

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

ANDRÉ TETZL COSTA

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PREDITIVOS DA CAPACIDADE DE
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL ATUAREM COMO RESERVATÓRIO
PARA TRANSMISSÃO DO PARASITO AOS FLEBOTOMÍNEOS**

BELO HORIZONTE
2024

André Tetzl Costa

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PREDITIVOS DA CAPACIDADE DE
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL ATUAREM COMO RESERVATÓRIO
PARA TRANSMISSÃO DO PARASITO AOS FLEBOTOMÍNEOS**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia Humana.

Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Coorientadores:

Dr. Edelberto Santos Dias

Dra. Maykelin Fuentes Zaldivar

BELO HORIZONTE

2024

043

Costa, André Tetzl.

Avaliação de biomarcadores preditivos de infecção na leishmaniose visceral canina [manuscrito] / André Tetzl Costa. – 2024.

99 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Rodolfo Cordeiro Giunchetti. Coorientador: Edelberto Santos Dias; Maykelin Fuentes Zaldivar.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Cães. 3. Leishmaniose Visceral. 4. Xenodiagnóstico. 5. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Giunchetti, Rodolfo Cordeiro. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE ANDRÉ TETZL COSTA- 353/2024/02

ENTRADA 1º/2019 - MATRICULA:
2019706487

Às **08h30min** do dia **28 de fevereiro de 2024**, por videoconferência, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **André Tetzl Costa**. A presidência da sessão coube ao Professor **Rodolfo Cordeiro Giunchetti** orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída pelos doutores: **Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares** UFOP, **Wendel Coura Vital** UFOP, **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho** UFMG, **Nelder de Figueiredo Gontijo** UFMG, **Edelberto Santos Dias** - IRR/FIOCRUZ, Coorientador **Maykelin Fuentes Zaldivar** - UFMG - Coorientadora e **Rodolfo Cordeiro Giunchetti** - UFMG, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Avaliação de Biomarcadores Preditivos da Capacidade de Cães com Leishmaniose Visceral atuarem como Reservatório para Transmissão do Parasito aos Flebotomíneos**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **aprovado a Tese de Doutorado**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti Coordenador(a)**, em 29/02/2024, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares Usuário Externo**, em 29/02/2024, às 12:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Maykelin Fuentes Zaldívar Usuária Externa** em 29/02/2024, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Wendel Coura Vital Usuário Externo**, em 29/02/2024, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Nelder de Figueiredo Gontijo Professor do Magistério Superior**, em 29/02/2024, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Edelberto Santos Dias Usuário Externo**, em 01/03/2024, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho Cidadã**, em 01/03/2024, às 14:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3026495** e o código CRC **548E4DF4**

AGRADECIMENTO

Expresso minha profunda gratidão ao meu orientador, Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti, e aos meus coorientadores, Dr. Edelberto Santos Dias e Dra. Maykelin Fuentes Zaldivar e também ao Dr. João Carlos França da Silva. Seus ensinamentos, acolhimento, apoio, conselhos e sugestões foram fundamentais para tornar possível a realização deste trabalho. Foi uma honra tê-los como orientadores.

Agradeço também a todos os professores e alunos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LABIC) pelo apoio e acolhida ao longo desses anos, com destaque para Me. Daniel Ferreira Lair, Ma. Diana Souza de Oliveira, Me. Diego Fernandes Vilas Boas, Me. Diogo Fonseca Soares Pereira, Me. Eiji Kevin Nakasone Nakasone, Ma. Maria Lorenza Leal Motta, Geralda Gabriele da Silva, pela amizade durante o doutorado.

Às pós-doutorandas do LABIC pela ajuda durante o doutorado, Dra. Lucilene Aparecida Resende Oliveira, Dra. Reysla Maria da Silveira Mariano, Dra. Maykelin Fuentes Zaldivar e Dra. Wanessa Moreira Goes nos experimentos, nas correções, no apoio durante toda essa etapa.

À equipe e colaboradores do grupo de pesquisa Taxonomia de Flebotomíneos/Epidemiologia, Diagnóstico e Controle das Leishmanioses do Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz Minas, pela disposição e ajuda no trabalho de campo.

Agradeço aos colaboradores Dr. Renato de Lima Santos e à Dra. Ayisa Rodrigues de Oliveira, ao Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Paes e sua equipe, bem como ao Dr. Aristóbolo Mendes da Silva pelas valiosas contribuições técnicas.

À prefeitura do município de Porteirinha – MG, especialmente ao servidor Saulo Neris Almeida.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia (PPGPAR) pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo conhecimento transmitido.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por me proporcionar infraestrutura e ensino público, gratuito e de qualidade.

Agradeço agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG, FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, que de alguma forma financiaram o estudo com auxílio a pesquisa, projetos e bolsa de estudo.

Agradeço a FAPEMIG pelo fomento do projeto APQ-01694-10.

Expresso minha imensa gratidão aos meus pais, Jaime e Rosilene, minha irmã Nathália e minha afilhada Stella, pelo apoio incondicional, sabedoria, amor, carinho e paciência, sempre transmitidos. Amo vocês!

À minha namorada, Helena, pelo apoio, carinho, paciência, amizade e amor durante todo esse tempo.

E aos meus familiares, minha avó Liliane, tios, tias, primos e primas, que sempre me apoiaram ao longo desses anos.

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças que afeta milhões de indivíduos globalmente. São causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos principalmente pela picada de insetos vetores, os flebotomíneos. O cão se destaca como reservatório doméstico desse parasito e pode desenvolver a forma visceral da doença. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) pode apresentar uma ampla variedade de manifestações clínicas, que vão desde formas assintomáticas até sinais clínicos graves. Estudos têm demonstrado que a evolução clínica da LVC está associada ao grau de parasitismo em órgãos diversos. Entretanto, ainda há uma lacuna na literatura científica em relação ao limiar de parasitismo no cão que poderia influenciar na transmissão a estes vetores. Além disso, não se sabe se existem biomarcadores hematológicos, imunológicos ou bioquímicos que possam correlacionar a de infectividade do cão aos flebotomíneos. No Brasil, o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) abrange o diagnóstico e tratamento de humanos infectados, controle do vetor e diagnóstico e eutanásia de cães sororreagentes. Entretanto, a obrigatoriedade da entrega de cães soropositivos aos órgãos públicos tem sido alvo de discussão e protestos pelos tutores, que muitas vezes iniciam o tratamento da LVC, ainda que não elimine o parasito de seu organismo, mantendo risco de infecção ao inseto vetor. Diante do atual contexto, o Ministério da Saúde (MS) em conjunto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou o uso de um medicamento para o tratamento de cães com LVC em 2016, o Milteforan™. Com base na expectativa de aumento no número de cães submetidos ao tratamento da LVC no Brasil, torna-se imprescindível identificar biomarcadores na LVC que possam prever a infecção por *L. infantum* aos flebotomíneos. O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, visando identificar biomarcadores associados à resistência ou susceptibilidade, e a possível correlação com a infecção desses cães pelos flebotomíneos. Adicionalmente, o estudo abrangeu o estabelecimento de um novo sistema de estadiamento na LVC, bem como a análise de diversos biomarcadores nos animais com escores clínicos diferentes. Foram avaliados 47 cães naturalmente infectados com *L. infantum*, sob os aspectos hemato-bioquímicos, imunológicos, clínicos e parasitológicos. Foram identificados alguns biomarcadores que apresentaram correlação positiva com a carga parasitária observada nos flebotomíneos, entre eles: (i) a carga parasitária na pele; (ii) nos linfonodos; e (iii) no baço; além dos (iv) níveis séricos de globulina; e (v) fosfatase alcalina. Também foram identificados biomarcadores com correlação negativa, como: (i) os valores de eritrócitos; (ii) linfócitos; (iii) monócitos; e a (iv) contagem de linfócitos TCD8⁺. No entanto, a correlação positiva foi mais forte quando os animais foram categorizados conforme a gravidade dos sinais clínicos. Essa correlação corrobora o sistema de estadiamento clínico desenvolvido neste estudo como ferramenta para indicar alto risco dos cães com maior agravamento clínico em infectarem flebotomíneos com alta carga parasitária de *L. infantum*. Esse método, por ser de fácil execução e baixo custo, pode ser valioso em contextos práticos, como em análises epidemiológicas incluindo o desenvolvimento de estratégias de monitoramento e prognóstico do tratamento da doença canina e também contribuir para estudos relacionados à imunoproteção por meio de vacinas contra a LVC.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina; *Leishmania infantum*; cão; biomarcadores; resposta imune; qPCR; Xenodiagnóstico.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of diseases that affect millions of individuals globally. They are caused by protozoa of the genus *Leishmania*, mainly transmitted through the bite of vector insects, sandflies. Dogs stand out as the main domestic reservoir of this parasite and can develop the visceral form of the disease. Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) can present a wide variety of clinical manifestations, ranging from asymptomatic forms to severe clinical signs. Studies have shown that the clinical progression of CVL is associated with the degree of parasitism in various organs. However, there is still a gap in the scientific literature regarding the threshold of parasitism in dogs that could influence transmission to these vectors. Additionally, it is not known whether there are hematological, immunological, or biochemical biomarkers that may be related to the risk of canine infectivity to sandflies. In Brazil, the Visceral Leishmaniasis Control Program (VLCP) encompasses the diagnosis and treatment of infected humans, vector control, and diagnosis and euthanasia of seropositive dogs. However, the requirement to deliver seropositive dogs to public authorities has been the subject of discussion and protests by owners, who often initiate treatment for CVL, even though it does not eliminate the parasite from their bodies, maintaining the risk of infection to the vector insect. In the current context, the Ministry of Health (MoH) together with the Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (MoAL), authorized the use of a medication for the treatment of dogs with CVL in 2016, Milteforan™. With the expectation of an increase in the number of dogs undergoing CVL treatment in Brazil, it becomes essential to identify biomarkers in CVL that can predict infection by *L. infantum* to sandflies. The main objective of this research was to evaluate naturally infected dogs with *Leishmania infantum*, aiming to identify biomarkers associated with resistance or susceptibility, and the possible correlation with the infection of these dogs by sandflies. Additionally, the study included the establishment of a new staging system in CVL, as well as the analysis of various biomarkers in animals with different clinical scores. Forty-seven dogs naturally infected with *L. infantum* were evaluated, considering hematobiochemical, immunological, clinical, and parasitological aspects. Some biomarkers were identified that showed a positive correlation with the parasitic load observed in sandflies, including: (i) parasitic load in the skin; (ii) in lymph nodes; and (iii) in the spleen; as well as (iv) serum levels of globulin; and (v) alkaline phosphatase. Negative correlation biomarkers were also identified, such as: (i) erythrocyte values; (ii) lymphocytes; (iii) monocytes; and (iv) TCD8⁺ lymphocyte count. However, the positive correlation was stronger when the animals were categorized according to the severity of clinical signs. This correlation supports the clinical staging system developed in this study as a tool to indicate a high risk of dogs with more severe clinical worsening to infect sandflies with a high parasitic load of *L. infantum*. This method, being easy to execute and low cost, can be valuable in practical contexts, such as in epidemiological analyses including the development of monitoring and treatment prognosis strategies for canine disease and also contribute to studies related to immunoprotection through vaccines against CVL.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis; *Leishmania infantum*; dog; biomarkers; immune response; qPCR; Xenodiagnosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Casos de leishmaniose visceral por Unidade da Federação (UF) no Brasil em 2022. Fonte: SVSA/MS..... 21
- Figura 2:** Biomarcadores da leishmaniose visceral canina relacionados à susceptibilidade ou resistência frente a infecção por *L. infantum*. As setas (↑ e ↓) indicam o aumento e diminuição em níveis de biomarcadores, respectivamente; =: níveis normais aproximados; Parâmetros hematológicos: diminuição dos glóbulos vermelhos, linfócitos, eosinófilos e plaquetas; Parâmetros bioquímicos alterados: hiperproteinemia, hipoalbuminemia, aumento da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, ureia, e níveis de creatinina. Fonte: Adaptado GONÇALVES et al. (2019)..... 25
- Figura 3:** Mapa de localização do município de Porteirinha, localizado no Norte de Minas Gerais. Colorido de vermelho está representado o município; o quadrado com borda vermelha mostra a localização da região urbana do município. DATUM: WGS 84, fonte: IBGE. Autor; Allan de Jesus Mendonça Severino, Ano: 2023. 37
- Figura 4:** Fluxograma da triagem de animais sororreagentes para leishmaniose visceral canina. Inicialmente foi realizado o teste rápido imunocromatográfico *Dual Path Platform* (DPP® - Biomanguinhos) e os animais positivos foram submetidos ao teste sorológico confirmatório (ELISA). 38
- Figura 5:** Fluxograma da etapa dos procedimentos realizados com animais sororreagentes escolhidos aleatoriamente após triagem por TR-DPP e ELISA. 39
- Figura 6:** Teste Rápido DPP®. em "A)" teste reagente para LVC; em "B)" teste não reagente para LVC. 40
- Figura 7:** Recipientes utilizados para a realização do xenodiagnóstico. Na foto a esquerda mostra um recipiente em PVC (10 cm de diâmetro e 5 cm de altura) contendo uma tela de náilon de malha fina onde foram acondicionados os flebotomíneos para a alimentação na pele da orelha interna do cão, A direita a foto mostra um recipiente plástico com o fundo com gesso úmido onde os insetos eram mantidos após a alimentação sanguínea..... 42
- Figura 8:** Imuno-histoquímica do baço, linfonodo e pele de animais naturalmente infectados. Onde "+" significa carga parasitária discreta, "++" carga parasitária moderada e "+++" carga parasitária intensa. As setas pretas representam amastigotas marcadas nos tecidos. 46
- Figura 9:** Resultado do teste de ELISA para confirmação de cães DPP reagentes. No eixo Y ilustra a absorbância (450 nm) e no eixo X os controles negativos (CN), os controles positivos (CP) e as amostras de soro dos cães testados. A linha contínua no eixo Y representa *cut off*

(calculado através da curva ROC), e as linhas pontilhadas a faixa que foi considerada como resultado indeterminado (10% do *cut off*). (A) primeira etapa dos resultados para o ELISA, (B) segunda etapa, (C) terceira etapa. 49

Figura 10: Correlação entre IgG total e a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo x representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo y representa os valores de absorvância (densidade óptica) a 450 nm de IgG. 53

Figura 11: Correlação entre a carga parasitária (CP) de *Leishmania infantum* nos tecidos (pele, baço, linfonodo e medula óssea) com a carga parasitária nos flebotomíneos, empregando-se a metodologia de qPCR. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa carga parasitária de *L. Infantum* nos tecidos: (A) pele; (B) baço; (C) linfonodo; (D) medula óssea. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico. 54

Figura 12: Correlação entre os parâmetros do hemograma com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa os parâmetros do hemograma: (A) eritrócitos; (B) hemoglobina; (C) hematócrito; (D) volume corpuscular médio (VCM); (E) Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico. 55

Figura 13: Correlação entre os parâmetros do leucograma com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa os parâmetros leucocitários: (A) Leucócitos totais; (B) Linfócitos; (C) Monócitos; (D) Eosinófilos; (E) Neutrófilos segmentados; (F) Plaquetas totais. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico. 56

Figura 14: Correlação entre os parâmetros dos bioquímicos com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa os parâmetros bioquímicos: (A) ureia; (B) creatinina; (C) glicose; (D) albumina; (E) globulina; (F) proteínas totais; (G) razão albumina/globulina. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico. 57

Figura 15: Correlação entre os parâmetros dos bioquímicos enzimáticos com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa os parâmetros bioquímicos enzimáticos: (A) alanina aminotransferase (ALT); (B) aspartato aminotransferase (AST); (C) gama glutamil transferase (GGT); (D) fosfatase alcalina. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico..... 58

Figura 16: Correlação entre os marcadores celulares com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa os marcadores celulares: (A) representa a população de linfócitos T CD5⁺CD4⁺; (B) representa a população de linfócitos T CD5⁺CD8⁺; (C) representa a população de linfócitos B CD21⁺; (D) representa a população de monócitos CD14⁺. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico..... 59

Figura 17: Correlação entre a pontuação do escore clínico com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa a somatória dos Sinais clínicos. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram representadas pela linha de tendência em vermelho. E a força da correlação (r) está descrita no gráfico. 60

Figura 18: Avaliação da carga parasitária dos “pools” de flebotomíneos em relação aos estádios clínicos. (A) Comparação da carga parasitária nos flebotomíneos entre os estádios (I, II, III), o eixo X representa os estadiamentos clínicos. O eixo Y representa a carga parasitária de *L. infantum* nos flebotomíneos. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas correspondentes dos respectivos grupos, conforme indicado acima das barras. (B) Correlação entre a carga parasitária nos flebotomíneos e a pontuação do escore clínico. O eixo X representa a carga parasitária de *L. infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa a somatória dos sinais clínicos dos cães naturalmente infectados. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico..... 62

Figura 19: Avaliação da carga parasitária na pele (da orelha), baço e linfonodo (poplíteo) empregando-se a metodologia Imuno-histoquímica em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. O eixo X representa os diferentes órgãos (baço, pele, linfonodo). O eixo Y representa a porcentagem da carga parasitária de *L. infantum*. As barras em na cor branca representam os resultados negativos (neg.), em cinza claro representa carga parasitária baixa (+), em cinza

escuro representa a carga parasitária intermediária (++) , em preto está representando a carga parasitária alta (+++). 63

Figura 20: Porcentagem da carga parasitária na pele (da orelha), baço e linfonodo (poplíteo) empregando-se a Imuno-histoquímica (IHQ) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* por diferentes estadiamentos (I, II, III). O gráfico “A)” representa a IHQ na pele; o “B)” IHQ no baço; “C)” IHQ no linfonodo. O eixo X representa os diferentes estadiamentos (I, II, III); o eixo Y representa a porcentagem da carga parasitária por categorias (neg., +, ++, +++); a barra na cor branca representa o tecido em que não foi encontrado amastigotas de *Leishmania* (neg.), a barra em cinza mais claro representa a carga parasitária discreta (+), a barra cinza mais escuro representa a carga parasitária moderada (++) , e a barra em preto representa a carga parasitária intensa (+++). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas correspondentes dos respectivos grupos do estadiamento clínico, conforme indicado acima das barras..... 64

