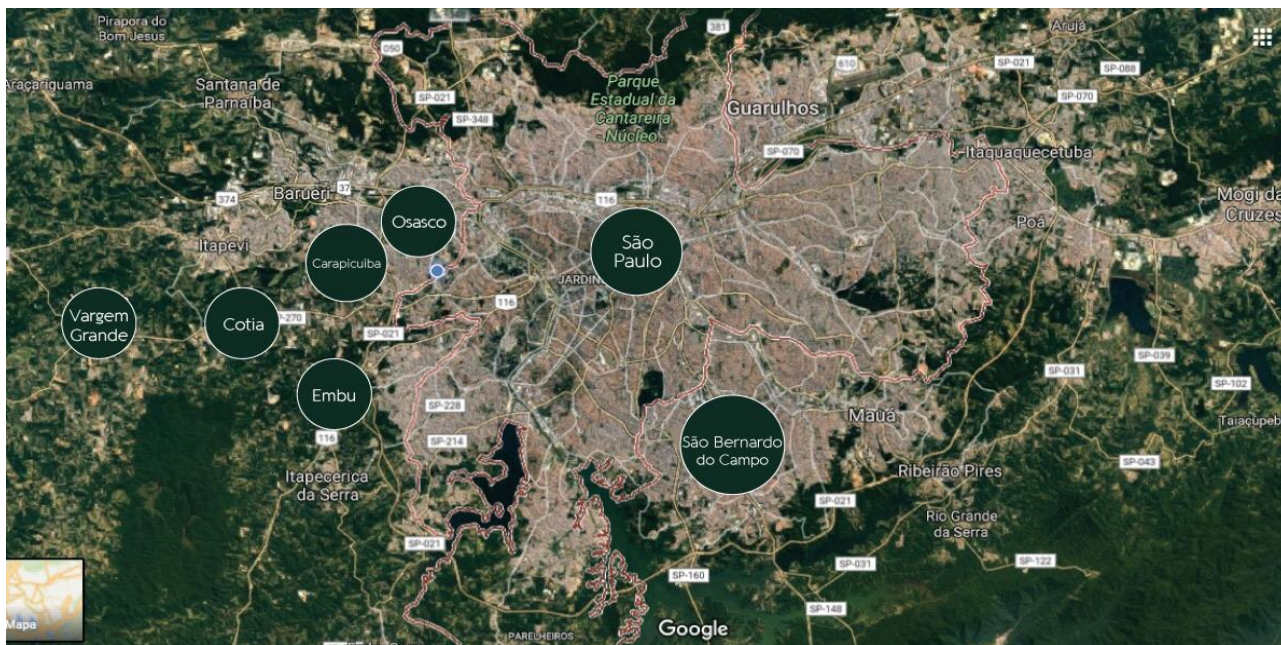


Figura 1: Localização dos municípios amostrados na região metropolitana de São Paulo.
 Fonte: adaptado de Google Maps.

4.2 Identificação e exame físico.

A população alvo do estudo foi composta por cães atendidos por profissionais colaboradores do projeto e cães domiciliados em abrigos para animais. Cada animal participante teve uma ficha clínica composta pela identificação do animal, raça, tamanho, idade estimada, local de residência e informações clínicas, além do termo de consentimento para participação do estudo. Nos abrigos o critério de inclusão foi o comportamento, somente animais dóceis, que não apresentaram resistência à contenção física foram incluídos.

4.3 Obtenção de amostras biológicas

Diferentes amostras biológicas foram obtidas para avaliar a presença dos parasitas. Amostras de pele íntegra para o isolamento de *T. caninum*, punção de linfonodo poplíteo para o isolamento de parasitas do gênero *Leishmania* e sangue venoso para o diagnóstico molecular de *Leishmania infantum chagasi*.

4.3.1 Biópsia de pele

A pele foi preparada para biópsia com tricotomia na região cervical lateral e foi realizada antissepsia com álcool 70%. Foi utilizado punch dermatológico de 3mm e após o procedimento, foi realizado curativo com rifamicina spray.

4.3.2 Punção de linfonodo poplíteo

Na pele da região do linfonodo poplíteo foi realizada a antissepsia com álcool 70% e punção por agulha fina com utilização de seringa de 1 ml e agulha 13X4,5mm.

4.3.3 Sangue venoso

Para colheita do sangue foi utilizado seringa de 3ml com agulha 20X5,5mm. Foi realizado punção da veia safena lateral após antissepsia com álcool 70%.

4.4 Isolamento de *Trypanosoma caninum*

Amostras de pele (biopsias de pele) de 3mm foram acondicionadas em frascos contendo PBS1X acrescido de gentamicina (80mg/), ampicilina (1g/) e anfotericina B (1%) no momento da coleta. Após 24 horas, os fragmentos foram lavados em PBS1X e inoculados em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (blood agar base com 10% sangue de coelho) e fase líquida de meio LIT (contendo soro fetal bovino e antibióticos) em ambiente asséptico (fluxo laminar) e mantidos a 28°C por 60 dias e examinados semanalmente.

4.5 Isolamento de *Leishmania*

O material obtido das punções de linfonodos poplíteos foram inoculados em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (blood agar base com 10% sangue de coelho) e fase líquida de meio LIT (contendo soro fetal bovino e antibióticos) e mantidos a 28°C por 10 dias e examinados a cada 2 dias

4.6 Preservação dos isolados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos

Os isolados obtidos estão mantidos criopreservados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal FMVZ-USP. Os isolados estão mantidos congelados em N₂ líquido e cultivados a 28°C.