Figura 21: Avaliação da carga parasitária no baço, pele (da orelha), linfonodo (poplíteo) e medula óssea empregando-se a metodologia de qPCR em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. O eixo X representa os diferentes órgãos (baço, pele, linfonodo, medula óssea). O eixo Y representa carga parasitária de *L. infantum* (nº de parasitos por μg do órgão). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas barras conectoras com asterisco. 65

Figura 22: Avaliação da carga parasitária em relação aos diferentes estadiamentos (I, II, III) pele (de orelha; A), no baço (B), linfonodo (poplíteo; C) e medula óssea (D) empregando-se a metodologia de qPCR. O eixo x representa os diferentes estádios clínicos (I, II, III). O eixo y representa carga parasitária de *L. infantum* (nº de parasitos por μg de tecido). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas correspondentes dos respectivos grupos, conforme indicado acima das barras..... 66

Figura 23: Avaliação dos parâmetros hematológicos da série vermelha em cães categorizados conforme os três estádios clínicos. O eixo X representa os diferentes estádios (I, II, III). O eixo Y representa os parâmetros hematológicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica intervalo de referência para cada biomarcador avaliado, conforme Kaneko (2022). O painel “A” representa o número de eritrócitos, “B” representa a quantidade de hemoglobina, “C” representa a porcentagem de Hematócritos, “D” representa Volume Corpuscular Médio (VCM), “E” representa a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas dos grupos correspondentes acima de cada barra. 67

Figura 24: Avaliação do leucograma e plaquetograma em cães categorizados conforme os três estádios clínicos. O eixo X representa os diferentes estádios (I, II, III). O eixo Y representa os parâmetros hematológicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica intervalo de referência para cada biomarcador avaliado. O painel “A” representa o número de leucócitos totais, “B” o número de linfócitos, “C” representa a número de monócitos, “D” o número de eosinófilos, “E” representa o número de neutrófilos segmentados, e o “F” o número de plaquetas totais. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas dos grupos correspondentes acima de cada barra. 68

Figura 25: Avaliação dos parâmetros bioquímicos em cães categorizados conforme os três estádios clínicos. O eixo X representa os diferentes estádios (I, II, III). O eixo Y representa os parâmetros bioquímicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica valores considerados como referência para cada biomarcador avaliado. O painel “A” representa os valores de ureia, “B” os valores de creatinina, “C” os valores de albumina, “D” os valores de globulina, “E” os valores de proteínas totais, “F” Razão albumina/globulina. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas dos grupos correspondentes acima de cada barra. 69

Figura 26: Avaliação dos parâmetros bioquímicos enzimáticos em cães categorizados conforme os três estádios clínicos. O eixo X representa os diferentes estádios (I, II, III). O eixo Y representa os parâmetros bioquímicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica o intervalo de referência para cada biomarcador avaliado. O painel “A” representa os valores de alanina aminotransferase (ALT), o “B” os valores de aspartato aminotransferase (AST), “C” os valores de gama glutamil transferase (GGT), “D” os valores de fosfatase alcalina (FA). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas dos grupos correspondentes acima de cada barra..... 70

Figura 27: Avaliação do perfil imunofenotípico *ex vivo* em leucócitos circulantes de cães categorizados conforme os três estádios clínicos. O Painel “A” representa a subpopulação de linfócitos T CD5⁺CD4⁺. O Painel “B” representa a subpopulação de linfócitos T CD5⁺CD8⁺. O Painel “C” representa a população de linfócitos B CD21⁺. O Painel “D” representa a população de monócitos CD14⁺. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas dos grupos correspondentes acima de cada barra..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de cães em diferentes estádios em relação aos sinais clínicos apresentados para LVC.....	41
Tabela 2: Perfil dos cães que participaram do estudo.	49
Tabela 3: Estatística descritiva (número de cães, mediana, média, desvio-padrão) correspondente às variáveis incluídas na tese.....	50
Tabela 4: Estatística descritiva dos parâmetros referentes ao hemograma.	51
Tabela 5: Estatística descritiva dos parâmetros referentes ao leucograma.....	51
Tabela 6: Estatística descritiva dos parâmetros referentes aos exames bioquímicos e enzimáticos.	51
Tabela 7: Estadiamento dos 47 cães naturalmente infectados do projeto.	61
Tabela 8: Positividade dos "pools" de flebotomíneos por estadiamento após se alimentarem em cães naturalmente infectados.	61
Tabela 9: Estatística descritiva dos marcadores celulares CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD21 ⁺ e CD14 ⁺	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CHCM	Hemoglobina corpuscular média
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COVID	<i>Corona vírus disease</i>
CP	Carga parasitária
DPP	<i>Dual Path Platform</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos de América
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamil transpeptidase
HE	hematoxilina e eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IR	Intervalo de referencia
KCl	Cloreto de Potássio
LABIC	Laboratório de Biologia das Interações Celulares
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LVC	Leishmaniose visceral canina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MFF	<i>Macs Facs Fix</i>
mg	Microgramas
MG	Minas Gerais
ml	Mililitros
MS	Ministério da Saúde
NO	<i>Nitric oxide</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PT	Proteínas Totais
PVC-LV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
qPCR	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>
qPCR	Real Time Quantitative PCR

RDW	<i>Red Cell Distribution</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UF	Unidade da Federação
VCM	Volume corpuscular médio
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Leishmaniose visceral	20
1.2	Leishmaniose visceral canina e sua imunologia.....	23
1.3	Relação parasito-hospedeiro invertebrado	25
1.4	Principais biomarcadores utilizados no monitoramento da leishmaniose visceral canina 26	
1.5	Determinação da carga parasitária por qPCR.....	30
1.6	Xenodiagnóstico	31
1.7	Estadiamento clínico	31
2	JUSTIFICATIVA.....	34
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	Considerações éticas.....	36
4.2	Área de estudo	36
4.3	Delineamento experimental.....	37
4.4	Triagem dos cães	39
4.4.1	Dual Path Platform (DPP® - Biomanguinhos)	39
4.4.2	ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).	40
4.5	Estadiamento dos cães.....	40
4.6	Xenodiagnóstico	41
4.7	Isolamento de <i>Leishmania</i> sp. em cultivo <i>in vitro</i>	42
4.8	Protocolo para o procedimento de eutanásia	43
4.9	Hemograma completo	43
4.10	Imunofenotipagem <i>ex vivo</i> de leucócitos circulantes	43
4.11	Avaliação da bioquímica sérica.....	44
4.12	Imuno-histoquímica.....	45

4.13	Quantificação da carga parasitária por reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR).....	46
4.14	Análises estatísticas.....	47
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Triagem de cães naturalmente infectados.....	48
5.2	Biomarcadores avaliados.....	50
5.3	Correlação entre biomarcadores e a carga parasitária de <i>Leishmania infantum</i> nos flebotomíneos.....	52
5.3.1	Correlação entre a absorbância de IgG total com a carga parasitária de <i>Leishmania infantum</i> nos flebotomíneos.....	52
5.3.2	Correlação entre a carga parasitária de <i>Leishmania infantum</i> nos tecidos com a carga parasitária nos flebotomíneos.....	53
5.3.3	Correlação entre os parâmetros hematológicos com a carga parasitária de <i>Leishmania infantum</i> nos flebotomíneos.....	54
5.3.4	Correlação entre os parâmetros bioquímicos e enzimático com a carga parasitária de <i>Leishmania infantum</i> nos flebotomíneos.....	56
5.3.5	Correlação entre os marcadores imunofenotípicos celulares com a carga parasitária de <i>Leishmania infantum</i> nos flebotomíneos.....	58
5.3.6	Correlação entre o escore dos sinais clínicos com a carga parasitária de <i>Leishmania infantum</i> nos flebotomíneos.....	59
5.4	Estadiamento clínico.....	60
5.5	Carga parasitária nos flebotomíneos.....	61
5.6	Isolamento de <i>Leishmania</i> sp. em cultivo <i>in vitro</i>	62
5.7	Avaliação da carga parasitária por Imuno-histoquímica (IHQ).....	62
5.8	Avaliação da carga parasitária por qPCR.....	65
5.9	Avaliação da carga parasitária por diferentes estádios clínicos.....	65
5.10	Avaliação dos parâmetros hematológicos por estádios clínicos.....	66
5.11	Avaliação dos parâmetros bioquímicos por estádios clínicos.....	69
5.12	Avaliação do perfil celular <i>ex vivo</i> por citometria de fluxo.....	71
6	DISCUSSÃO.....	73

7	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXO 1: CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 8/2022	
	104	
	ANEXO 2: TABELA DE SINAIS CLÍNICOS.....	105
	ANEXO 3: TERMO DE DOAÇÃO TERMO DE DOAÇÃO	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose visceral

As Leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. São parasitos digenéticos, apresentando duas formas de vida distintas: um estágio extracelular, encontrado no tubo digestivo de flebótomos (hospedeiro invertebrado), denominado promastigotas. Apresenta ainda um estágio intracelular, presente em células do sistema monocítico fagocitário de hospedeiros vertebrados, característica de amastigotas (SACKS, 1992).

Atualmente, a Leishmaniose está classificada entre as principais doenças negligenciadas do mundo, segundo a *World Health Organization* (WHO). Entre as diferentes formas clínicas [leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM)], a forma visceral, causada principalmente pelas espécies *Leishmania donovani* ou por *Leishmania infantum*, destaca-se pelo seu impacto significativo no curso da doença, sendo considerada a mais grave e potencialmente fatal (CHAPPUIS et al., 2007). Em 2021, foram relatados à OMS 11.743 novos casos de LV em que 40% destes ocorreram no Mediterrâneo Oriental, seguido por 33% na África. As Américas e o Sudeste Asiático relataram 16% e 12% dos casos, respectivamente. Os três “hotspots” eco-epidemiológicos para a LV estão na África Oriental, com 66% de todos os casos em todo o mundo; o subcontinente indiano, com 12%; e o Brasil, com 16%. Estes dados devem ser interpretados com cuidado, uma vez que é incerto se a diminuição ou o aumento do número de casos em alguns países ou regiões pode ser reflexo de uma mudança epidemiológica real ou se deve ao efeito da COVID-19 na vigilância de doenças (WHO, 2022).

No Brasil, de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no ano de 2022 foram registrados 1.684 casos de LV, apresentando um coeficiente de incidência de 0,83 por 100.000 habitantes e uma taxa de letalidade de 11%. Na região sudeste, houve a confirmação de 245 casos, sendo que Minas Gerais contribuiu com 151 desses casos, representando a maioria na região sudeste do país (Figura 1). Em Minas Gerais, o coeficiente

de incidência foi de 0,74 por 100.000 habitantes, com uma taxa de letalidade de 15%.

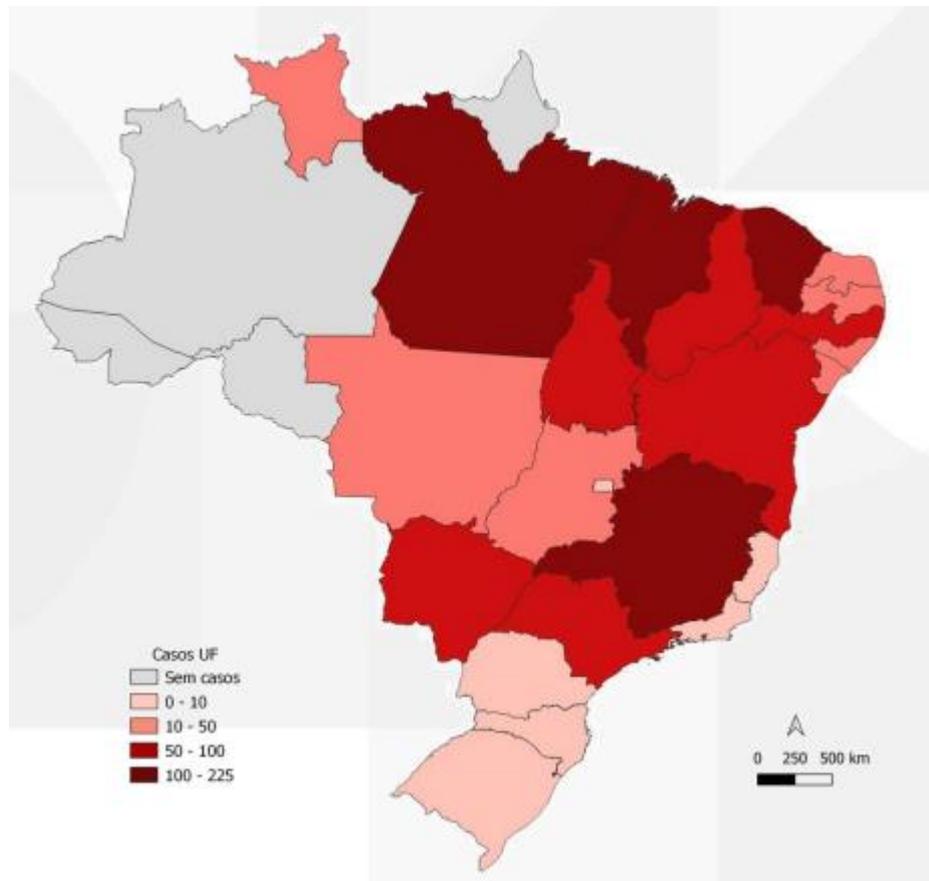


Figura 1: Casos de leishmaniose visceral por Unidade da Federação (UF) no Brasil em 2022. Fonte: SVSA/MS.

Como fonte histórica, o agente etiológico causador da LV foi observado pelo médico Willian Leishman em 1901, com visualização de formas parasitárias amastigotas nos tecidos de soldados britânicos doentes que serviam na Índia. Posterior a esses achados, o agente causador da LV foi isolado pelo Dr. Leishman e o Dr. Charles Donovan em trabalhos separados, porém, com publicações simultâneas. Devido a tais descobertas, a nova espécie recebeu o nome de *Leishmania donovani* em homenagem aos pesquisadores, com o gênero *Leishmania* descrito por Ross (1903), sendo considerada antroponose no subcontinente indiano (ZIJLSTRA et al., 2003), que tem como agente etiológico a espécie *Leishmania donovani*. No novo Mundo, a espécie do parasito causador da LV foi denominada *Leishmania chagasi* e no Velho Mundo, *Leishmania infantum*, sendo consideradas atualmente estas duas espécies como sinônimas (LUKEŠ et al., 2007). Entretanto, os artrópodes transmissores do agente durante o repasto sanguíneo são distintos nesses continentes, sendo dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, no Novo e Velho Mundo, respectivamente (LAINSON; SHAW, 1987).

O cão, assim como os demais hospedeiros vertebrados susceptíveis, infecta-se através do repasto sanguíneo principalmente de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, com formas infectantes denominadas promastigotas metacíclicas, que são regurgitadas junto à saliva do inseto. Diante do ato de hematofagia de flebotomíneos, assim como a saliva junto ao parasito infectante presente na pele do animal, ocorre a quimiotaxia de leucócitos para o local do repasto sanguíneo (BRAZIL; BRAZIL, 2018), o que favorece a fagocitose das formas parasitárias e formação do fagolisossomos, principalmente por macrófagos. As formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas e apresentam resistência a ação das enzimas lisossomais, tendo assim um dos mecanismos de escape da resposta imune do hospedeiro. As células monocíticas fagocitárias podem chegar ao sistema linfático e linfonodos contendo em seu interior as formas parasitárias, disseminando, dessa forma, para demais órgãos do hospedeiro, inclusive, para a pele, onde outras fêmeas de *L. longipalpis* contraem o parasito (DEANE; GRIMALDI, 1985).

A LV foi restrita às áreas rurais do país até a década de 1980, onde passou a ocorrer de forma endêmica e epidêmica em grandes cidades do Nordeste brasileiro e se disseminou para outras grandes cidades do país (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990)

Nesse âmbito, o cão é o principal reservatório vertebrado do parasito e apresenta papel relevante na transmissão a seres humanos, pois o aumento da incidência na infecção canina precede casos humanos em regiões anteriormente não endêmicas (DANTAS-TORRES, 2007). Além disso, em consequência à demanda pela urbanização desordenada, o cão passou a ter maior importância epidemiológica como reservatório do parasito e, como consequência, uma maior aproximação com os humanos se comparados a animais silvestres no meio rural (DANTAS-TORRES, 2007). Além disso, o cão é susceptível e apresenta elevado parasitismo cutâneo (DEANE, 1956; ASHFORD, 1996), sendo a situação agravada pelo descontrole da população canina, com superpopulação e abandono desses animais nas grandes cidades.

O Ministério da Saúde do Brasil (MS) tem como pilares no Programa de Controle da Leishmaniose elaborado anteriormente na década de 50 por Deane (1956), o diagnóstico precoce e tratamento de casos humanos, controle do vetor com aplicação de inseticidas no peridomicílio e intradomicílio, diagnóstico sorológico e eutanásia de cães sororreagentes. Entretanto, passados 67 anos da implantação desse programa, ainda há problemas na efetividade dessas ações, como exemplificado por Braga et al. (1998), que observou após cinco anos de monitoramento do reservatório canino, que é possível diminuir a prevalência da infecção nos cães até um limite específico, que varia entre 0,5% e 1%. Esta redução, no entanto, não é

acompanhada, necessariamente, de uma interrupção da transmissão ao homem. No entanto, um estudo mais recente demonstrou que a eutanásia de cães com LV é uma medida importante para redução da incidência tanto humana quanto canina da doença (FRANÇA-SILVA et al., 2023). Em 2021, o MS emitiu uma nota técnica (Ministério da Saúde, 2021) propondo a incorporação das coleiras impregnadas com inseticida para o controle da leishmaniose visceral em municípios prioritários. Diante do exposto, fica clara a necessidade de desenvolver novas metodologias de forma a entender como a relação parasito/hospedeiro-cão/vetor se dá em suas inúmeras variáveis, principalmente na infecção natural. Isto seria importante para que se possa traçar novas metodologias para a prevenção efetiva da infecção em cães, com consequente diminuição da infecção em humanos. Assim, a domesticação desses animais que decorre de milhares de anos, poderá servir como fonte de relação saudável entre humanos e cães, pela valorização da vida e da posse responsável, visto que a proximidade entre essas espécies e a familiarização desses animais aumenta a cada dia, assim como a incidência da doença.

1.2 Leishmaniose visceral canina e sua imunologia

Os cães infectados por *L. infantum* podem desenvolver distintas formas clínicas. Além dos sinais clínicos, há alterações em exames bioquímico-hematológicos com a progressão clínica da LVC, bem como diminuição da razão albumina/globulina, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, trombocitopenia, anemia normocítica normocrômica (PALTRINIERI et al., 2016). Uma das principais causas de morte nos cães se dá pela falência renal por deposição de complexos antigênicos, ação direta do parasito e resposta imune exacerbada com lesão do tecido renal (GIUNCHETTI et al., 2006; REIS et al., 2010; MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022).

A primeira interface no sítio de infecção do cão se dá após o repasto sanguíneo das fêmeas de *L. longipalpis*, onde inicia-se a quimiotaxia de neutrófilos para a fagocitose de *L. infantum*. Nos vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos dessas células há o início da destruição do parasito por enzimas proteolíticas e radicais livres de oxigênio presente nos lisossomos com formação de fagolisossomos, produção de IL-8 e consequente quimiotaxia de novos neutrófilos no sítio de infecção. Os macrófagos são recrutados mais tardiamente em comparação aos neutrófilos. Entretanto, os macrófagos são fundamentais na tentativa de neutralização do patógeno com produção de radicais livres de oxigênio e óxido nítrico, extremamente tóxico aos parasitos e até mesmo, às células do hospedeiro. (BOGDAN;

RÖLLINGHOFF, 1998; STAFFORD; NEUMANN; BELOSEVIC, 2002).

O surgimento de sinais clínicos como a progressão da doença, são fortemente correlacionados a resposta imunológica (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004; ROATT et al., 2014; GIUNCHETTI et al., 2019a). A resposta imune protetora pode ser caracterizada pela indução da resposta celular, visto que a resposta humoral tem pouca eficácia em protozoários intracelulares (PRAJEETH et al., 2011). Em relação a resistência ao patógeno, apesar da complexidade da doença e dos diferentes sinais clínicos que os cães podem apresentar, já foi demonstrado que está associada a uma forte indução de uma resposta Th1, com a produção de IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Por outro lado, um perfil Th2, incluindo as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β , está relacionado à susceptibilidade (GONÇALVES et al., 2019; LEITE et al., 2023). Além disso, a elevação nos níveis das subpopulações de células T CD4⁺ e CD8⁺ foi associada a um padrão de resistência na LVC. Por outro lado, a proliferação policlonal de células B, direcionada à diferenciação em plasmócitos, contribui para uma elevada produção de anticorpos, característica de cães sintomáticos com elevada susceptibilidade à LVC. De fato, alguns estudos enfatizam que a resposta imune humoral também exerce papel importante na patogênese, relacionando o aumento de imunoglobulinas conforme a progressão clínica para a forma sintomática na LVC (DAY, 2007; REIS et al., 2009). Além disto, tem sido descrita maior carga parasitária, em diferentes órgãos-alvo do parasito, relacionado a elevação de IgG2, IgA, IgM e IgE (INIESTA; GÁLLEGO; PORTÚS, 2005; DAY, 2007; MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022). Este perfil de resposta imune resulta em elevada carga parasitária em diferentes órgãos na LVC (GIUNCHETTI et al., 2006, 2019; REIS et al., 2010).

Outros biomarcadores também se tornam necessários para a compreensão da progressão da LVC associados a aspectos clínicos e a carga parasitária, fundamentais para um melhor entendimento da imunopatologia desta doença (REIS et al., 2009). A Figura 2 representa um resumo destes biomarcadores descritos na literatura.

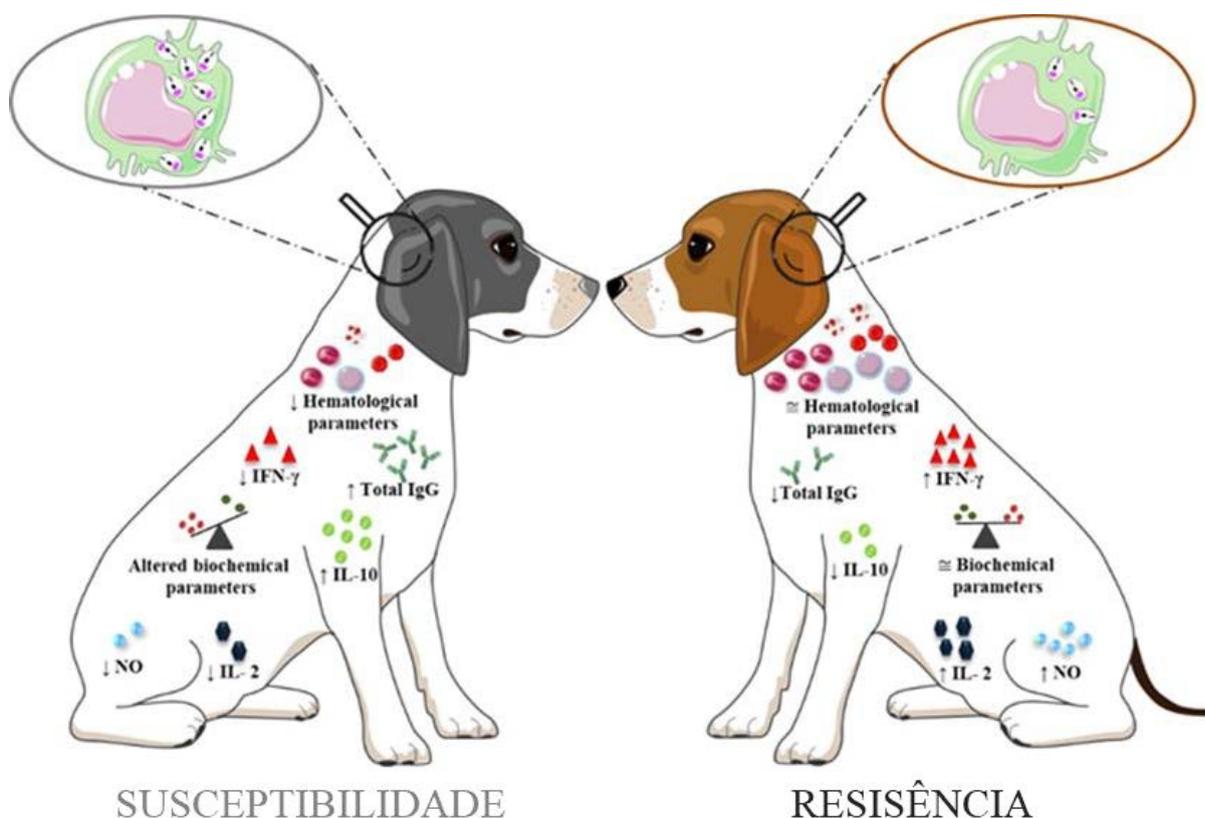


Figura 2: Biomarcadores da leishmaniose visceral canina relacionados à susceptibilidade ou resistência frente a infecção por *L. infantum*. As setas (↑ e ↓) indicam o aumento e diminuição em níveis de biomarcadores, respectivamente; ≈: níveis normais aproximados; Parâmetros hematológicos: diminuição dos glóbulos vermelhos, linfócitos, eosinófilos e plaquetas; Parâmetros bioquímicos alterados: hiperproteinemia, hipoalbuminemia, aumento da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, ureia, e níveis de creatinina. Fonte: Adaptado GONÇALVES et al. (2019).

1.3 Relação parasito-hospedeiro invertebrado

A espécie de flebotomíneo *L. longipalpis* é amplamente encontrada no território brasileiro, inclusive em regiões urbanizadas. São insetos holometábolos e têm como ciclo de vida, que compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. As fêmeas ovipõem em locais ao abrigo da incidência solar direta e com acúmulo de matéria orgânica, importante fonte de alimentação para as larvas após eclosão e desenvolvimento. A fonte principal de alimentação dos adultos são os carboidratos, como seiva vegetal e fluidos orgânicos de demais insetos. Esse aporte nutritivo é necessário não somente para a sobrevivência da espécie, como também para o desenvolvimento de *L. infantum* no intestino desses artrópodes. Entretanto, a hematofagia torna-se necessária para as fêmeas de *L. longipalpis* para desenvolvimento do ovário e esse aspecto é essencial na dinâmica de infecção e transmissão de *L. infantum* em hospedeiros

vertebrados susceptíveis (BRAZIL; BRAZIL, 2018). No inseto vetor, após o repasto sanguíneo com *L. infantum*, há o desenvolvimento parasitário no intestino do flebótomo a partir das formas amastigotas, para promastigota procíclica, nectoma, haptoma, paramastigota e na probóscida, a forma infectante promastigota metacíclica (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; WALTERS, 1993).

Atualmente, há escassez de estudos na literatura que abordem a realização do xenodiagnóstico para detectar a LVC, devido às suas dificuldades práticas (DA COSTA-VAL et al., 2007; MICHALSKY et al., 2007; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016; ROCHA et al., 2020). Contudo, ainda não está claro qual a relação do parasitismo na LVC, independente do órgão, que poderia estar associado à infecção por *L. infantum* aos flebotomíneos. Esta informação atualmente é considerada fundamental em estudos epidemiológicos, bem como para avaliações terapêuticas e vacinais, considerando a necessidade de se realizar testes parasitológicos de alto desempenho (como a PCR *real time*) em substituição ao xenodiagnóstico (em função de ser necessária estrutura laboratorial para manter a colônia de flebotomíneos, restringindo seu uso).

1.4 Principais biomarcadores utilizados no monitoramento da leishmaniose visceral canina

O termo “biomarcador” refere-se a uma característica mensurável e objetiva que serve como indicador de um processo biológico normal, patológico ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP, 2001). A busca por biomarcadores é de extrema importância, uma vez que sua identificação permite uma maior precisão na determinação da susceptibilidade, diagnóstico, prognóstico (evolução e possíveis consequências de uma doença) e predição (avaliação das possíveis respostas do paciente a medicamentos e agentes externos) de uma determinada condição (CALIFF, 2018; BODAGHI; FATTAHI; RAMAZANI, 2023). No entanto, é essencial considerar fatores como a sensibilidade, seletividade e facilidade de observação, medição e avaliação desses biomarcadores para uma aplicação eficaz. Dessa forma, a identificação de possíveis biomarcadores podem ser obtida a partir de diversas fontes, desde questionários clínicos até medições moleculares. No caso da LV, vários estudos têm sido desenvolvidos para buscar biomarcadores, particularmente aqueles relacionados a resposta imune e que são importantes para o monitoramento da evolução da doença, aplicados a análises de protocolos terapêuticos e vacinais (SOLANO-GALLEGO et al., 2009, 2011; GANNAVARAM et al., 2014; SOLCÀ et

al., 2016; BRODSKYN; KAMHAWI, 2018; GONÇALVES et al., 2019; DE LIMA RUY DIAS et al., 2020). Neste sentido, durante o curso da infecção por *L. infantum*, observa-se um perfil de resposta imune mista Th1/Th2. Porém diferentes perfis de citocinas são observados na resposta imune compartimentalizada na LVC, especialmente tendo em vista os órgãos que *L. infantum* utiliza para sua replicação, como baço, fígado, linfonodos, medula óssea, pele e sangue (MAIA; CAMPINO, 2008a). A quantidade e a intensidade dos sinais clínicos são influenciadas por diversos fatores, incluindo a cepa do parasito, a genética e o estado imunológico do hospedeiro (RIBEIRO et al., 2018) A busca por biomarcadores relacionados à resistência ou susceptibilidade tem revelado um perfil misto de citocinas, porém com uma proeminente resposta imune pró-inflamatória como sendo relevante para a replicação de *L. infantum* em níveis baixos, como observado em animais assintomáticos com níveis elevados de IFN- γ , TNF- α , e níveis reduzidos de IL-4, TGF- β e IL-10 (GIUNCHETTI et al., 2019; GONÇALVES et al., 2019; LEITE et al., 2023).

A evolução da infecção por *Leishmania* em cães está vinculada à resposta imunológica do hospedeiro e à persistência e multiplicação do parasito (REIS et al., 2010). Atualmente, há consenso sobre a predominância da resposta imune adaptativa como a principal linha de defesa contra essa infecção (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022). A resposta imune Th1, caracterizada pela produção de citocinas inflamatórias como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-12 e IL-2, tem sido associada ao perfil de resistência à infecção (GIUNCHETTI et al., 2019; GONÇALVES et al., 2019; LEITE et al., 2023). A produção dessas citocinas, especialmente do IFN- γ , regula positivamente a atividade dos macrófagos na produção de óxido nítrico (NO), que é o principal mecanismo efetor responsável pela eliminação dos parasitos intracelulares (BANETH et al., 2008; GIUNCHETTI et al., 2019; GONÇALVES et al., 2019; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; LEITE et al., 2023).

Em estudos com cães naturalmente infectados por *L. infantum*, foi observado um decréscimo nos níveis de células T CD4⁺ e CD8⁺, juntamente com células B CD21⁺, durante a progressão da LV (DE ALMEIDA LEAL et al., 2014; REIS et al., 2006). Além disso, foi constatada uma redução na circulação de monócitos CD14⁺ com o agravamento da LVC (GIUNCHETTI et al., 2006; REIS et al., 2006). Resultados semelhantes foram obtidos em cães com alta carga parasitária, apresentando uma diminuição no número de linfócito T totais CD5⁺ e subpopulações de células T (CD4⁺ e CD8⁺), além de contagens mais baixas de células B CD21⁺ e monócitos CD14⁺ (REIS et al., 2006, 2009, 2010).

Dentre as anormalidades encontradas em exames laboratoriais de rotina, como o leucograma, eritrograma e plaquetograma, além dos exames bioquímicos de rotina ou urinálise, podem fornecer suporte para o diagnóstico clínico da suspeita de LVC. No entanto, é importante destacar que as alterações hematológicas observadas na LVC são inespecíficas e podem ser influenciadas por diferentes fatores (GRADONI; GRAMICCIA; MANCIANTI, 1987). No eritrograma, uma anomalia característica é a anemia normocítica normocrômica leve a moderada (REIS et al., 2006; DA COSTA-VAL et al., 2007; FREITAS et al., 2012). Essa anemia pode ser resultado de diferentes fatores, como hemorragia, hemólise ou supressão da medula óssea, associada à infecção por *Leishmania*.

A trombocitopenia leve a moderada também é frequentemente observada em cães com LVC, sendo a trombocitopenia acentuada encontrada em casos de coinfeção com outros patógenos transmitidos por vetores (*Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* ou *A. platys*) (CORTESE et al., 2009; PALTRINIERI et al., 2016).

No leucograma, é comum observar neutrofilia, que é um aumento na contagem de neutrófilos, devido a uma resposta inflamatória sistêmica. Esse aumento pode ser mais evidente em casos com lesões cutâneas ulcerativas e infecção bacteriana secundária (NICOLATO et al., 2013). Além disso, podem ocorrer ocasionalmente outras alterações nas diferentes populações de leucócitos, como linfopenia, linfocitose ou eosinofilia (DE TOMMASI et al., 2014; NICOLATO et al., 2013), que são respostas do sistema imunológico diante da infecção por *Leishmania*.

Nos exames bioquímicos de rotina, algumas anomalias são típicas da LVC, como a azotemia, que é o aumento dos níveis de nitrogênio no sangue em decorrências de alterações que relacionadas à função renal (PALTRINIERI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013; TVARIJONAVICIUTE; CERON; GARCÍA-MARTINEZ, 2012). Essas mudanças bioquímicas podem estar relacionadas a resposta imune humoral policlonal, que leva a níveis elevados de proteínas (especialmente as imunoglobulinas) no soro com potencial dano ao tecido renal (ALMEIDA et al., 2005; PALTRINIERI et al., 2016; PROVERBIO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). A respeito de biomarcadores de danos renais, são recomendados pela “*International Renal Interest Society (IRIS)*” para avaliar e monitorar danos/função renal, a creatinina sérica e a razão proteína/creatinina urinária (UPC) (CHEN; KNICELY; GRAMS, 2019). Outros biomarcadores mais sensíveis, como a imunoglobulina G (IgG) e as proteínas de fase aguda (como a proteína C reativa - CRP) e

ferritina, possuem proteínas de alto peso molecular e podem ser utilizados para monitorar a permeabilidade da barreira glomerular (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2015; MARTINEZ-SUBIELA et al., 2011; SILVESTRINI et al., 2014).

As investigações histopatológicas realizadas durante a LVC são fundamentais para uma melhor compreensão dos eventos associados ao surgimento de formas clínicas graves da doença e sua relação com a transmissão do parasito (GIUNCHETTI et al., 2019). A análise histopatológica de órgãos infectados, corados com hematoxilina e eosina (HE), tem sido utilizada para identificar a presença de parasitos. Entretanto, pode ser necessário um exame minucioso, pois as amastigotas muitas vezes não são facilmente reconhecidas (XAVIER et al., 2006). Embora a técnica apresente baixa sensibilidade, estudos realizados por Moreira et al. (2007) demonstraram que o material proveniente do linfonodo poplíteo foi o mais efetivo na detecção do parasito, seguido do baço e da medula óssea.