4.7 Extração de DNA e Reações de amplificação.

Foi utilizado o método clássico de fenol-clorofórmio para extração de DNA dos isolados obtidos e para as amostras de sangue total o kit comercial (Purelink Genomic – Thermofisher). Os oligonucleotídeos e condições das reações que foram utilizadas para a amplificação dos marcadores SSU rDNA e gGAPDH estão descritos em trabalhos anteriores (MAIA et al., 2004; 2007; RODRIGUES et al., 2006; MARCILI et al., 2009a, 2009b; 2009c; HAMILTON et al., 2004, 2007) e utilizados na caracterização dos isolados. Para o diagnóstico molecular específico de *L. infantum chagasi* foi utilizado o marcador baseado no gene de Catepsina L-like (SILVA et al., 2018).

4.8 Purificação e sequenciamento.

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR (produtos amplificados em três reações independentes) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com Gel-Red (Biotium). Os fragmentos de DNA foram purificados pelo kit comercial Exosap-IT (Thermofisher) e submetidos a reações de seqüenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Thermofisher), de acordo com especificações do fabricante, em seqüenciador automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Thermofisher). As reações foram submetidas a 30 ciclos: 15 s 96°C; 15 s 50°C; 4 min 60°C, com um ciclo inicial de 1 min 96°C.

4.9 Alinhamento das sequencias obtidas e inferências filogenéticas

As sequencias obtidas, por PCR, dos genes SSUrDNA e gGAPDH foram submetidos a alinhamentos múltiplos pelos programas Clustal X (THOMPSON *et al.*, 1997) alterando os parâmetros relativos à inserção de “indels” (peso de inserção=1, Extensão=1) e manualmente ajustados no programa GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS *et al.*, 1997). As árvores filogenéticas foram inferidas pelos métodos análise bayeseana (B) e máxima parcimônia (MP). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 1998) via busca heurística com 100 replicatas de adição aleatória dos terminais seguida de troca de ramos (“RAS-TBR Branch-breaking”). As análises de suporte por “bootstrap” foram feitas em 100 replicatas com os mesmos parâmetros empregados na busca. As análises bayeseanas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003). Foram empregadas 1000.000 gerações usando GTR como modelo de substituição e quatro

categorias de gama mais proporção de sítios invariantes. Para a construção do dendrograma final foram utilizados apenas os diagramas obtidos nas últimas 150 replicatas. Para a verificação de suporte de ramos nas análises bayesianas foram utilizados os valores de probabilidade a posteriori obtidos com o programa MrBayes. As matrizes de similaridade (baseadas em distância p não corrigida) foram construídas utilizando o programa Poit Replacer v.2.0 disponibilizado pelo autor (Alves, J. M.) no endereço <http://www.geocities.com/alvesjmp/software.html>

5. RESULTADOS

Foram amostrados duzentos e um cães da região metropolitana de São Paulo, sendo oitenta no município de Cotia, dezenove em Embu das Artes, dezesseis em Osasco, dez em São Paulo, cinco em São Bernardo do Campo, cinquenta e nove em Vargem Grande Paulista e doze em Carapicuíba. Foram obtidas amostras de biópsia de pele, punção de linfonodo poplíteo e sangue periférico de todos os animais.

No exame parasitológico todas as amostras de biopsia de pele foram negativas para parasitas do gênero *Trypanosoma*. Entretanto, uma amostra proveniente do município de Cotia foi positiva (0,5%) para formas promastigotas compatíveis com o gênero *Leishmania*.

As culturas semeadas com o produto da punção por agulha fina do linfonodo poplíteo gerou 9 culturas positivas (4,5%) sendo 6,25% (5/80) para o município de Cotia, 10,52% (2/19) para Embu das Artes, 6,25% (1/16) para Osasco, 10% (1/10) em São Paulo, 1,7% (1/59) em Vargem Grande Paulista e nos municípios de São Bernardo e Carapicuíba todos os animais foram negativos no exame parasitológico.

Um mesmo cão do município de Cotia foi positivo na cultura proveniente da biopsia de pele e linfonodo poplíteo. Do total de 10 culturas positivas somente 7 foram criadas e preservadas na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos e o sucesso de isolamento foi de 70% (Tabela 1).

O diagnóstico molecular para *Leishmania infantum chagasi* baseado no gene de catepsina L-like apresentou positividade de 24,8% (50/201) para a região metropolitana de São Paulo, sendo 30%(24/80), 21,05%(4/19), 6,25%(1/16),

10%(1/10), 27,12%(16/59), 33,4%(4/12) para os municípios de Cotia, Embu das Artes, Osasco, São Paulo, Vargem Grande Paulista e Carapicuíba, respectivamente. Somente o município de São Bernardo não apresentou positividade. Todos os animais positivos no exame parasitológico também foram positivos no diagnóstico molecular. (fig.2).

Das 10 culturas positivas foram obtidas sequencias somente dos isolados criopreservados (Tabela 1) dos genes de SSUrDNA e gGAPDH. As análises baseadas em similaridade de sequencias (Blast) demonstraram similaridade de 99% com *Leishmania infantum* (XR_001203206).