Abordagens através da Imuno-histoquímica (IHC) podem ser usadas como ferramenta complementar para confirmar o diagnóstico na HE, especialmente em órgãos que não possuem alta carga parasitária (MAIA; CAMPINO, 2008a). O método IHC para detecção de amastigotas de *Leishmania* em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina pode ser aplicado usando o sistema estreptavidina-peroxidase/biotina com soro hiperimune canino como anticorpo primário ou pelo uso de anticorpos policlonais ou monoclonais anti-*Leishmania* (BOURDOISEAU; MARCHAL; MAGNOL, 1997; TAFURI et al., 2004). XAVIER et al. (2006). A análise de biópsias de pele de diferentes regiões anatômicas, demonstrou que há maior sensibilidade (62,1%) usando IHC do que com HE (44,8%). Resultados semelhantes foram obtidos por Moreira et al. (2007), onde usaram a imunofluorescência direta no linfonodo poplíteo com especificidade de 100% e sensibilidade de 92,68%, 60% e 73,91% em cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, respectivamente. Essa técnica se demonstrou ser útil para confirmar o diagnóstico de LVC quando os parasitos não são claramente identificáveis sob o microscópio óptico e quando o padrão histológico indica claramente a doença (MOREIRA et al., 2007).

É importante levar em consideração que a identificação microscópica, histopatológica e Imuno-histoquímica de amastigotas requer considerável experiência e treinamento e está sujeita à habilidade do observador. Esses métodos também podem produzir resultados falsos negativos, pois sua sensibilidade depende da carga parasitária, ou resultados falsos positivos, pois outros artefatos visualizados pela microscopia óptica podem ser erroneamente considerados como

amastigotas (BANETH et al., 2008; GOMES et al., 2008).

1.5 Determinação da carga parasitária por qPCR

Com o avanço da biologia molecular, a técnica de PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR), tem sido amplamente utilizada para quantificar a carga parasitária em diferentes tecidos de cães infectados por *Leishmania infantum* com ou sem sinais clínicos. Essa abordagem é aplicável no diagnóstico, monitoramento do tratamento e em estudos clínicos para validar vacinas (CHAGAS et al., 2021; DE CARVALHO et al., 2018; FRANCINO et al., 2006; QUARESMA et al., 2009).

Com a autorização do Ministério da Saúde (MS) e do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) para o uso do medicamento MilteforanTM no tratamento de cães com LVC, o emprego da técnica de qPCR, pode ser altamente vantajoso no monitoramento da carga parasitária, antes, durante e após o período de tratamento (CHAGAS et al., 2021). Existem poucos estudos comparando a carga parasitária de diferentes tecidos e órgãos em cães com LVC. Em um estudo anterior realizado por (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012), foi feita a comparação da carga parasitária por qPCR de amostras de “swabs” conjuntivais com medula óssea e pele. Foi observado que as amostras de “swabs” conjuntivais apresentaram baixa carga parasitária em cães infectados. No entanto, este estudo demonstrou que as amostras de medula óssea exibiram maiores cargas parasitárias, tanto em cães sintomáticos quanto assintomáticos. Resultados semelhantes foram encontrados por CHAGAS et al. (2021), onde a pele foi o tecido com a maior carga parasitária, seguida pelo linfonodo poplíteo e punções de medula óssea. As amostras de “swabs” conjuntival apresentaram a menor carga parasitária quando avaliadas individualmente. Em relação aos grupos clínicos deste estudo, os cães com manifestações clínicas mais graves apresentaram uma carga parasitária mais elevada em diferentes tecidos quando comparados aos animais dos demais grupos, consistentes com estudos anteriores (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012; GIUNCHETTI et al., 2006b, 2008a, 2008b; REIS et al., 2006a, 2013).

É importante destacar que a pele tem sido apontada como um dos órgãos com níveis mais altos de carga parasitária em diversos estudos (REIS et al., 2010), assim como a medula óssea e o linfonodo poplíteo, conforme indicado por CALDAS et al. (2020).

Além de sua utilidade no diagnóstico, monitoramento do tratamento e validação de vacinas, a análise da carga parasitária também pode auxiliar na identificação da capacidade

infeciosa dos cães para os vetores flebotomíneos (BORJA et al., 2016). Portanto, a qPCR se apresenta como uma ferramenta valiosa no estudo da LVC em cães e pode contribuir significativamente como ferramenta para auxiliar o monitoramento da LVC nas áreas endêmicas.

1.6 Xenodiagnóstico

O Xenodiagnóstico é a única técnica que avalia se um hospedeiro específico, infectado com um patógeno, é capaz de transmiti-lo naturalmente ao seu vetor potencial (GUARGA et al., 2000b). Na LVC é utilizado para avaliar a importância epidemiológica de cães parasitados por *L. infantum*, pois permite estabelecer tanto as taxas de alimentação quanto as taxas de infecção em flebotomíneos, fornecendo simultaneamente dados cruciais sobre a potencial transmissibilidade da infecção (MOLINA et al., 1994), sendo essencial no acompanhamento de cães após o tratamento (MIRÓ et al., 2011; RIBEIRO et al., 2018) e em ensaios vacinais (AGUIAR-SOARES et al., 2020; FERNANDES et al., 2014; REGINA-SILVA et al., 2016; ROATT et al., 2014).

Embora tenha alta especificidade, é uma técnica relativamente sensível e pode variar de acordo com a carga parasitária do animal, ou pela implementação do procedimento. Apesar da grande utilidade, sua utilização rotineira não é recomendada devido à sua complexidade e à necessidade de um laboratório especializado com uma colônia bem estabelecida de flebotomíneos (DA COSTA-VAL et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008b).

A literatura apresenta controvérsias em relação à infectividade de cães assintomáticos e sintomáticos. Alguns estudos mostram que não é possível identificar diferença na taxa de infecção de flebótomos em cães com diferentes manifestações clínicas (BORJA et al., 2016, 2016b; GUARGA et al., 2000; MOLINA et al., 1994). Entretanto, em outros estudos a taxa de infecção dos flebótomos foi maior para os cães sintomáticos em relação aos cães assintomáticos (COURTENAY et al., 2002; MICHALSKY et al., 2007). Para melhorar a eficiência da técnica, ferramentas moleculares como a PCR e a qPCR vêm sendo utilizadas para detecção e quantificação do parasito no inseto vetor (RANASINGHE et al., 2008).

1.7 Estadiamento clínico

O estadiamento é um sistema que classifica a doença em diferentes fases de evolução clínica (estádios), com o objetivo de ajudar o médico veterinário a determinar a terapia adequada, formular um prognóstico e implementar etapas de acompanhamento do cão com LV

(SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Os critérios de classificação devem ser simples, embasados em parâmetros clínicos e laboratoriais, frequentemente empregando-se métodos diagnósticos de fácil acesso. Destaca-se que o estadiamento na LVC é um parâmetro clínico-laboratorial, e que reflete o perfil da doença momentâneo, e que pode demonstrar biomarcadores indicativos de piora ou melhora, durante o acompanhamento do animal (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Os primeiros estudos na LVC buscando estabelecer critérios para o estadiamento da doença consideraram a classificação da evolução da doença como: assintomáticos - ausência completa de sinais referentes à infecção por *L. infantum*; casos oligossintomáticos - presença de adenopatia, perda de peso, leve esplenomegalia; casos patentes - alterações cutâneas (descamação, pelos opacos), ceratoconjuntivite, onicogribose (hipertrofia das unhas), esplenomegalia evidente; e, casos patentes graves - os cães parecem extremamente fracos e com dor, apresentando alopecia e úlceras (POZIO et al., 1981). No entanto, Mancianti et al. (1988) influenciaram fortemente a comunidade científica, que passou a adotar sua classificação clínica, apresentando três principais tipos de estadiamento: casos assintomáticos - ausência de sinais clínicos; casos oligossintomáticos - adenopatia linfóide, leve perda de peso e/ou pelos opacos; e, casos sintomáticos - todos ou alguns dos sinais graves da doença, como alterações cutâneas (descamação, eczema furfuráceo, úlceras), onicogribose, ceratoconjuntivite, rigidez dos membros posteriores, etc. Esses critérios foram por muito tempo utilizados como principal forma de classificação (estadiamento). Porém, essa classificação era feita com base nos resultados apenas do exame físico, não sendo considerada anormalidades clínico-patológicas nos cães, por meio de exames complementares, e que poderiam evidenciar disfunções orgânicas mesmo sem manifestações clínicas aparentes (BANETH et al., 2008). Com o avanço da busca por diferentes tratamentos, os sistemas de estadiamento clínico visam agrupar pacientes com a mesma gravidade do quadro clínico, balizando o prognóstico terapêutico. Deste modo, torna-se uma ferramenta muito útil para avaliar a eficácia das diferentes terapias, decidir sobre a terapia mais adequada para cada paciente e monitorar o prognóstico ao longo do tratamento. Solano-Gallego et al. (2009, 2011) propuseram um sistema de quatro estádios clínicos, considerando a análise da LVC na Europa, baseado em sinais clínicos, anormalidades clínico patológicas e perfil sorológico. Este estudo propôs a indicação do tipo de terapia, relacionando ao prognóstico para cada estágio. No Brasil, uma organização não governamental, sem fins lucrativos, formada por Médicos Veterinários (Brasileish), também propuseram um sistema de estadiamento para

cães com LVC, baseados no proposto por Solano-Gallego et al. (2009, 2011). Assim, em vez de quatro estádios clínicos, relataram cinco estádios, sendo adicionado o estágio “sem doença”, relacionando o estadiamento à terapia a ser utilizada, incluindo a imunoterapia e imunomodulação na LVC (BRASILEISH, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A LV é um problema de saúde pública em expansão em todo o país. No Brasil, foram registrados 1.684 casos de LV no ano de 2022, apresentando um coeficiente de incidência de 0,83/100.000 habitantes e uma taxa de letalidade de 11%. Minas Gerais foi responsável por 151 desses casos, representando a maioria na região sudeste do país, com uma taxa de letalidade de 15% (SVS/MS 2022).

Os cães, principais hospedeiros urbanos do parasito, estão cada vez mais sendo considerados como membros da família pelos seus tutores. Isso dificulta a aplicação de uma medida de controle sugerida pelo Ministério da Saúde, que é a eutanásia de cães soropositivos. Muitos tutores se opõem a essa recomendação do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) devido à relação afetiva com seus animais. Essa pressão social levou o Ministério da Saúde (MS), em conjunto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a autorizar o uso do Milteforan™ para o tratamento de cães diagnosticados com LV.

Contudo, a literatura científica ainda não alcançou um consenso sobre o risco de infecção dos flebotomíneos ao se alimentarem de cães infectados com *L. infantum*.

. Além disso, é crucial identificar um conjunto de biomarcadores que possa contribuir para uma análise mais precisa do prognóstico da LVC, e que possa estar relacionada ao risco de infecção aos flebotomíneos.

Diante desse cenário, o presente estudo foi desenvolvido para avaliar diferentes biomarcadores (bioquímicos, hematológicos e/ou imunológicos) e buscar sua correlação com o a infecção dos flebotomíneos (*L. longipalpis*) a partir de cães infectados com *L. infantum*. Além disso, o estudo visa desenvolver um sistema de estadiamento mais acessível, que possa contribuir para a aplicação de estratégias de monitoramento e prognóstico da LVC e que possam ser aplicados em avaliações terapêuticas e vacinais.

Destaca-se ainda que estes dados também poderiam ter aplicação em áreas endêmicas para subsidiar o controle da LV, como uma estratégia para priorizar as ações de saúde pública nas áreas onde se encontram cães com maior risco de transmissão do parasito ao inseto vetor.

Diante do exposto o presente estudo estabeleceu a seguinte hipótese: “*Os parâmetros do novo sistema de estadiamento para a LVC permitirão estabelecer uma correlação entre a gravidade da doença e a infecção por L. infantum nos flebotomíneos*”.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar biomarcadores preditivos de infecção na leishmaniose visceral canina, buscando estabelecer um novo sistema de estadiamento clínico que possa auxiliar na análise da correlação com a infecção por *L. infantum* em flebotomíneos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, apresentando diferentes estádios clínicos da doença, a transmissão do parasito para *L. longipalpis*, buscando relacioná-lo a diferentes biomarcadores imunopatológicos, realizando as seguintes etapas:

- i. Triar por teste rápido imunocromatográfico e ELISA como premissa de soropositividade da LVC;
- ii. Avaliar o perfil da carga parasitária em órgãos-alvo do parasitismo, com emprego de diferentes metodologias parasitológicas;
- iii. Estudar o hemograma completo e perfil bioquímico incluindo enzimas relacionadas a função hepática e renal, além do perfil de proteínas plasmáticas: globulina, albumina e razão albumina/globulina;
- iv. Estabelecer o perfil da resposta imune celular *ex vivo*, considerando marcadores específicos de superfície celular para identificação de leucócitos circulantes, tais como: Linfócitos TCD5⁺; Linfócitos TCD4⁺; Linfócitos TCD8⁺; Monócitos CD14⁺;
- v. Correlacionar os biomarcadores com a carga parasitária dos flebotomíneos após o xenodiagnóstico;
- vi. Elaborar um estadiamento clínico e avaliar seu comportamento frente aos biomarcadores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

O projeto respeitou as obrigações éticas para com o uso de animais em pesquisa, assim como os preceitos do bem-estar animal, respaldados em normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), com número de protocolo 8/2022 (Anexo I) e cumpriu todos os procedimentos exigidos pela comissão durante a sua realização. Os proprietários de cães foram comunicados, informados e esclarecidos sobre qualquer dúvida em relação aos procedimentos. No caso de aceite da participação no estudo, o tutor recebeu um termo de consentimento e o termo de doação desses animais para o projeto (anexo 3).

4.2 Área de estudo

O estudo foi realizado em área endêmica, no município de Porteirinha, região Norte do estado de Minas Gerais (Latitude 15°44' 42" S; Longitude 43°01' 46" W) (Figura 3). O município ocupa uma área de 1.749,683 km² (IBGE, 2020) com a população local estimada de 37.823 habitantes (IBGE 2021), com o Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) de 0,651 (IBGE 2010).

Porteirinha possui altitude média de 567 m, clima tropical semiúmido (temperatura média de 24 °C), com estação seca de cerca de 6 meses por ano. A grande maioria dos domicílios carece de condições sanitárias básicas (18.7% de domicílios com esgotamento sanitário adequado) e a presença próxima de animais domésticos é uma característica notável.

Este município foi selecionado como área de estudo devido à sua condição endêmica para LV, caracterizada por uma transmissão intensa da doença, apresentando nos últimos 10 anos (2013 a 2022) 32 casos de LV. Além disso, a escolha foi respaldada pelo histórico de pesquisas relacionadas à LV realizadas na cidade (ANDRADE BARATA et al., 2004, 2005, 2010; CARNEIRO BORGES et al., 2002; FRANÇA-SILVA et al., 2023). A conscientização da população sobre a gravidade da LV também contribuiu para a seleção, juntamente com o apoio ativo da prefeitura do município de Porteirinha.



Figura 3: Mapa de localização do município de Porteirinha, localizado no Norte de Minas Gerais. Colorido de vermelho está representado o município; o quadrado com borda vermelha mostra a localização da região urbana do município. DATUM: WGS 84, fonte: IBGE. Autor; Allan de Jesus Mendonça Severino, Ano: 2023.

4.3 Delineamento experimental

Com base no cálculo amostral efetuado, 47 cães naturalmente infectados por *L. infantum* foram selecionados, escolhidos com base nos resultados obtidos nos testes rápidos e no teste sorológico confirmatório, conforme ilustrado na Figura 4. A triagem de cães naturalmente infectados foi conduzida usando o teste rápido Imunocromatográfico *Dual Path Platform* (DPP® - Biomanguinhos) e o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Quando os resultados do teste rápido foram não reagentes, os cães foram excluídos do estudo; no entanto, quando foram reagentes, os cães foram submetidos a um teste sorológico confirmatório ELISA para a detecção de anticorpos anti-SLA.

Os testes rápidos foram conduzidos em campo pelo grupo de pesquisa e agentes de endemia do município de Porteirinha. O teste confirmatório (ELISA) foi realizado no Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LABIC – UFMG). Treinamentos foram realizados para os agentes do município visando a execução adequada do teste rápido em campo

A busca por cães foi conduzida por meio de amostragem por conveniência, na qual os agentes de endemias visitaram bairros com maior incidência de relatos de casos de cães com LV, realizando a abordagem "porta a porta" para encontrar os animais com sinais clínicos

característicos da doença e, assim, realizar o teste rápido DPP, com a devida autorização do tutor responsável. Foram realizados o teste rápido em 220 cães, e após o teste confirmatório foram incluídos 47 cães para a sequência do estudo. Para cada cão testado, o georreferenciamento foi registrado por meio de um aplicativo (SpotLens).

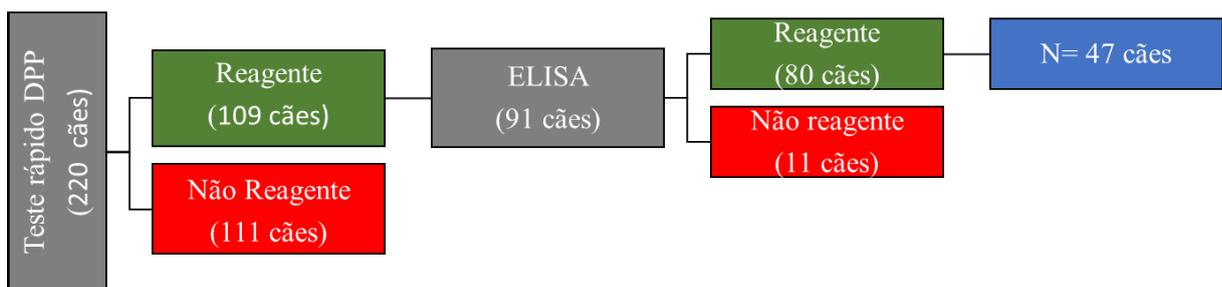


Figura 4: Fluxograma da triagem de animais sororreagentes para leishmaniose visceral canina. Inicialmente foi realizado o teste rápido imunocromatográfico *Dual Path Platform* (DPP® - Biomanguinhos) e os animais positivos foram submetidos ao teste sorológico confirmatório (ELISA).

Os 47 cães selecionados foram submetidos a todos os procedimentos da Etapa 2 (Figura 5). Inicialmente, esses cães foram clinicamente avaliados, analisados e categorizados de acordo com o grau de intensidade dos sinais clínicos apresentados. Em seguida, os animais foram sedados com 1mg/Kg de acepromazina (Univet), para a realização de ultrassonografia dos órgãos internos, incluindo baço, fígado e rins. Sob efeito de sedativos, os cães passaram pelo xenodiagnóstico, com coleta de amostras de sangue para análise do hemograma completo, série bioquímica e avaliação da resposta imune *ex vivo*, seguida pela coleta de medula óssea para isolamento do parasito em meio de cultura e análise por qPCR da carga parasitária.

Após esses procedimentos iniciais, os cães foram submetidos à eutanásia, seguindo todos os protocolos estabelecidos pela CEUA. Após a eutanásia, foram coletadas amostras de órgãos, como pele da orelha, baço e linfonodo poplíteo para a posterior confecção de lâminas destinadas às análises por Imuno-histoquímica anti-*Leishmania* e para realizar a quantificação

da carga parasitária por qPCR.

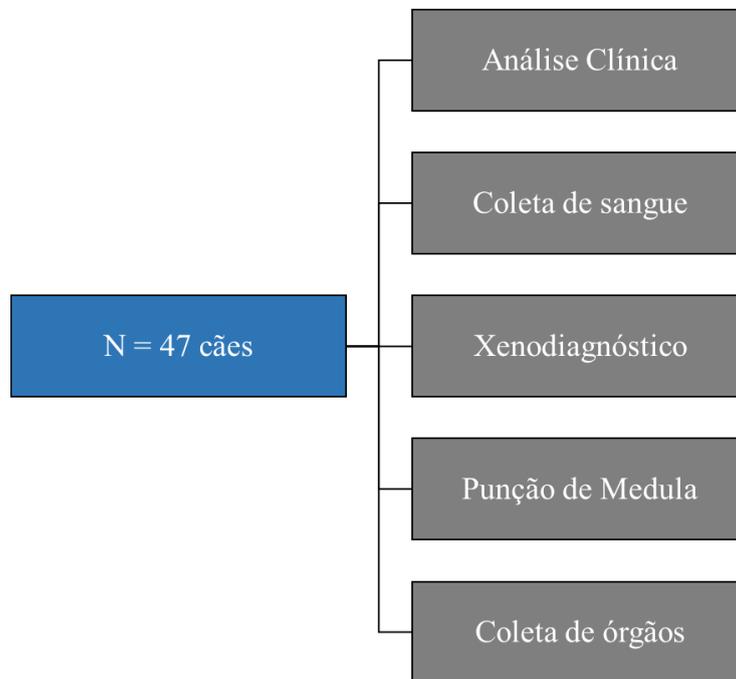


Figura 5: Fluxograma da etapa dos procedimentos realizados com animais sororreagentes escolhidos aleatoriamente após triagem por TR-DPP e ELISA.

4.4 Triagem dos cães

4.4.1 Dual Path Platform (DPP® - Biomanguinhos)

O teste rápido DPP® foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, cada teste foi identificado com o nome do cão. Após a identificação, utilizando uma lâmina estéril fornecida no kit, a ponta da orelha do cão foi perfurada, retirando-se 5 μ L de sangue com a ajuda de uma haste também inclusa no kit. Essa amostra foi então adicionada ao poço 01 (“Amostra + Tampão”) na plataforma do teste, juntamente com duas gotas de tampão também fornecidas no kit. Após aguardar cinco minutos, foram adicionadas quatro gotas do mesmo tampão no poço 2 (“Tampão”). Após um período adicional de dez minutos, a leitura do teste foi realizada. O resultado foi considerado reagente quando duas linhas vermelhas apareceram, uma linha de controle (C) e outra de teste (T); enquanto foi considerado não reagente quando apenas a linha de controle (C) estava presente (Figura 6).

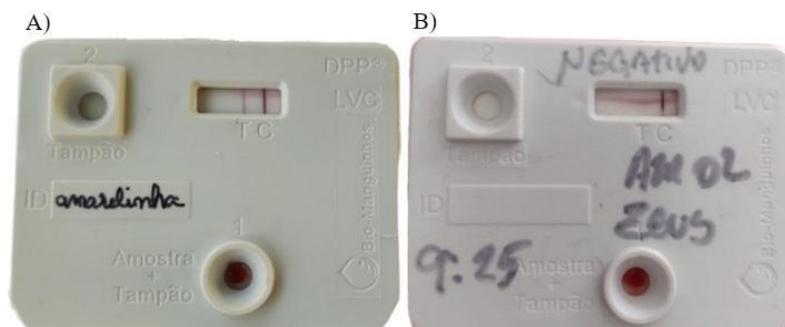


Figura 6: Teste Rápido DPP®. em "A)" teste reagente para LVC; em "B)" teste não reagente para LVC.

4.4.2 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Para realização do ELISA, placas de poliestireno de alta adesão (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) de 96 poços foram sensibilizadas com 2 µg/µL de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA, do inglês soluble *Leishmania* antigen) por poço e mantidas overnight a 4°C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas com PBS-Tween (PBS 1X com 0,05% de Tween 20). O processo de lavagem foi realizado 3 vezes. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com 200 µL de solução bloqueio PBS-BSA (PBS 1X com 5% de albumina sérica bovina - BSA - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubadas a 37°C por 3 horas. Após nova etapa de lavagem, as amostras de soro dos cães foram diluídas a 1:80 em PBS-Tween, adicionadas em seus respectivos poços, com posterior incubação das placas a 37 °C por 3 horas. Em seguida, as placas foram lavadas e foi adicionado, em cada poço, 100 µL de anticorpo secundário anti-IgG total conjugado com peroxidase (anti-mouse IgG-h+I HRP, Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX, EUA), na diluição de 1:10.000 em PBS-Tween. Após incubação de 60 minutos, à 37°C, as placas foram lavadas. A solução de substrato cromogênico para peroxidases contendo 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), foi adicionada para revelar a reação. Posteriormente, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 2,5M e as amostras foram lidas a 450nm em espectrofotômetro Multiskan™ FC Microplate Photometer.

4.5 Estadiamento dos cães

O procedimento de estadiamento dos cães incluiu a análise dos sinais clínicos, realizado por três médicos veterinários. É importante mencionar que 38 sinais clínicos foram avaliados (Anexo 2) e um escore foi criado de 0 a 5, onde 0 são animais sem sinal clínico para aquele

sinal específico e 5 para sinal clínico grave. Cada sinal clínico teve seu peso de importância atribuído (variando de 0 – 10, conforme dados informados no Anexo 2) e ao final de toda análise clínica foram somados os valores para cada cão. O valor da pontuação de cada cão foi utilizado para categorizá-los em três estádios clínicos diferentes conforme a Tabela a seguir:

Tabela 1: Classificação de cães em diferentes estádios em relação aos sinais clínicos apresentados para LVC.

Estádio	Descrição	Somatória dos escores clínicos
I	Sem sinais clínicos ou sinais clínicos leves	0 - 100
II	sinais clínicos moderados	101-200
III	sinais clínicos graves	>200

4.6 Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico foi realizado em todos os cães, com o objetivo de verificar se esses animais seriam capazes de infectar fêmeas de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis*, principal transmissora da *L. infantum* no Brasil. Para os ensaios, foram utilizadas fêmeas de quinta geração com 2 a 4 dias pós muda para adultos e alimentadas apenas em solução açucarada. Os insetos foram procedentes da colônia implantada no laboratório do grupo de pesquisa “Taxonomia de flebotomíneos, diagnóstico, epidemiologia e controle das leishmanioses – TFL” do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas.

O procedimento foi realizado a partir de flebotomíneos (30 fêmeas e 5 machos por cão) que foram confinados em um recipiente de PVC e cobertos por uma malha fina de nylon, que permitia a alimentação dos insetos no cão (DA COSTA-VAL et al., 2007; MICHALSKY et al., 2007). Após sedação dos cães com 1mg/Kg de acepromazina (Univet), um recipiente por cão contendo os flebotomíneos foram colocados no pavilhão auricular dos animais, durante 30 minutos, em uma sala escura e cobertos com um pano preto, simulando uma melhor condição de luminosidade de como os vetores se alimentam na natureza. Após o repasto sanguíneo, as fêmeas alimentadas foram transferidas para um novo recipiente, e recebiam solução de sacarose em água destilada em seguida eram mantidas em condições controladas de temperatura e umidade (26°C e 70% UR) por pelo menos 5 dias para que todo bolo alimentar fosse digerido. Após este período as fêmeas foram congeladas e criopreservadas a -80°C para posterior análise

da infecção por *L. infantum* pela técnica de qPCR. Esta metodologia foi realizada com o objetivo de fornecer a identificação do risco de infecção para o hospedeiro invertebrado ao comparar com os resultados provenientes do parasitismo nos diferentes órgãos estudados.

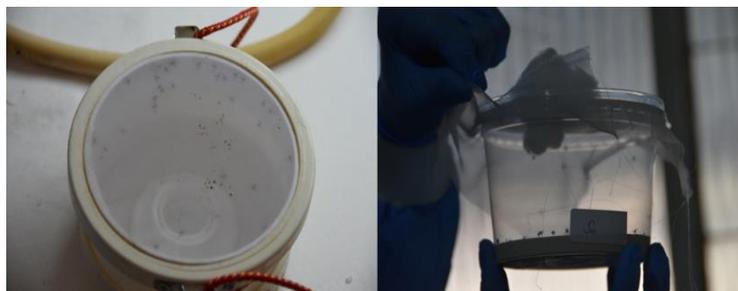


Figura 7: Recipientes utilizados para a realização do xenodiagnóstico. Na foto a esquerda mostra um recipiente em PVC (10 cm de diâmetro e 5 cm de altura) contendo uma tela de náilon de malha fina onde foram acondicionados os flebotomíneos para a alimentação na pele da orelha interna do cão, A direita a foto mostra um recipiente plástico com o fundo com gesso úmido onde os insetos eram mantidos após a alimentação sanguínea.

4.7 Isolamento de *Leishmania* sp. em cultivo *in vitro*

Para confirmação da presença do agente etiológico, as amostras de punção de medula óssea foram submetidas aos procedimentos de isolamento do parasito. A punção da medula óssea foi realizada na região epifisária proximal da tíbia. Para o procedimento de coleta da medula óssea, o animal foi submetido à anestesia geral (Xilazina 1,5mg/Kg seguido de Thiopental 8mg/Kg) e colocado em decúbito lateral para acessar o local de coleta. Este procedimento foi realizado após constatação do estado de anestesia geral do cão, sendo utilizado agulha 40x12 e seringa estéril de 20mL. Este material foi destinado para mielocultura e quantificação da carga parasitária por qPCR. Imediatamente após a coleta da medula óssea, a agulha foi flambada e mantida perto de um bico de Bunsen. A amostra foi inserida em tubos contendo o meio de cultura bifásico Ágar-sangue e α -MEM (Sigma-Aldrich) pH 7,4 contendo 20% de Soro Bovino Fetal (SBF), 2% de urina, 10U/ml de penicilina e 10 μ g/ml estreptomicina. Os tubos foram devidamente identificados, acondicionados e transportados para o Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LABIC) onde foram cultivadas no mesmo meio e mantidos em estufa com a temperatura de 23°C. Semanalmente pequenas amostras da fase líquida foram coletadas para exame a fresco procurando evidenciar formas promastigotas, além da realização dos repiques. Esse protocolo foi realizado em intervalos de sete dias durante 30 dias.

4.8 Protocolo para o procedimento de eutanásia

Como o município não contava com médico veterinário para realização das eutanásias dos cães confirmados como soropositivos, e em virtude da alta prevalência da doença, por solicitação do município, nossa equipe foi a responsável pela eutanásia destes animais, seguindo a normatização de controle da LV no Brasil, estabelecida pelo Ministério da Saúde. Com o resultado positivo do teste confirmatório, foi solicitado ao proprietário do animal, a sua doação (Anexo 2). Estes animais, após os procedimentos, foram destinados a eutanásia realizada sob responsabilidade de um médico veterinário da nossa equipe. Para realizar o procedimento de eutanásia, foram utilizados cloridrato de Xilazina (1,5 mg/kg por via endovenosa), seguido de Tiopental (Cristália), dose 8mg/kg até constatar efeito da anestesia geral. Em seguida (após a coleta de medula óssea) foi aplicada solução saturada cloreto de potássio (KCl) por via endovenosa (1ml/kg), ainda com o animal sob anestesia geral, sendo constatada parada cardiorrespiratória.

4.9 Hemograma completo

Para realização das análises descritas a seguir, foram coletadas amostras de sangue dos cães pela punção preferencial da veia cefálica do membro dianteiro ou pela veia jugular externa. Para avaliação de hemograma completo e imunofenotipagem de leucócitos por citometria de fluxo foram coletados de 3 a 5 mL de sangue em tubos contendo anticoagulante EDTA. O sangue foi homogeneizado (durante 30 segundos) com o anticoagulante, suavemente, para evitar a coagulação. As amostras para hemograma foram acondicionadas em caixas térmicas e transportadas para Belo Horizonte, onde foram imediatamente enviadas para o Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária – UFMG, responsável pela realização do hemograma completo, o analisador hematológico utilizado foi o ICONTER VET (Diagno, Belo Horizonte, Brasil).

4.10 Imunofenotipagem *ex vivo* de leucócitos circulantes

Foram realizadas análises de imunofenotipagem de linfócitos e monócitos em contexto *ex vivo* por citometria de fluxo. Para isso foi transferido 50 µL de sangue, das amostras coletadas em EDTA, para tubos de poliestireno Falcon Round-Bottom (BD, Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo os anticorpos anti-CD3 (clone MCA1774F) FITC, anti-CD4 (clone MCA1038PE) PE, anti-CD8 (clone MCA1039PE) APC, anti-CD21 (clone MCA1039PE) PE e

anti-CD14 APC. Os tubos contendo amostras e os marcadores de superfície foram incubados por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após este tempo foram adicionados 3mL de solução de lise de eritrócitos Billig Dog (Facs lysing solution, Becton Dickinson, San Jose, EUA) em vórtex e incubados por 10 minutos ao abrigo da luz. Foi adicionado, em cada tubo, 1 mL de PBS-Wash (0,015M de PBS 1X, 0,5% BSA e 0,1% de azida sódica) com posterior centrifugação a 600 xg a 18°C por 7 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi lavado, utilizando 3 mL de PBS-Wash e agitação no vórtex, sendo realizado posteriormente centrifugação de 600 xg a 18°C por 7 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e, ao *pellet*, foi adicionado 200 µL de solução fixadora Macs Facs Fix (MFF) (10 g/L paraformaldeído, 10,2 g/L cacodilato de sódio e 6,65 g/L cloreto de sódio) para se realizar a leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, EUA), com aquisição de 30.000 eventos/tubo. Para a análise dos dados foi utilizado o “software” FlowJo™v10.8.1 (Tree Star, Ashland, OR, EUA), para identificação do percentual de linfócitos T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B CD21⁺ e monócitos CD14⁺. Para a análise dos dados no “software” foi estabelecido um “gate” para identificar a população de linfócitos, excluindo “debris”, células mortas e demais populações celulares. Posteriormente, foi avaliada a porcentagem de linfócitos totais e suas subpopulações (CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺). Ainda com relação a população de linfócitos, foi analisado a porcentagem de CD21⁺ a fim de se avaliar linfócitos B. Já para a avaliação de monócitos, foi criado um outro “gate” e analisada a porcentagem de CD14⁺. Ao final da análise, os resultados foram expressos em valor absoluto de acordo com o leucograma de cada animal. Todas as análises foram ajustadas e validadas usando controles apropriados (amostras de controle) com populações conhecidas de células.

4.11 Avaliação da bioquímica sérica

Amostras de sangue (5 mL) foram coletadas em tubos sem anticoagulante, os quais foram centrifugados por 15 min a 10.000 rpm. As dosagens bioquímicas foram realizadas, utilizando 500 µL de soro de cada cão, para avaliação dos seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina, ureia, creatinina, albumina sérica, proteínas totais, globulinas, glicose. As análises da função hepática e renal foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG, utilizando o equipamento Cobas Mira Plus (BioTécnica Ind e Com. Ltda, Varginha, Brasil) e kit de reagente também da Biotecnica Ind e Com. Ltda.

4.12 Imuno-histoquímica

A Imuno-histoquímica *anti-Leishmania* foi realizada conforme metodologia descrita brevemente a seguir: amostras da pele de orelha, baço e linfonodo poplíteo foram submetidas ao processamento histológico convencional, emblocadas em parafina e submetidas à microtomia para montagem de lâminas. Em seguida as lâminas foram colocadas na estufa a 60°C por 20min, incubada no xilol por mais 20 minutos e hidratadas em banhos decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%), deixando 5 minutos em cada. As lâminas foram lavadas em água destilada por 2 minutos e também em tampão de lavagem (Envision Flex, Dako) por 5 minutos. O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado incubando as lâminas em solução de 3,5% de peróxido de hidrogênio por 40 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. Novamente foi feita a lavagem com tampão de lavagem por 5 minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com solução de 6% de leite desnatado Molico por 40 minutos em temperatura ambiente e novamente submetido ao processo de lavagem com o tampão de lavagem por 5 minutos. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário (soro de cão positivo) por 1 hora em câmara escura e temperatura ambiente, e após este tempo lavados três vezes seguidas em tampão de lavagem. No lugar do anticorpo secundário, foi incubado com um polímero específico para camundongo associado à peroxidase (Dako Envision, DakoCytomation, Califórnia, EUA), por 30 minutos em temperatura ambiente na câmara escura e novamente lavadas três vezes seguidas com o tampão de lavagem por 5 minutos. Para revelar foi utilizado como cromógeno a base de peroxidase o Cromógeno Magenta HRP (Dako Envision, DakoCytomation, Califórnia, EUA), que foi aplicado e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente em câmara escura e em seguida lavadas com água destilada para parar a revelação. As lâminas foram coradas com hematoxilina e lavadas em água corrente por 5 minutos. Após esta etapa, foram desidratadas em banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), sempre deixando 5 minutos em cada banho. Para finalizar foram incubados no xilol por 10 minutos e realizada a montagem das lâminas em Bálsamo do Canadá.