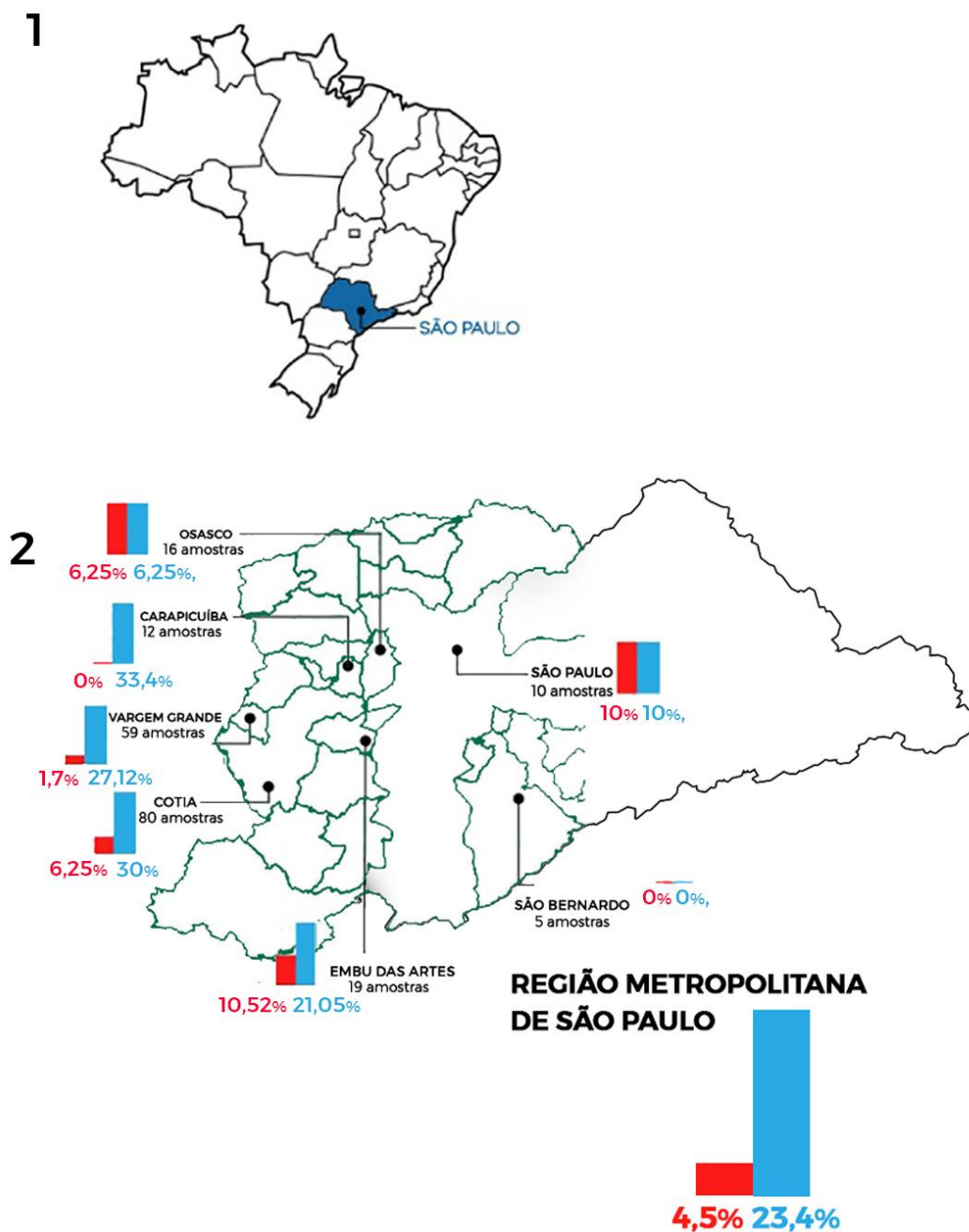


Figura 2: Distribuição geográfica e positividade para *leishmania* no teste molecular (azul) e parasitológico (vermelho) dos animais amostrados. 1: Localização do Estado de SP; 2: região metropolitana de SP: em verde municípios incluídos no estudo.

Tabela 1. Isolados criopreservados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT) com amostra primária utilizada no isolamento e origem geográfica.

CBT	Código de campo	amostra	Origem geográfica
236	A1	Linfonodo	São Paulo
244	R13	Linfonodo	Vargem Grande Paulista
258	E2	Linfonodo	Embu das Artes
259	V1	Linfonodo	Osasco
274	B47	Pele	Cotia
275	B47	Linfonodo	Cotia
276	B9	Linfonodo	Cotia

A análise filogenética das sequências dos isolados obtidos na região metropolitana de São Paulo em conjunto com outras sequências oriundas de outras espécies do gênero *Leishmania* demonstrou uma segregação dos isolados causadores de Leishmaniose visceral em três grupos (Fig.3): I. *Leishmania donovani* (100% de similaridade e 100% de bootstrap e 1.0 de probabilidade a posteriori). II. *Leishmania infantum* (100% de similaridade e 100% de bootstrap e 1,0 de probabilidade a posteriori). III. *Leishmania infantum chagasi* (100% de similaridade e 100% de bootstrap e 1.0 probabilidade a posteriori). Não houve segregação dos isolados por origem geográfica das sequencias obtidas da região metropolitana e demais regiões brasileiras.