As lâminas foram lidas no microscópio (Nikon e100) com o aumento de 40x e foram analisadas de forma semiquantativa, classificadas por grau de carga parasitária, onde foram utilizadas quatro categorias (negativos, +, ++ e +++). Onde “+” significa carga parasitária discreta, “++” carga parasitária moderada e “+++” carga parasitária intensa conforme a Figura 8. Todas a metodologia e análises Imuno-histoquímicas foram realizadas pela colaboração do

Prof. Renato de Lima Santos e Dra. Ayisa Rodrigues de Oliveira, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (UFMG).

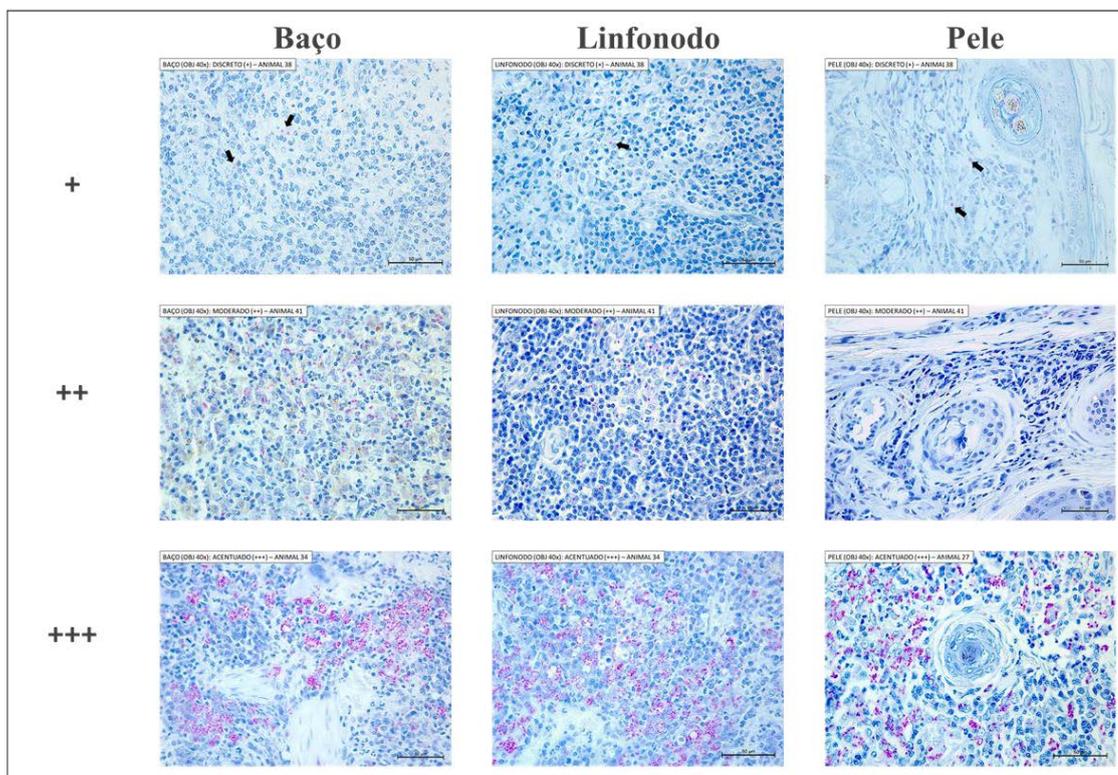


Figura 8: Imuno-histoquímica do baço, linfonodo e pele de animais naturalmente infectados. Onde "+" significa carga parasitária discreta, "++" carga parasitária moderada e "+++" carga parasitária intensa. As setas pretas representam amastigotas marcadas nos tecidos.

4.13 Quantificação da carga parasitária por reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)

A PCR *real time* (qPCR) foi utilizada para diagnosticar e quantificar DNA de *Leishmania infantum* nas amostras de tecidos (pele da orelha, baço e linfonodo poplíteo), bem como nos flebotomíneos. Para extração do DNA dos diferentes tecidos foi utilizado o kit PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), conforme recomendação do fabricante. Para os flebotomíneos foi utilizado o Kit de purificação de DNA GFX™ (Cytiva™). Logo após, o DNA foi dosado utilizando espectrofotômetro DeNovix DS-11 (DeNovix, Wilmington, DE, EUA). Para reação de qPCR, o gene do kDNA foi o DNA alvo, e as sequências dos primers utilizados para a amplificação foram: 5'-CCA CCC GGC CCT ATT TTA CAC CAA-3' e 5'-CTT TTC TGG TCC queda GGG TAG G-3', e da sonda 5'-/56-FAM/ TTT TCG CAG /ZEN/ AAC GCC CCT ACC CGC/3IABkFQ/-3'. O volume final da reação foi de 10µL, contendo 5µL do tampão iTaq Universal Probes Supermix

(Bio-Rad, EUA), 0,25µL de cada primer, 0,4µL da sonda (Integrated DNA Technologies, EUA), 1,1µL de água e 3µL de amostra de DNA. A amplificação das amostras foi feita em duplicata, utilizando o CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, EUA). Para os tecidos foi utilizado como controle negativo da reação, o mix de reação e água, e não foi colocado DNA. Para obter a curva padrão, foi realizada diluição seriada (1:10) de DNA de *L. infantum* (Cepa BH401). A carga parasitária foi determinada da seguinte forma: (equivalentes de DNA do parasito por reação) / (quantidade de DNA do tecido por reação) x 10³, tendo como resultado o número de parasitos por µg de DNA do tecido (SEVILHA-SANTOS et al., 2019).

4.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* GraphPad Prism versão 8.0 (San Diego, EUA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste Shapiro-Wilk. Para as análises de correlação dos biomarcadores com a carga parasitária de *L. infantum* nos flebotomíneos foi utilizado o teste de Pearson para os dados paramétricos e Spearman para os dados não-paramétricos. O valor absoluto do coeficiente de correlação de Pearson e Spearman, representado por $|r|$, é um indicador da força da relação entre duas variáveis. Quando $|r|$ está dentro dos intervalos: $0.9 \leq |r| \leq 1.0$, a correlação é considerada muito forte; entre $0.7 \leq |r| < 0.9$ a correlação é forte, entre $0.5 \leq |r| < 0.7$ a correlação é moderada $0.3 \leq |r| < 0.5$ a correlação é considerada fraca e entre $0.0 \leq |r| < 0.3$ a correlação é muito fraca.

Para análises comparativas entre os grupos dos dados normais (Kaneko et al., 2008), foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA, seguido do teste Dunnett's multiple comparisons. Para dados não paramétricos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Quando presente nos gráficos, as linhas tracejadas representam os limites superior e inferior de cada parâmetro bioquímico e hematológico avaliado.

5 RESULTADOS

5.1 Triagem de cães naturalmente infectados

Para a triagem dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* foram selecionados 220 cães com tutores na região urbana de Porteirinha - MG. Os cães foram submetidos ao teste rápido imunocromatográfico DPP (Dual Path Platform® - Biomanguinhos), sendo que 109 foram reagentes para a LVC, mostrando uma frequência de 49,55%. Posteriormente foram realizadas as coletas de soro dos cães reagentes para o teste DPP, para realizar o teste sorológico confirmatório, o ELISA. Foi realizado o ELISA em 91 cães, pois 18 cães haviam morrido ou não houve sucesso na coleta do soro. Foi realizado o ELISA em 3 etapas diferentes (Figura 9 A, B, C) devido ao grande número de cães e a necessidade de entregar o resultado aos tutores dentro do prazo de uma semana (entre a coleta e o resultado). No ELISA foram confirmados 80 (87,9%) cães com absorbância (ABS) acima do ponto de corte (positivos), três cães com ABS dentro da zona de indeterminado, e oito cães com ABS abaixo do ponto de corte (negativos), estes cães foram então excluídos das posteriores triagem do estudo. Dos cães positivos para o teste rápido DPP e para o ELISA, foram selecionados 47 cães (número amostral calculado) para a sequência do estudo. Todos os resultados foram comunicados à Prefeitura de Porteirinha (Figura 9).

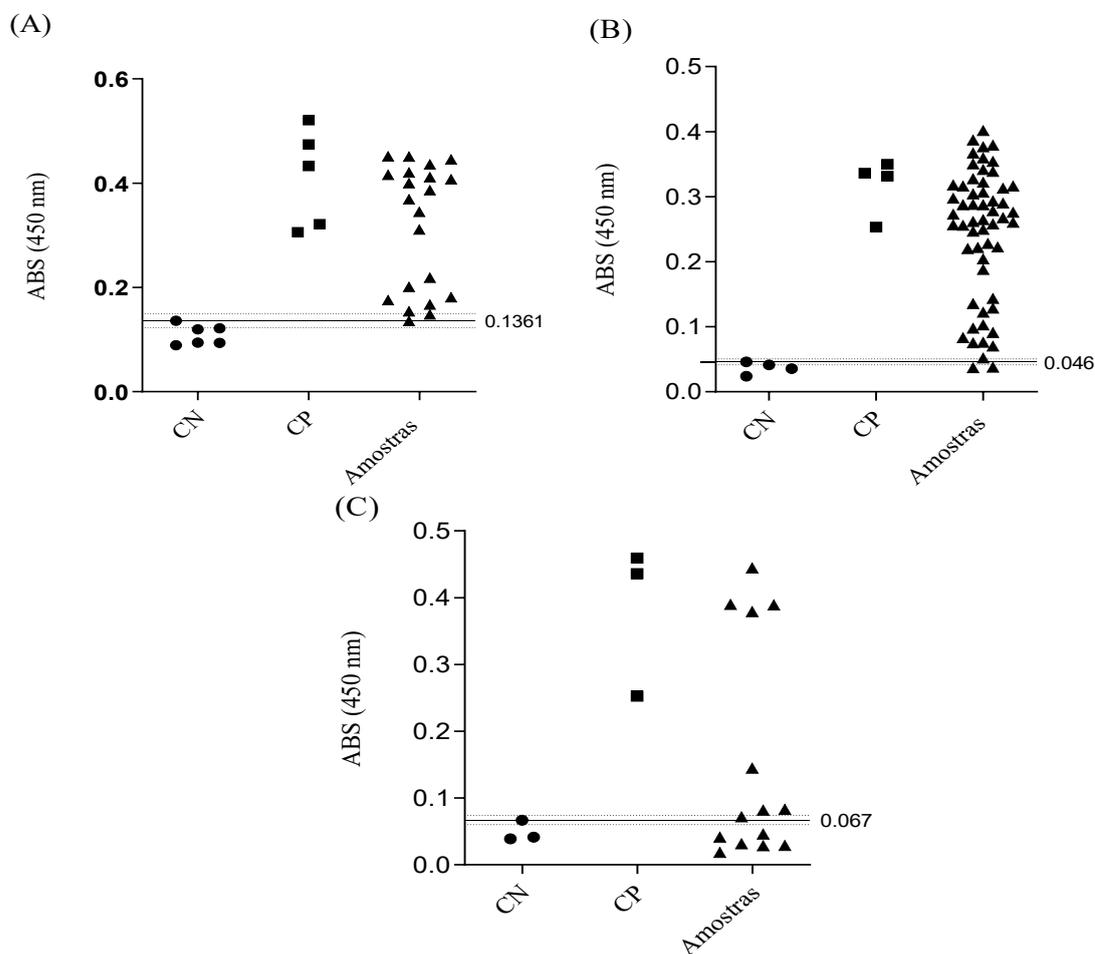


Figura 9: Resultado do teste de ELISA para confirmação de cães DPP reagentes. No eixo Y ilustra a absorbância (450 nm) e no eixo X os controles negativos (CN), os controles positivos (CP) e as amostras de soro dos cães testados. A linha contínua no eixo Y representa *cut off* (calculado através da curva ROC), e as linhas pontilhadas a faixa que foi considerada como resultado indeterminado (10% do *cut off*). (A) primeira etapa dos resultados para o ELISA, (B) segunda etapa, (C) terceira etapa.

Tabela 2: Perfil dos cães que participaram do estudo.

Nº de cães	Sexo		Comportamento		Comprimento do pelo		Peso (Kg)	Idade (anos)
	Macho (%)	Fêmea (%)	Intra (%)	Peri (%)	Curto (%)	Longo (%)		
47	57,4	42,6	23,4	76,6	93,6	6,4	12,46 (1,4-34)	6,29 (2-11)

Intra: intradomiciliar; Peri: peridomiciliar.

5.2 Biomarcadores avaliados

Foram avaliados diversos biomarcadores, incluindo as cargas parasitárias de diferentes órgãos, a absorvância da imunoglobulina IgG, parâmetros hematológicos (hemograma, leucograma, plaquetograma), parâmetros bioquímicos e enzimáticos, além de marcadores celulares. É importante salientar que o número amostral calculado foi de 47 cães; no entanto, devido a diversas situações ao longo do projeto (falta de amostra para realização de alguns ensaios), os parâmetros foram avaliados com um número diferente de cães (variando de n=23 a n=47), conforme apresentado nas Tabelas a seguir (Tabelas 3; 4; 5; 6).

A imunoglobulina IgG foi avaliada através da absorvância encontrada após o ensaio ELISA e leitura em espectrofotômetro (450 nm). Essa avaliação foi realizada em 47 cães, com uma média de $0,2393 \pm 0,1004$ (ABS) (Tabela 3).

A carga parasitária dos tecidos foi avaliada através da qPCR. Na pele, a média encontrada em 47 cães foi de 4.776 ± 17.492 parasitos/mg do tecido; no baço, foi de 2.619 ± 9.702 parasitos/mg do tecido; no linfonodo, foi de $384,3 \pm 1.015$ parasitos/mg; e na medula, a média foi de $123,7 \pm 494,9$ parasitos/mg do tecido em 45 cães (Tabela 3).

Em relação à carga parasitária de flebotomíneos, também foi avaliada através da qPCR. Foram quantificadas *Leishmania infantum* em 23 *pools* de flebotomíneos (cada *pool* alimentou-se em um cão), enquanto nos outros 24 “*pools*” não foi detectada a presença de *Leishmania*. A média da carga parasitária encontrada foi de $0,09103 \pm 0,1851$ parasitos/ μg de flebotomíneo. (Tabela 3).

Tabela 3: Estatística descritiva (número de cães, mediana, média, desvio-padrão) correspondente às variáveis incluídas na tese.

Biomarcadores	Nº de cães	Média	DP
IgG (abs)	47	0,2393	0,1004
Pele (Nº parasito/ μg)	47	4.776	17492
Baço (nº parasito/ μg)	47	2.619	9702
Linfonodo (Nº parasito/ μg)	47	384,3	1015
Medula (Nº parasito/ μg)	45	123,7	494,9
Flebotomíneos (Nº parasito/ μg)	23	0,09103	0,1851

DP: desvio padrão.

Em relação aos parâmetros do Hemograma, foram obtidos os resultados de 42 cães, em que a média com os seus respectivos desvios padrões se apresentaram dentro do Intervalo de referência (IR) (Tabela 4).

Tabela 4: Estatística descritiva dos parâmetros referentes ao hemograma.

Biomarcadores	Nº amostral	Média	DP	IR
Eritrócitos ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	42	5,37	1,32	5,5-8,5
Hemoglobina (g/dL)	42	10,72	3,34	12 – 18
Hematócrito (%)	42	37,38	9,61	37 – 55
VCM (fl)	42	71,28	4,97	60 – 77
CHCM (g/dL)	42	28,67	4,26	30 – 36

VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média.

Em relação aos parâmetros leucocitários, também foram obtidos resultados de 42 cães para: leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos e plaquetas; enquanto para Monócitos foram avaliados n=41 cães e para Eosinófilos n=39 cães. A média de todos os parâmetros do leucograma e plaquetograma com os seus respectivos desvios padrões se apresentaram dentro dos IR (Tabela 5).

Tabela 5: Estatística descritiva dos parâmetros referentes ao leucograma.

Biomarcadores	N amostral	Mediana	Média	DP	IR
Leucócitos totais (células/ μL)	42	9.975	9.449	3.153	6.000 – 17.000
Neutrófilos segmentados (μL)	42	6.664	6.181	2.545	3.000 – 11.500
Linfócitos (μL)	42	1.609	2.025	1.548	1.000 – 4.800
Monócitos (μL)	41	327	427,6	355,2	150 – 1.350
Eosinófilos (μL)	39	192,4	475,9	596,8	100 – 1.250
Plaquetas (número/ μL)	42	64.500	90.238	107.806	175.000 – 500.000

DP: desvio padrão; IR: intervalo de referência.

A respeito dos parâmetros bioquímicos e enzimáticos, foram obtidos os resultados de n=28 cães para Creatina (mg/dL), ALT, AST e Fosfatase alcalina; n=27 cães para Ureia, Glicose, Proteínas totais, Albumina, Globulina e para o índice Albumina/globulina (A:G). Ao analisar a média e o desvio padrão de cada parâmetro, observou-se que a média e seus desvios padrões de todos os parâmetros se apresentaram dentro dos IR (Tabela 6).

Tabela 6: Estatística descritiva dos parâmetros referentes aos exames bioquímicos e

enzimáticos.

Biomarcadores	N amostral	Median a	Média a	DP	IR
Ureia (mg/dL)	27	31,09	52,77	67,48	21 – 59,9
Creatina (mg/dL)	28	0,72	0,95	0,82	0,5 – 1,5
ALT (μ /L)	28	33,55	45,33	40,8	21 – 102
AST (μ /L)	28	33,15	42,27	30,61	23 – 66
Fosfatase alcalina (u/L)	28	48,45	82,4	128,8	20 – 156
GGT (u/L)	25	2,4	3,90	4,74	1,2 – 6,4
Glicose (mg/dL)	27	81,2	77,79	18,19	65 – 118
Proteínas totais (g/dL)	27	8,48	8,21	1,42	5,4 – 7,1
Albumina (g/dL)	27	2,57	2,55	0,60	2,6 – 3,3
Globulina (g/dL)	27	5,47	5,66	1,37	2,7 – 4,4
Índice A:G	27	0,491	0,49	0,19	0,59 – 1,11

DP: desvio padrão; IR: intervalo de referência; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase (AST); GGT: gama glutamil transferase A:G: razão Albumina/Globulina.