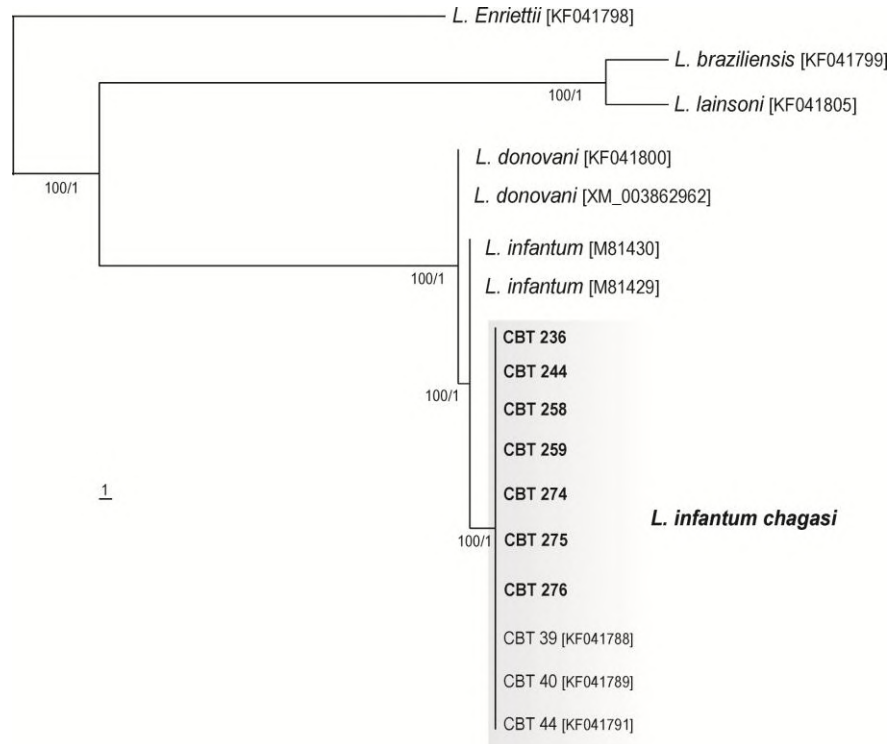


Figura 3 – Filogenia baseado nas sequências de SSUrDNA e gGAPDH concatenados dos 7 isolados de *L. infantum chagasi* conjuntamente com sequências de outras espécies de *Leishmania* utilizados nas análises de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana. Valores de suporte estão apresentados nos ramos (bootstrap / probabilidade a posteriori)

6. DISCUSSÃO

Leishmaniose é uma zoonose que pode causar a morte de seres humanos, cães, gatos e outros mamíferos. É transmitida por insetos flebotomíneos que estão representados por cerca de setecentas espécies distribuídas pelo mundo, das quais quatrocentas ocorrem no continente americano e destas, sessenta são conhecidas no Estado de São Paulo, porém nem todas são responsáveis pela transmissão da doença (SUCEN, 2018).

A espécie de flebotomíneo envolvida na transmissão da doença é *Lutzomyia longipalpis*, porém na região metropolitana de São Paulo esta espécie nunca foi encontrada indício de que outra ou outras espécies podem estar envolvidas na transmissão, já que nos municípios de Cotia e Embu das Artes foram coletados flebotomíneos das espécies *Pintomyia Fischeri*, *Migonemyia migonei* e *Evandromya edwardsi* e nesta última espécie coletada em Cotia foram detectadas forma flageladas no intestino de cinco exemplares (SUCEN, 2007).

Em Cotia e Embu a transmissão da leishmaniose visceral ocorre em ambiente de transição urbano-rural, que apresentam resíduos de matas nos quais os flebotomíneos antropofílicos, *Pintomyia fischeri*, *Migonemyia migonei* e *Psychodopygus ayrozai* se desenvolvem (DINIZ et al., 2014; GALVIS, 2011)

Segundo Galvis (2011), *Lu. longipalpis* apresenta a capacidade vetorial em relação a *Leishmania infantum chagasi* 18,7 vezes à de *Pi. fischeri* e esta espécie 45 vezes à de *Mg. migonei*. Também relata que, no foco de leishmaniose visceral canina da região Embu/Cotia, *Pi. fischeri* poderia atuar na transmissão desta doença em virtude da sua densidade elevada e infecção experimental.

Em meados da década de 1970 houve registros de casos de leishmaniose visceral humana em Diadema e São Paulo (IVERSSON, 1982). Mas o ciclo de transmissão não foi elucidado.

Em 2001 ocorreu confirmação do primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral em animal doméstico no município de Cotia, um gato e nele foi diagnosticada a doença causada por *Leishmania infantum chagasi* (SAVANI et al, 2004).

Das oitenta amostras do município de Cotia, vinte e quatro foram positivas no diagnóstico molecular e cinco no diagnóstico parasitológico sendo que um mesmo animal foi positivo na cultura proveniente de biópsia de pele e punção de linfonodo. Porém não é possível afirmar que os casos sejam autóctones por se tratar de cães de abrigo oriundos do município e de municípios vizinhos que não foram testados para doença antes de serem recebidos. A análise filogenética dos isolados por cultura comprova que a espécie causadora da leishmaniose é *Leishmania infantum chagasi*.

Já em Embu das Artes duas culturas por punção de linfonodo poplíteo foram positivas e quatro positivas nas reações de PCR. Sendo que um cão positivo nos dois métodos diagnósticos reside em uma casa localizada em meio a região de mata e de acordo com relato da tutora, este nasceu nas imediações da residência e nunca saiu do bairro. Relata que o animal brinca na mata todos os dias.

Um fato importante é que o outro cão positivo nos dois métodos diagnóstico era assintomático, um labrador com pele íntegra, unhas com tamanho regular, excelente escore corporal, reside em região de mata.

Em Vargem Grande Paulista das cinquenta e nove, amostras somente uma foi positiva na cultura por punção de linfonodo poplíteo e dezesseis nas reações de PCR. Todos os cães eram residentes de canis. Somente o cão com cultura e diagnóstico molecular positivos apresentava sinais clínicos da doença.

Em 2003 uma notificação de um cão com suspeita de leishmaniose no município de Carapicuíba levou a identificação de *Leishmania i. chagasi* (TOLEZANO et al, 2003).

No município de Carapicuíba doze cães com suspeita clínica da doença foram submetidos ao estudo, todas as amostras por punção de linfonodo poplíteo foram negativas no diagnóstico parasitológico e quatro foram positivas no diagnóstico molecular. Os quatro animais pertencem ao mesmo dono que os resgatou nas ruas do município, todos apresentavam sinais da doença.

O município de São Paulo sofreu investigação em 2007 após notificação de um caso humano de LVA e de um cão com suspeita clínica da doença (SUCEN, 2007). Porém de 2007 a 2017, dos noventa e um casos confirmados nenhum foi confirmado como autóctone (SINAN, 2018) e por isso o município de São Paulo não é considerado endêmico.

Mas na cidade de São Paulo dos dez cães que participaram do estudo um foi positivo na cultura por punção de linfonodo e também no diagnóstico molecular, trata se de um animal de 12 anos que há três apresentava onicogribose (crescimento desproporcional das unhas), alopecia (perda de pelos) e eritema (vermelhidão da pele) em borda de orelha e coxins sem diagnóstico.

Pode se afirmar que trata se de caso autóctone por ser um cão nascido no município e segundo relato da tutora nunca viajou, nunca saiu da cidade. Todos

os dias ela o levava para caminhar ao amanhecer e ao entardecer, horário em que se está mais exposto ao vetor.

Os cães desempenham um papel importante na transmissão da Leishmaniose visceral já que podem ser portadores com sinais clínicos da doença e reservatório, quando este é portador do parasita e não apresenta sinais clínicos.

A população canina na cidade de São Paulo foi estimada em 1.016.173 no ano de 2015 sendo que o número total de cães em todo Estado de São Paulo é de 5.446.763 de acordo com IBGE, 2015.

Aproximadamente 90% dos cães amostrados neste estudo residem ou foram residentes de abrigos de animais oriundos de diversas cidades do Estado de São Paulo, tendo sido resgatados e encaminhados para estes abrigos, lar temporário ou até mesmo adotados por quem os resgataram.

Alguns destes cães já haviam sido expostos em feiras de adoção na região central do município de São Paulo. Todos os finais de semana ocorrem feiras de adoção, não é prática comum nos abrigos a realização de exames para diagnóstico de leishmaniose em cães que não apresentam suspeita clínica da doença.

Animais que estejam aparentemente saudáveis serão encaminhados para adoção, esta avaliação é realizada pelo proprietário ou responsável pelo abrigo ou lar temporário, sendo encaminhados ao médico veterinário somente os que apresentam sinais clínicos.

Somente na cidade de São Paulo 73,9% dos cães domiciliados são adotados. Quanto maior a frequência de animais adotados por domicílio maior é a exclusão social dos adotantes (CANATO et al, 2012).

Os 24,8% positivos no diagnóstico molecular para *Leishmania infantum chagasi* correspondem a 50/201 cães amostrados, nove não possuíam nenhuma lesão em pele, nenhum sinal da doença, três estavam à disposição da adoção, dois foram adquiridos em canil que comercializa cães de raça e quatro foram adotados por seus tutores no momento em que efetuaram o resgate.

Nenhum animal dos abrigos incluídos no estudo havia sido submetido a qualquer técnica diagnóstica com objetivo de diagnosticar leishmaniose. Nos abrigos é realizada somente a desvermifugação com antiparasitários de amplo espectro e controle de pulgas e carrapatos. Os animais ficam em observação durante uma semana, são encaminhados para esterilização e após recuperação ficam disponíveis para adoção sendo colocados em exposição em pontos comerciais de São Paulo.

A legislação estadual (Decreto 40400/95) restringe estabelecimentos com manutenção de animais dentro do perímetro urbano, visando a diminuir exalação de odores, propagação de ruídos incômodos, proliferação de roedores e artrópodes nocivos. Tais medidas favorecem a instalação e manutenção dos canis comerciais em áreas periféricas no município de São Paulo ou em outros municípios da região metropolitana que conseqüentemente possuem maior cobertura florestal remanescente.

Além dos dados apontados, a ausência de diagnóstico sensível e específico dificulta o real entendimento da situação da Leishmaniose visceral canina na

região metropolitana de São Paulo. Neste estudo utilizou-se o método parasitológico e molecular para o diagnóstico.

O isolamento dos parasitas do gênero *Leishmania* nos cães demonstra a circulação neste grupo de hospedeiros. Na região metropolitana de São Paulo já foi registrada a circulação de *L. braziliensis* (FERREIRA et al., 2015), mas o posicionamento dos isolados obtidos através dos genes de SSUrDNA e gGAPDH comprovam a circulação de *L. infantum chagasi* em cães nos municípios de São Paulo, Vargem Grande Paulista, Embu das Artes, Osasco e Cotia.

O marcador molecular baseado no gene de Catepsina L-*like* demonstrou maior eficácia quando comparado ao marcador de ITS SSUrDNA (SILVA et al., submetido).

O processo migratório gerado pela atração de grandes centros urbanos propicia a migração de cães positivos para *Leishmania infantum chagasi* porém sem sintomatologia para áreas sem ciclo de transmissão ativa. Além de processos de expansão dos vetores já descritos na literatura (CARDIM et al., 2016), destaca-se a migração humana, dos reservatórios e o trânsito pelo comércio e adoção de cães.