5.3 Correlação entre biomarcadores e a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos.

Foram avaliadas as correlações entre todos os biomarcadores do estudo com a carga parasitária (CP) de *L. infantum* em flebotomíneos da espécie *L. longipalpis*, após repasto sanguíneo nos cães. O xenodiagnóstico foi realizado em 47 cães, sendo que 46,8% dos cães (22) foram capazes de infectar os flebotomíneos com parasitos. As correlações entre a carga parasitária de *L. infantum* em flebotomíneos incluíram os seguintes biomarcadores: IgG, carga parasitária em diferentes órgãos, parâmetros hematológicos (série vermelha, branca e plaquetária), parâmetros bioquímicos, marcadores celulares ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$, $CD14^+$) e escores clínicos. Nos gráficos de correlação, apresentados a seguir, quando a correlação (positiva ou negativa) for significativa ($P < 0,05$), foi representada uma linha de tendência na cor vermelha. Devido a problemas durante as coletas, o processamento das amostras entre outros fatores, alguns resultados podem apresentar um menor número de dados.

5.3.1 Correlação entre a absorvância de IgG total com a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos.

Ao correlacionar o resultado da absorvância (densidade óptica) da imunoglobulina IgG total (avaliada por ELISA) com a CP de *L. infantum* não foi diferença significativa ($p < 0,05$)

(Figura 10).

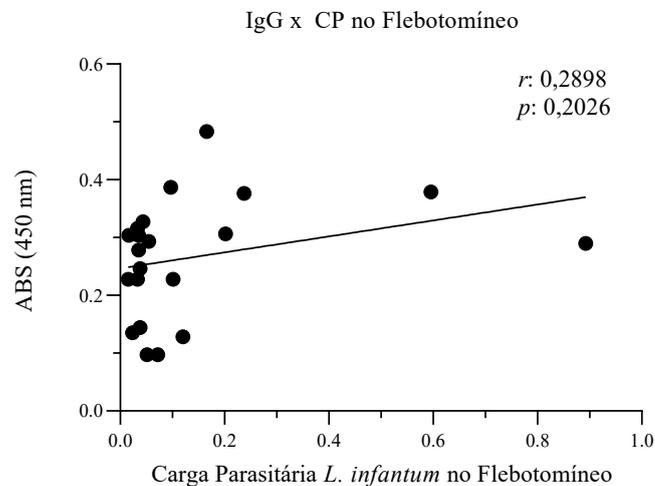


Figura 10: Correlação entre IgG total e a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo x representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo y representa os valores de absorvância (densidade óptica) a 450 nm de IgG.

5.3.2 Correlação entre a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos tecidos com a carga parasitária nos flebotomíneos.

Ao correlacionar o resultado da CP nos tecidos com a CP nos flebotomíneos foram encontradas diferenças significativas com correlação positiva na pele, linfonodo e medula (Figura 11 A, C, D), mas sem haver correlação com a CP do baço (Figura 11B). A correlação da CP da pele com a CP nos flebotomíneos foi fraca ($r = 0,4597$; $p = 0,0360$). A correlação da CP do linfonodo também foi considerada fraca ($r = 0,4376$; $p = 0,0417$). Já a correlação da CP da medula óssea com CP nos flebotomíneos foi moderada ($r = 0,5092$; $p = 0,0260$) (Figura 11).

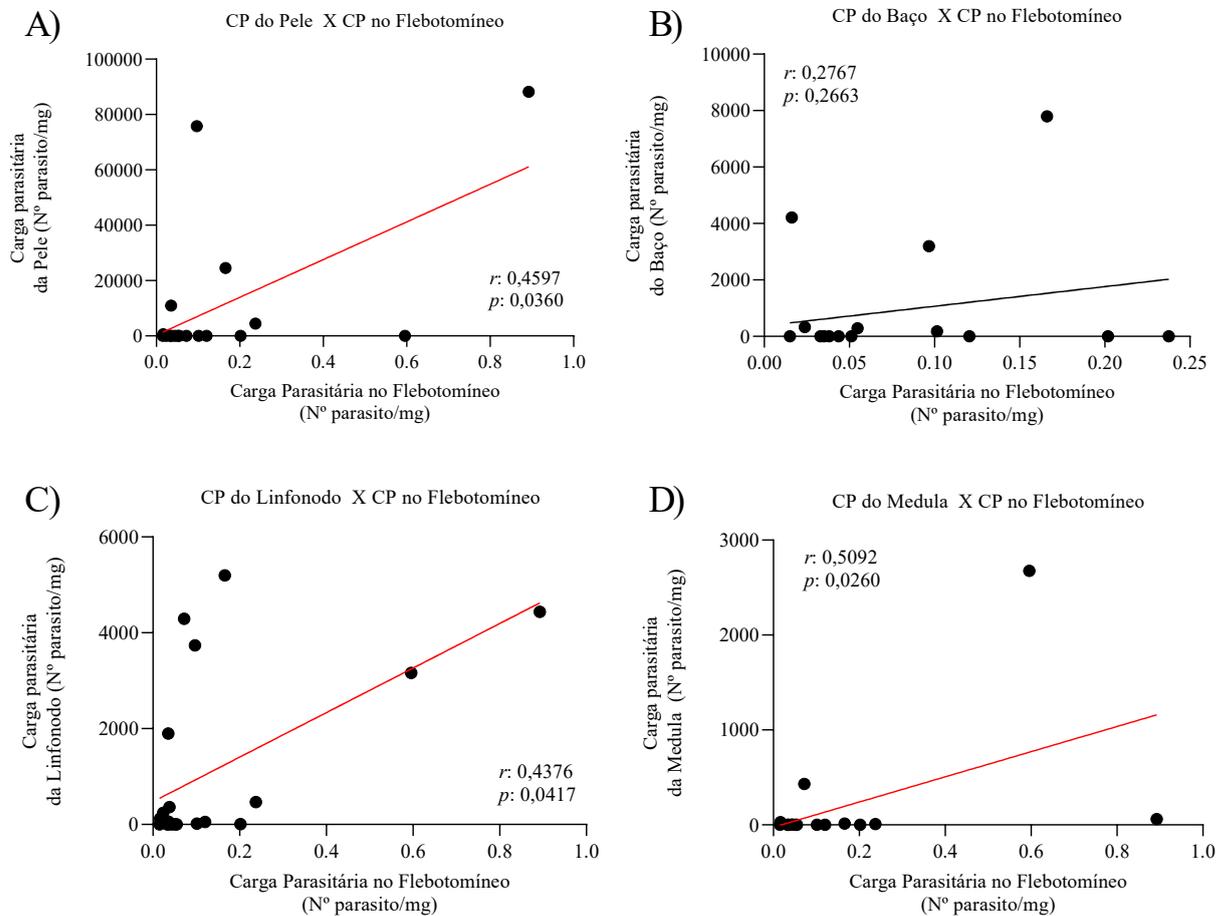


Figura 11: Correlação entre a carga parasitária (CP) de *Leishmania infantum* nos tecidos (pele, baço, linfonodo e medula óssea) com a carga parasitária nos flebotomíneos, empregando-se a metodologia de qPCR. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa carga parasitária de *L. Infantum* nos tecidos: (A) pele; (B) baço; (C) linfonodo; (D) medula óssea. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico.

5.3.3 Correlação entre os parâmetros hematológicos com a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos.

Em relação a correlação dos parâmetros hematológicos do hemograma (série vermelha) com a CP nos flebotomíneos foi possível observar correlação significativa apenas com os eritrócitos, sendo uma correlação negativa e fraca ($r = -0,4700$; $p = 0,0490$) (Figura 12 A).

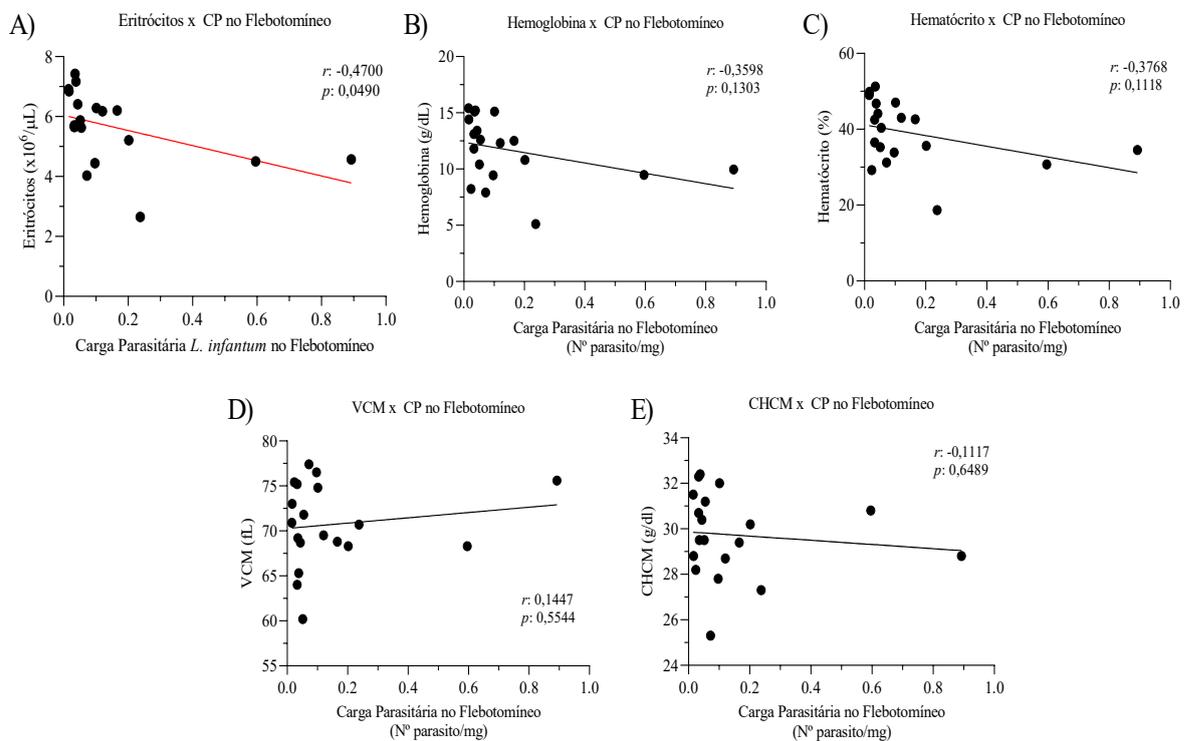


Figura 12: Correlação entre os parâmetros do hemograma com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa os parâmetros do hemograma: (A) eritrócitos; (B) hemoglobina; (C) hematócrito; (D) volume corpuscular médio (VCM); (E) Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico.

Ao avaliar a correlação dos parâmetros do leucograma e plaquetograma com a CP no flebotomíneos, foi observada correlação significativa com os linfócitos, monócitos e eosinófilos (Figura 13 B, C, D); enquanto para os leucócitos totais, neutrófilos segmentados e plaquetas não foram observadas correlações significativas (Figura 13 A, E, F). A correlação com os linfócitos foi negativa e moderada ($r = -0,5256$; $p = 0,0365$); a correlação com os monócitos também foi negativa e moderada ($r = -0,5751$; $p = 0,0125$); semelhante com os eosinófilos, que apresentou correlação negativa e moderada ($r = -0,5450$; $p = 0,0487$) (Figura 13 B, C, D).

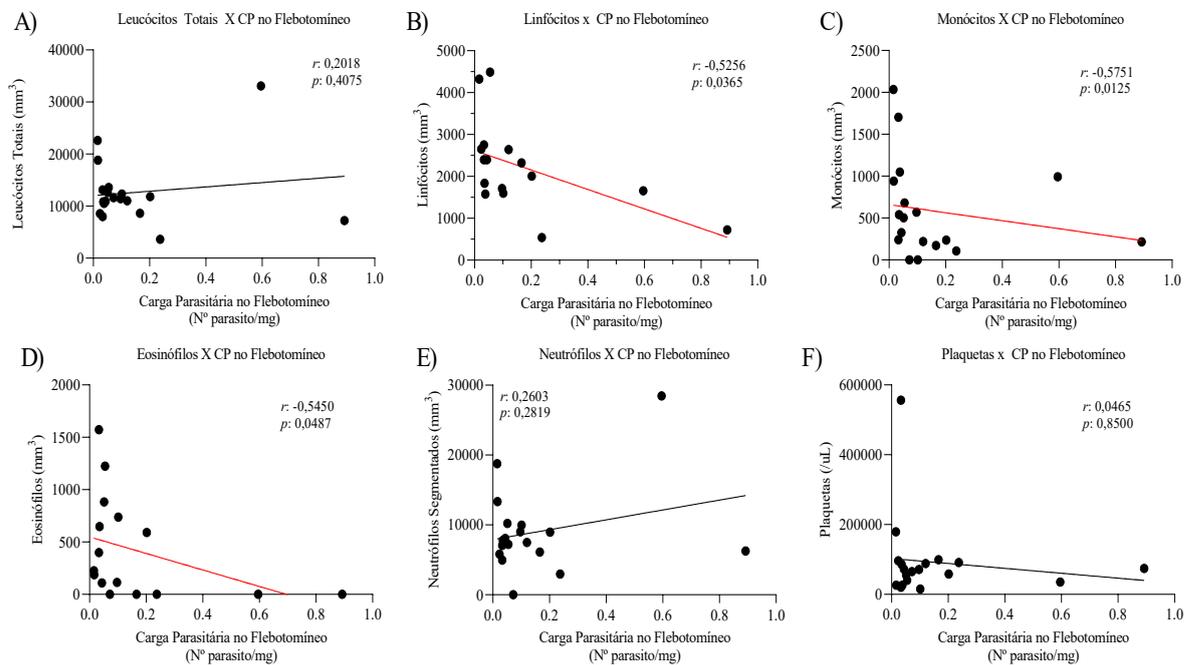


Figura 13: Correlação entre os parâmetros do leucograma com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa os parâmetros leucocitários: (A) Leucócitos totais; (B) Linfócitos; (C) Monócitos; (D) Eosinófilos; (E) Neutrófilos segmentados; (F) Plaquetas totais. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico.

5.3.4 Correlação entre os parâmetros bioquímicos e enzimático com a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos.

Para os parâmetros bioquímicos foi observada correlação significativa apenas com o parâmetro globulina, em que a correlação foi positiva e fraca ($r = 0,6603$; $p = 0,0377$) (Figura 14 E).

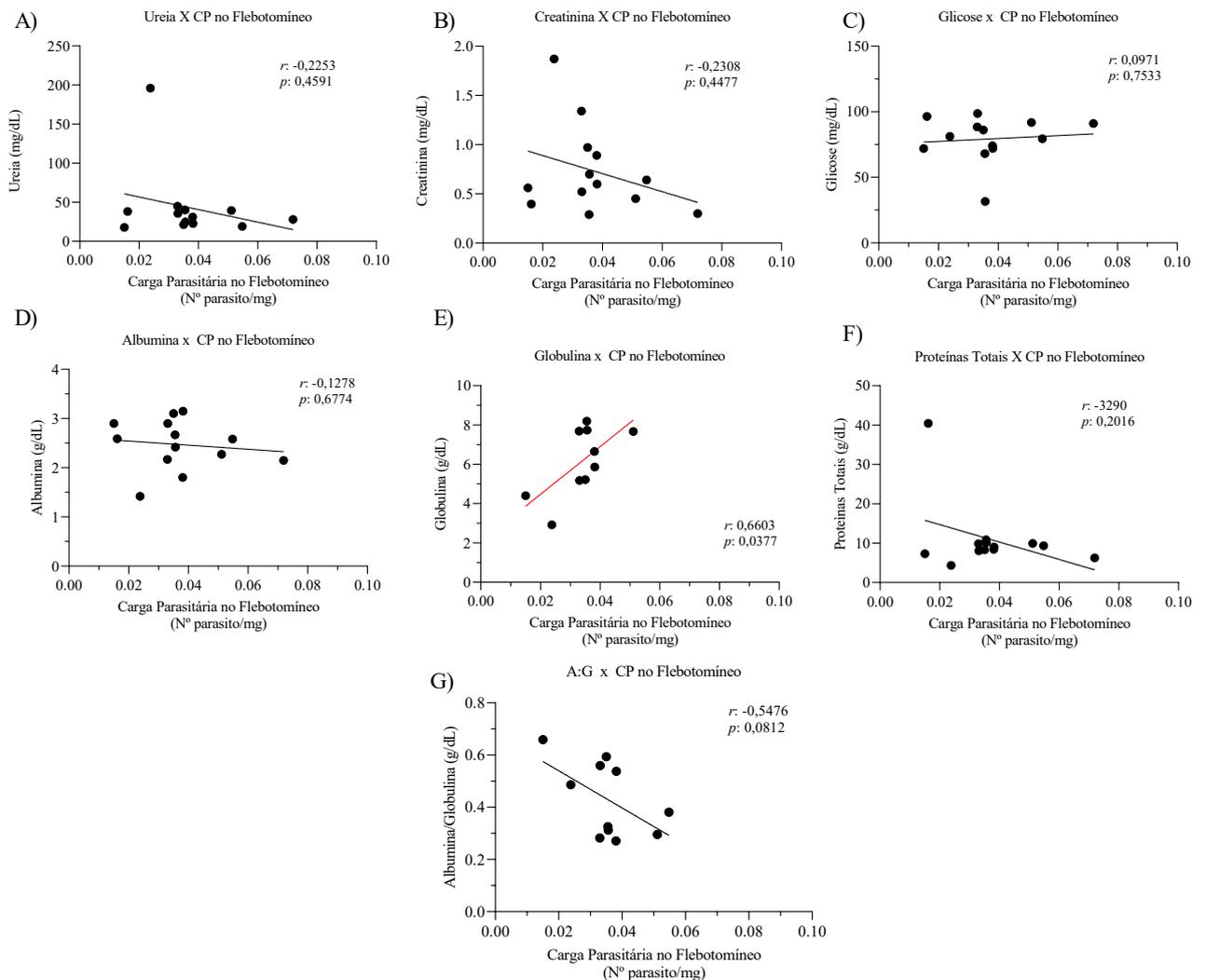


Figura 14: Correlação entre os parâmetros dos bioquímicos com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa os parâmetros bioquímicos: (A) ureia; (B) creatinina; (C) glicose; (D) albumina; (E) globulina; (F) proteínas totais; (G) razão albumina/globulina. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico.