O trânsito livre de animais de estimação também pode ser considerado um risco, pois dos dezesseis cães do município de Osasco incluídos no estudo o único positivo tanto na cultura quanto no diagnóstico molecular é oriundo do Estado da Paraíba e foi atendido no consultório por ser portador de doença renal crônica. Não é possível estabelecer onde adquiriu o parasita, mas a possibilidade de que tenha vindo da Paraíba já portador da doença é real.

Novos estudos devem ser conduzidos com um número maior de animais avaliados para o real entendimento da situação da Leishmaniose visceral canina na região metropolitana de São Paulo com a utilização de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos. Tais dados trarão subsídios para políticas de controle desta importante zoonose antes do acometimento humano.

7. CONCLUSÃO

Não foi detectado *Trypanosoma caninum* nas amostras de pele dos cães incluídos no estudo.

Foram obtidas nove (4,5%) culturas positivas para parasitas do gênero *Leishmania* de amostras de linfonodo poplíteo sendo que um animal do município de Cotia foi positivo para o gênero *Leishmania* nas amostras de linfonodo poplíteo e pele.

Nos municípios de Carapicuíba, Cotia, Embu das Artes, Osasco, São Paulo e Vargem Grande Paulista foram detectados animais positivos através do exame molecular e/ou parasitológico. Mas não é possível afirmar que todos os casos sejam autóctones, exceto por um caso em Embu das Artes e outro na cidade de São Paulo em que os tutores afirmam que os animais nasceram e nunca saíram do bairro.

Somente o município de São Bernardo do Campo não apresentou animais positivos para *Leishmania infantum chagasi*.

O posicionamento filogenético baseado nos genes de SSUrDNA e gGAPDH identificou os isolados como pertencentes a espécie *Leishmania infantum chagasi*.

Este estudo deixa claro a necessidade da realização de mais estudos nesta região devido a comprovação da circulação do parasita em municípios que não são considerados endêmicos, a gravidade da doença, as características migratórias da população e a cultura da adoção nos grandes centros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR J. E. Profilaxia do calazar no Ceará. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1961. v 3, p. 175-180.

ALVES, AS., et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosom caninum*. Res Vet Sci. 2012 Dec;93(3):1329-33. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.006. Epub 2012 Jul 27. PubMed.

BANETH, G., et al. Canine Leishmaniosis - New Concepts and Insights on an Expanding Zoonosis: part one. Trends Parasitol. 2008 Jul;24(7):324-30. doi: 10.1016/j.pt.2008.04.001. Epub 2008 May 29.

BARROS, JH., et al. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012 Jul;106(7):419-23. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.03.014. Epub 2012 May 10. PubMed PMID: 22579558.

BORGHESAN, T. C. Diversidade e filogenia de tripanossomatídeos parasitas de dípteros. 2013. 51 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia da Relação Patógeno-hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CAMARGO, E.P. Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. Adv parasit, 1998.

CANATTO, D.C., et al.. Caracterização Demográfica das Populações de Cães e Gatos Supervisionados do Município de São Paulo. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.64 no.6 Belo Horizonte Dec. 2012
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352012000600017>

CARDIM, M.F.M., et al. Visceral leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil: spatial and space-time analysis. Revista de Saúde Pública, v.50, 2016.

CARVALHO, AU, Abrão DC, Facury Filho EJ, Paes PRO, Ribeiro MFB. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2008 60 (3): 769-71.

CAVALIER -Smith, T. 2004. Only six kingdoms of life. Proceedings: Biological Sciences, 271:1251-1262.

COURTENAY, O. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. *J Infect Dis.* 2002 Nov 1;186(9):1314-20. Epub 2002 Oct 11.

da COSTA, A.P .et al. Environmental Factors and Ecosystems Associated with Canine Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015 Dec;15(12):765-74. doi: 10.1089/vbz.2015.1866

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

DAHROUG M. A., et al. *Leishmania*(*Leishmania*) *chagasi* in captive wild felids in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010. 104(1):73-4.

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

De S Pinto AG, Schubach TM, Figueiredo FB, Baptista C, Fagundes A, Da S Barros JH, De Paula CC, Toma HK, Madeira MF. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology.* 2010.

DIAS, Q.N.P., Avaliação do Teste Rápido Sandfly para Infecção Natural por *Leishmania* em Flebotomíneos. Dissertação de Mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.

DINIZ, M.M., et al.. Host-biting Rate and Susceptibility of Some Suspected Vectors to *Leishmania braziliensis*. *Parasit Vectors.* 2014 Mar 31;7:139. doi: 10.1186/1756-3305-7-139

FERREIRA, TdeS., et al.. Molecular Detection of *Trypanosoma sp.* and *Blastocrithidia sp.* (Trypanosomatidae) in Phlebotomine Sand Flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015 Nov-Dec;48(6):776-9. doi: 10.1590/0037-8682-0076-2015.

FIGUEIREDO F. B., et al. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008. 102(2):200-1.

FREITAS, H.F., et al.. Cloning, Expression, Purification and Spectrophotometric Analysis of Lanosterol 14-alpha Demethylase from *Leishmania braziliensis* (LbCYP51). *Mol Biol Rep.* 2018 Apr;45(2):175-183. doi: 10.1007/s11033-018-4150-7. Epub 2018 Jan 23.

FUKUTANI, K.F. *et al.* Serological Survey of *Leishmania* Infection in Blood Donors in Salvador, Northeastern Brazil, 2014. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/422>.

GALVIS, O.. Estudo da Capacidade Vetorial da *Migonemyia migonei* (França) e *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Pschodidade) para *Leishmania (leishmania) infantum chagasi* Cunha e Chagas. 2011. 107p. Dissertação (mestrado) Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GOMES, A. S. G. Estudo comparativo dos perfis proteômicos de cepas selvagem e apossimbiótica de *Strigomonas culicis*. 2014. 230 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

HAMILTON, PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol Phylogenet Evol.* 2007; 44(1):15-25.

HAMILTON, PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol.* 2004; 34(12):1393-404.

HIRSCHMANN, L. C., et al. Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 44, n. 1, p.33-44, 2 abr. 2015. Universidade Federal de Goiás.

HOARE, CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.

HOLLAR, L, Maslov DA. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasit.* 1997; 89:295-9.7

HONIGBERG, BM. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J, editors. *Progress in Protozoology*. New York: Academic Press; 1963. p.68.

HUGHES, AL, Piontkivska H. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003a; 2:15.

HUGHES, AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Mol Biol Evol.* 2003b; 20(4):644-52.

IBRAHIM,M.E. e BARKER, D.C..The Origin and Evolution of the *Leishmania donovani* Complex as Inferred from a Mitochondrial Cytochrome Oxidase II Gene Sequence. *Infect Genet Evol.* 2001 Jul;1(1):61-8

ISHEMGULOVA, A., et al. Molecular mechanisms of thermal resistance of the insect trypanosomatid *Crithidia thermophila*. *Plos One*, v. 12, n. 3, p.1-15, 22 mar. 2017. Public Library of Science (PLoS).

IVERSSON, LB., et al. Investigação de um Novo Caso de Leishmaniose Visceral Ocorrido na Grande São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública, 1982.

JÚNIOR, E. M. Q. Validação do teste Imunocromatográfico rápido *Dual Path Platform* para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina, 2011. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

KUHLS K. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* 2005. 7(11-12):1224-34.

KUHLS,K., et al. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Jul 9;2(7):e261. doi: 10.1371/journal.pntd.0000261.

KUHLS, K., et al.. Multilocus Microsatellite Typing (MLMT) Reveals Genetically Isolated Populations Between and within the Main Endemic Regions of Visceral Leishmaniasis. *Microbes Infect.* 2007 Mar;9(3):334-43. Epub 2007 Jan 9.

LAINSON R., RANGEL E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005. 100(8):811-27. Review

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

LAINSON R., SHAW J. J., Evolution, Classification and Geographic Distribution. In: W. Peters, R. Killick Kendrick (eds). *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Vol. I, Academic press, London, 1978.

LAINSON, R, SHAW JJ, Naiff RD. Chagas' disease in the Amazon basin: speculations on transmission per os. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1980; 22(6):294-7.

LAINSON R. The American leishmaniases: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983. 77(5):569-96. Review.

LIMA H., et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008.103(4):412- 4

LOPES, E.G., et al. Performance of Conventional PCRs Based on Primers Directed to Nuclear and Mitochondrial Genes for the Detection and Identification of *Leishmania* spp. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2016;58:41. doi: 10.1590/S1678-9946201658041. Epub 2016 May 24

LUCIANO, R.M., et al. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 46, n. 3, p. 181-187, 2009

LUKES, J., et al.. Evolutionary and Geographical History of the *Leishmania donovani* Complex with a Revision of Current Taxonomy. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007 May 29;104(22):9375-80. Epub 2007 May 21.

MADEIRA, M. F., et al. Mixed infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 100, 442–445, 2006. doi: 10.1016/j.trstmh.2005.07.011.

MADEIRA, M.F. et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitology. 2009 Apr;136(4):411-23. doi: 10.1017/S003118200900554X. Epub 2009 Feb 16

MAIA, DA SILVA, F., et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. Mol. Ecol, 2007.

MAIA, DA SILVA, F., et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. Parasitology. 2004a; 128:283–94.

MARCILI, A, et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. Int J Parasitol. 39(5):615-23.

MARCILI, A, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology. 136(6):641-55.

MARCILI, A, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. Infect Genet Evol. 9(6):1265-74.

MARCILI, A. et al. Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different biomes in Mato Grosso, Brazil. J Parasitol. 2013 Dec;99(6):1071-6. doi: 10.1645/12-156.1. Epub 2013 Jul 16

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. *Infect Genet Evol.* 2014; 25:44-51.

MARZOCHI, M.C. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.80, n.3, p.349- 357, 1985.

MAURICIO,I.L., et al. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000.

MAURICIO,I.L., et al. Genetic typing and Phylogeny of the *Leishmania donovani* Complex by Restriction Analysis of PCR Amplified gp63 Intergenic Regions. *Parasitology.* 2001 Apr;122(Pt 4):393-403.

MAURICIO,I.L., et al. Genomic Diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* 1999 Sep;119 (Pt 3):237-46.

MAURICIO,I.L., et al. *Leishmania donovani* Complex: Genotyping with the Ribosomal Internal Transcribed Spacer and the Mini-exon. *Parasitology.* 2004 Mar;128(Pt 3):263-7.

MAURÍCIO I. L., STOTHARD J. R., MILES M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000. 16(5):188-9. Review.

MERZLYAK E., et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *J Euk Microbiol.* 48 (2):161-9.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. p. 9-10.

MONTENEGRO, V. M., Jimenez, M., Pinto Dias, J. C. and Zeledón, R. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 491–494, 2002. doi: 10.1590/S0074-02762002000400006.

NICHOLAS,, KB, Nicholas HB Jr., e Deerfield, DW II. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW NEWS* 4:14.

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

PODIPLAEV, SA. Catalogue of World Fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). *Proc. Zool. Inst. USSR Acad. Sci. Leningrad.* 1990; 217: 1-177.

POLI, A., et al. Feline Leishmaniosis Due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol.* 2002 Jun 26;106(3):181-91

QUISPE-TINTAYA K.W., et al. Antigen Genes for Molecular Epidemiology of Leishmaniasis: Polymorphism of Cysteine Proteinase B and Surface Metalloprotease Glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *Journal of Infectious Diseases*, 2004.

QUISPE-TINTAYA K.W., et al. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis.* 2005. 192(4):685-92.

RODRIGUES, AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MM. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology.* 2006; 132(Pt 2):215-24.

RONQUIST, F, Huelsenbeck JP. 2003. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19. 1572-1574

SAVANI, E.S., et al. Occurrence of Co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a Dog in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Nov;100(7):739-41. Epub 2006 Jan 9.

SAVANI E. S., et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004. 25;120(3):229-33

SILVA, R.E. Genes de Cisteíno proteases (Catepsina L-like) de *Leishmania infantum chagasi*: Caracterização, Relações Filogenéticas, Expressão Heteróloga e Diagnóstico Molecular e Sorológico. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo FMVUSP, 2018.

SIMPSON, AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 2006; 22(4):168-74.

SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/leishmaniose-visceral>

SOLANO-GALLEGO, L, KOUTINAS A, MIRÓ G, CARDOSO L, PENNISI MG, FERRER L, BOURDEAU P, OLIVA G, BANETH G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology.* 28;165(1-2):1-18. 2009

STEVENS, JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasit.* 2001; 48:1-56.

SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias, Vetores e Doenças. Leishmaniose Visceral Americana. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/viscer.htm>.

SUZUKI, RB, et al.. A Highly Sensitive *Leishmania infantum chagasi* Isolation Method from Bone Marrow and Peripheral Blood of Adults and Children. *J Infect Dev Ctries.* 2016 Nov 24;10(11):1275-1277. doi: 10.3855/jidc.8022.

SWOFFORD, JR. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4b6. Sunderland: Sinauer Associates; 1998.

SVOBODOVÁ M, Zídková L, Cepicka I, Oborník M, Lukes J, Votýpka J. 2007. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(2):423-32.

THOMPSON, JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25 4876-4882.

TOLEZANO, J.E., et al. Expansão da Leishmaniose Visceral por Terras Paulistas. Focos de Transmissão de LV canina em municípios da Região Metropolitana de São Paulo. Ver.

TRAVI B. L., *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1994. 50(5):557-65

VALLEJO, G.A., et al.. *Trypanosoma rangeli* Parasite-vector-Vertebrate Interactions and their Relationship to the Systematics and Epidemiology of American Trypanosomiasis. *Biomedica*, 2007 Jan;27 Suppl 1:110-8.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumdsen, WHR, Evans DA. Editors. *Biology of the kinetoplastida*. New York: Academic; Press 1976. p. 1-34.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol.* 1994; 24(8):1317-31.

WALLACE, FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol.* 1966; 18:124-93.

WOO (World Health Organization). Control of Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WOO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf.

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título do projeto: Isolamento *Trypanosoma caninum*, Parasitas do gênero *Leishmania* e Diagnóstico Molecular de *Leishmania infantum chagasi* em cães da região metropolitana de São Paulo.

Nome do pesquisador principal: Vilma Pereira da Costa

Instituição (CIAEP) da CEUA que aprovou: CEUA-UNISA

Objetivos do estudo: Diagnosticar a presença de *Trypanosoma caninum* e *Leishmania* em cães nos municípios da grande São Paulo.

Procedimentos a serem realizados com os animais: os animais terão uma amostra de pele (3mm) coletada por biópsia com punch; 1ml de sangue venoso e punção de linfonodo poplíteo por agulha fina.

Potenciais riscos para os animais: a biópsia de pele (3mm) não acarreta risco de morte aos animais, pois é coletada uma quantidade pequena e sem necessidade de sutura e anestésicos.

Benefícios: Os animais participantes poderão contribuir para a saúde pública da população da região, pois farão parte de um modelo de diagnóstico que poderá auxiliar na identificação de doenças graves e negligenciadas pelos órgãos públicos do país.

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto: Sua autorização para a inclusão do seu animal nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá ser retirado do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele. A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares. A Médica Veterinária responsável pelo seu animal(is) será a **Dr. Vilma Pereira da Costa**, inscrita no CRMV sob o nº **33926**. Além dela, a equipe do Pesquisador Principal, Prof. Dr. Arlei Marcili, também se responsabilizará pelo bem estar do animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: (11) 964117426 Dr.(a) Vilma Pereira da Costa

Equipe: UNISA Programa de Pós-Graduação

Endereço: Av. Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 – Santo Amaro

Telefone: (11) 964117426

Declaração de consentimento

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(s) pelo qual sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu animal do estudo a qualquer momento e que não haverá notificação a nenhum órgão governamental, caso algum cão seja positivo para leishmaniose. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do meu(s) animal(is), identificado(s) a seguir, neste projeto. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

_____, ____/____/____

Pesquisador: _____

Nome: _____

Documento de identidade: _____

Responsável: _____

Nome: _____

Documento de Identidade: _____

Identificação do(s) animal(is)

Nome: _____

Espécie: canina _____

Raça: _____

Idade: _____

Macho () Fêmea ()