Em relação aos parâmetros bioquímicos enzimáticos apenas observou-se correlação significativa com a fosfatase alcalina, em que a correlação foi positiva e fraca ($r = 0,5714$; $p = 0,0449$) (Figura 15 D).

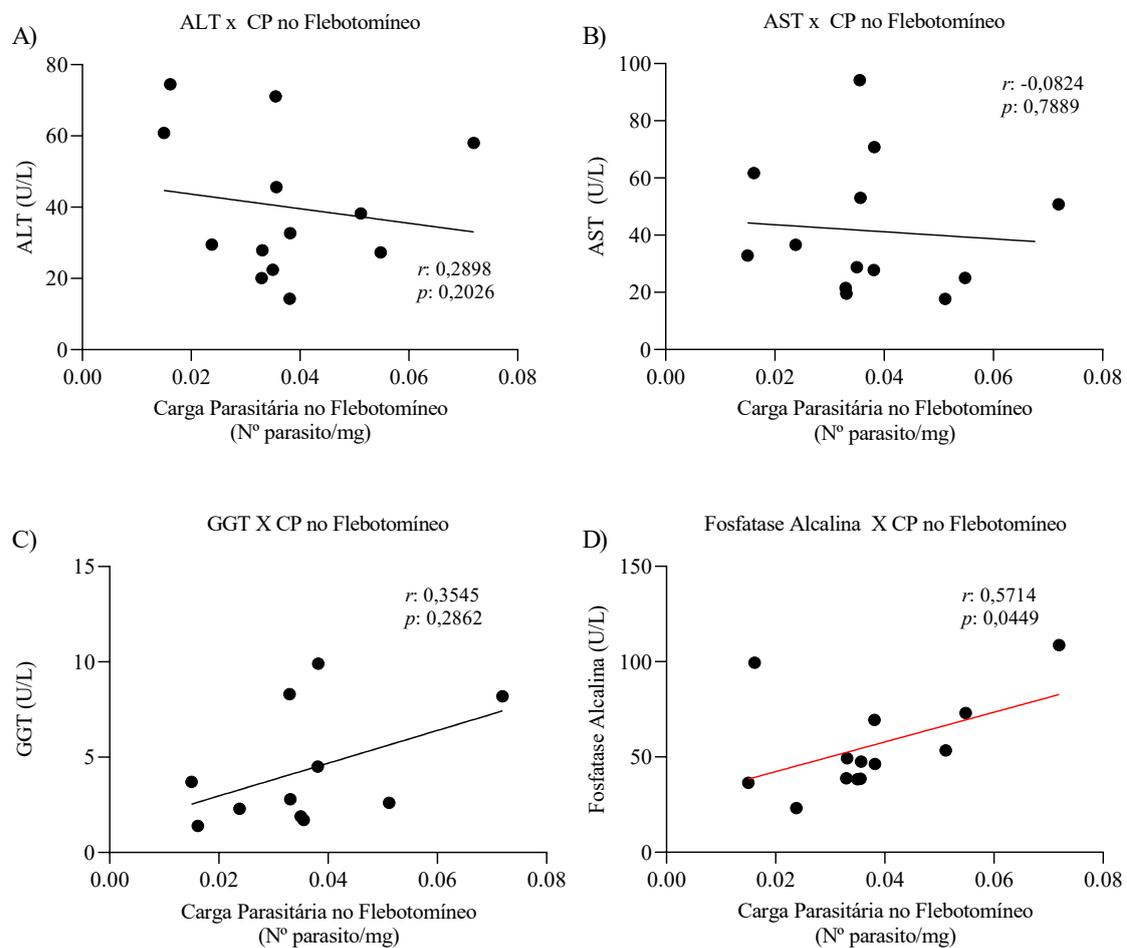


Figura 15: Correlação entre os parâmetros dos bioquímicos enzimáticos com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa os parâmetros bioquímicos enzimáticos: (A) alanina aminotransferase (ALT); (B) aspartato aminotransferase (AST); (C) gama glutamyl transferase (GGT); (D) fosfatase alcalina. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico.

5.3.5 Correlação entre os marcadores imunofenotípicos celulares com a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos.

Ao correlacionar o resultado dos marcadores celulares com a CP nos flebotomíneos, foi observada correlação significativa apenas com a subpopulação de células T CD8⁺, sendo negativa e moderada ($r = -0,5784$; $p = 0,0384$) (Figura 16 B). Não houve correlação com os demais marcadores CD4⁺, CD21⁺ e CD14⁺.

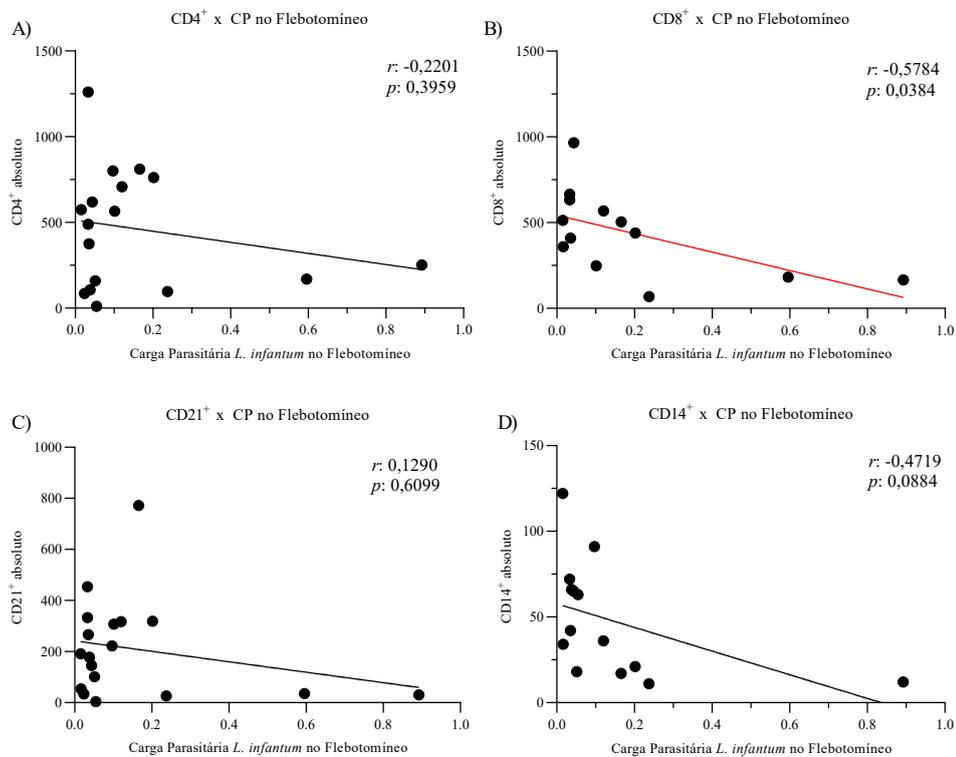


Figura 16: Correlação entre os marcadores celulares com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa os marcadores celulares: (A) representa a população de linfócitos T CD5⁺CD4⁺; (B) representa a população de linfócitos T CD5⁺CD8⁺; (C) representa a população de linfócitos B CD21⁺; (D) representa a população de monócitos CD14⁺. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico.

5.3.6 Correlação entre o escore dos sinais clínicos com a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos.

Ao correlacionar o resultado do escore dos sinais clínicos com a CP nos Flebotomíneos, foi observada correlação positiva e moderada ($r = -0,6863$; $p = 0,0004$) (Figura 17).

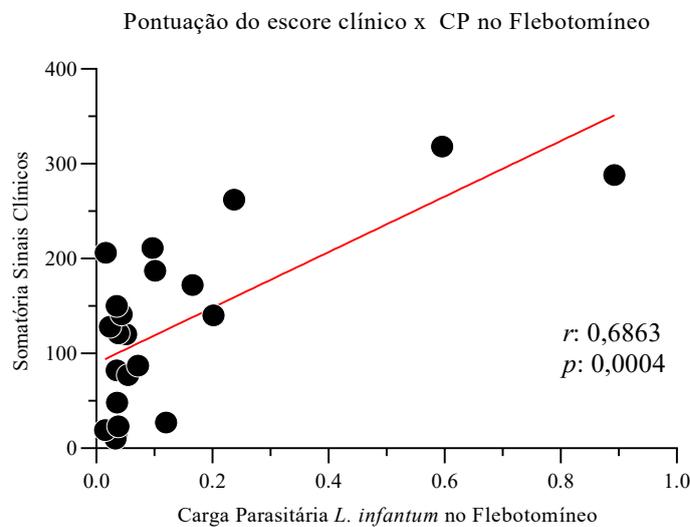


Figura 17: Correlação entre a pontuação do escore clínico com a carga parasitária nos flebotomíneos. O eixo X representa a carga parasitária de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa a somatória dos Sinais clínicos. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram representadas pela linha de tendência em vermelho. E a força da correlação (r) está descrita no gráfico.

5.4 Estadiamento clínico

Ao avaliar que a correlação mais forte foi encontrada com o escore dos sinais clínicos e que esse parâmetro é de fácil execução, foi elaborado o estadiamento da LVC considerando a somatória dos sinais clínicos para cada animal. O objetivo foi buscar correlacionar com a infecção de *L. infantum* aos flebotomíneos (baixa, média e alta correlação).

Ao realizar os exames clínicos nos 47 cães, 38 sinais clínicos foram avaliados e atribuída pontuações de acordo com a gravidade da alteração (Anexo 2). Assim, todos os sinais clínicos foram categorizados em escore clínico de 0 a 5, sendo 0 sem o sinal clínico e 5 com sinal clínico muito grave. A cada sinal clínico foi atribuído um peso, e ao final, toda a pontuação foi somada para obter o valor correspondente ao estágio clínico de cada cão. Assim, os cães foram categorizados em três estádios clínicos diferentes em que 18 cães foram categorizados no estágio I, 18 no estágio II e 11 no estágio III, conforme indicado na Tabela 7.

Tabela 7: Estadiamento dos 47 cães naturalmente infectados do projeto.

Estádio	Descrição	Somatório escores clínicos	Nº de cães (%)
I	sinais clínicos leves	0 – 100	18 (38,3%)
II	Sinais clínicos moderados	101-200	18 (38,3%)
III	Sinais clínicos graves	>200	11 (23,4%)

5.5 Carga parasitária nos flebotomíneos

Analisando a positividade dos “pools” dos flebotomíneos por qPCR, encontrou-se 46,8% dos flebotomíneos positivos, com distribuição semelhante entre os diferentes estádios. O estadiamento I apresentou 50% dos flebotomíneos positivos, o estadiamento II apresentou 44,4% dos flebotomíneos positivos e o estadiamento III, 45,5% positivos.

Tabela 8: Positividade dos “pools” de flebotomíneos por estadiamento após se alimentarem em cães naturalmente infectados.

Estadiamento	positivos	%	negativos	%	total
I	9	50	9	50	18
II	8	44.4	10	55.6	18
III	5	45.5	6	54.5	11
Total	22	46.8	25	53.2	47

*pools de 10 flebotomíneos

Ao comparar a carga parasitária nos flebotomíneos em relação aos estadiamentos foi observado diferença entre os estádios I e III (Figura 18A). Houve uma correlação entre o agravamento clínico e carga parasitária dos flebotomíneos (Figura 18B), onde a correlação foi positiva e moderada entre estes parâmetros.

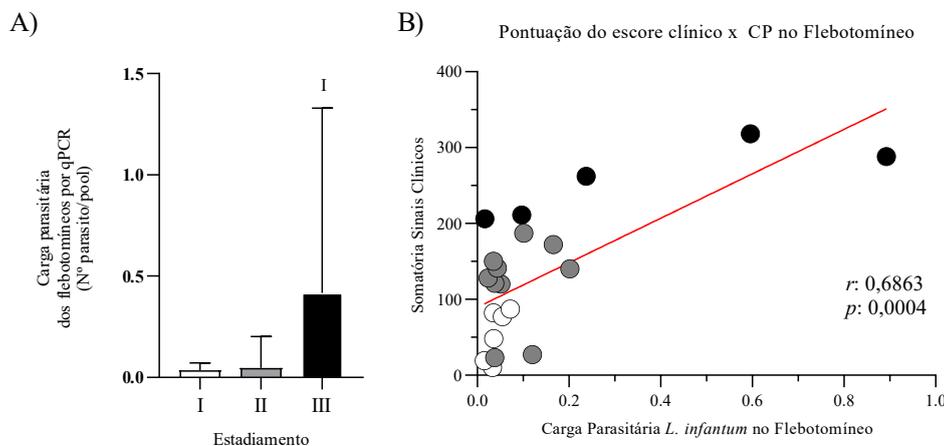


Figura 18: Avaliação da carga parasitária dos “pools” de flebotomíneos em relação aos estádios clínicos. (A) Comparação da carga parasitária nos flebotomíneos entre os estádios (I, II, III), o eixo X representa os estadiamentos clínicos. O eixo Y representa a carga parasitária de *L. infantum* nos flebotomíneos. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas correspondentes dos respectivos grupos, conforme indicado acima das barras. (B) Correlação entre a carga parasitária nos flebotomíneos e a pontuação do escore clínico. O eixo X representa a carga parasitária de *L. infantum* nos flebotomíneos. O eixo Y representa a somatória dos sinais clínicos dos cães naturalmente infectados. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pela linha de tendência em vermelho e seu valor indicado junto com a força da correção (r) em cada gráfico.

5.6 Isolamento de *Leishmania* sp. em cultivo *in vitro*

Foi realizada a punção de medula óssea nos 47 cães e os aspirados foram mantidos em meio de cultura, conforme descrito na metodologia. Entre esses cães, foi isolado *Leishmania* sp. em 16 amostras (34%). Em 11 das amostras (23,4%), ocorreu contaminação com fungos ou bactérias, o que inviabilizou o isolamento do parasito. Em 20 amostras (42,6%), não foi detectada a presença do parasito.

5.7 Avaliação da carga parasitária por Imuno-histoquímica (IHQ)

Avaliando a carga parasitária por IHQ dos diferentes tecidos dos animais naturalmente infectados, observou-se que os órgãos que apresentaram maior porcentagem de carga parasitária (CP) alta (+++) foi a pele (10,2%), seguida pelo baço (5,1%) e o linfonodo (3,4%). Em relação a porcentagem de cães com carga parasitária intermediária (++) , o baço (15,3%) foi o órgão que apresentou maior porcentagem. Em relação a porcentagem de cães com baixa carga parasitária (+) em todos os tecidos, a porcentagem foi semelhante. O percentual de cães

negativos (tecidos que não foi visualizado amastigotas) também foi semelhante. Não houve diferença estatística entre os órgãos em relação a IHQ (Figura 18).

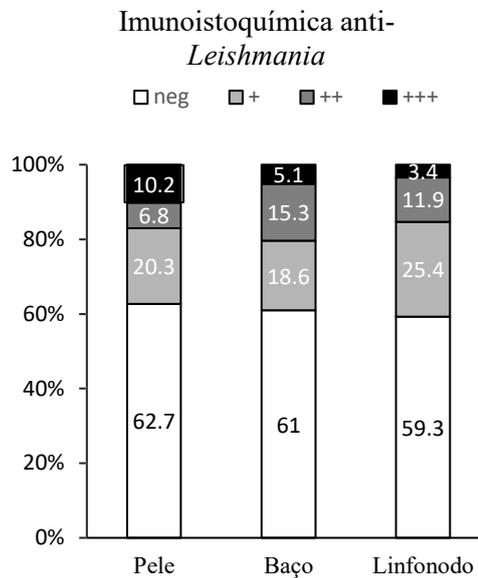


Figura 19: Avaliação da carga parasitária na pele (da orelha), baço e linfonodo (poplíteo) empregando-se a metodologia Imuno-histoquímica em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. O eixo X representa os diferentes órgãos (baço, pele, linfonodo). O eixo Y representa a porcentagem da carga parasitária de *L. infantum*. As barras em na cor branca representam os resultados negativos (neg.), em cinza claro representa carga parasitária baixa (+), em cinza escuro representa a carga parasitária intermediária (++), em preto está representando a carga parasitária alta (+++).

Em relação a carga parasitária dos diferentes estadiamentos, de acordo com cada órgão avaliado, na pele o estágio clínico I, 90% das amostras foram negativas, 5% “+”, 5% “++” e nenhum apresentou carga parasitária alta (+++); no estágio II, 52,4% foram negativos, 28,6% “+”, 9,5 “++” e 9,5 “+++”; e, em relação ao estágio III, 28,6% foram negativos, 35,7% “+”, 7,1% “++”, 28,6% “+++”. Os estadiamentos clínicos II e III apresentaram cães com cargas parasitárias mais altas em relação ao I (Figura 19).

No baço, o estágio clínico I, 85% das amostras foram negativas, 5% “+”, 5% “++” e também 5% de carga parasitária alta (+++); no estágio clínico II, 57% foram negativos, 28,6% “+”, 14,3% “++” e nenhuma amostra apresentou alta CP “+++”. Em relação ao estágio clínico III, 15,4% foram negativos, 30,8% “+”, 38,5% “++”, 15,4% “+++”. Dessa forma houve apenas diferença entre os estádios I e III (Figura 19 B).

No Linfonodo o estágio I também apresentou diferença estatística em relação ao estágio III, sendo que no estágio I, 80% das amostras foram negativas, 15% “+”, 5% “++” e nenhuma

amostra apresentou carga parasitária alta (+++), no estágio II 47,6% foram negativos, 38,1% “+”, 9,5 “++” e 4,8 “+++” e em relação ao estágio III, 33,3% foram negativos, 25% “+”, 33,3% “++”, 8,3% “+++”. Neste tecido foi encontrado uma diferença significativa entre os estádios I e III (Figura 19C).

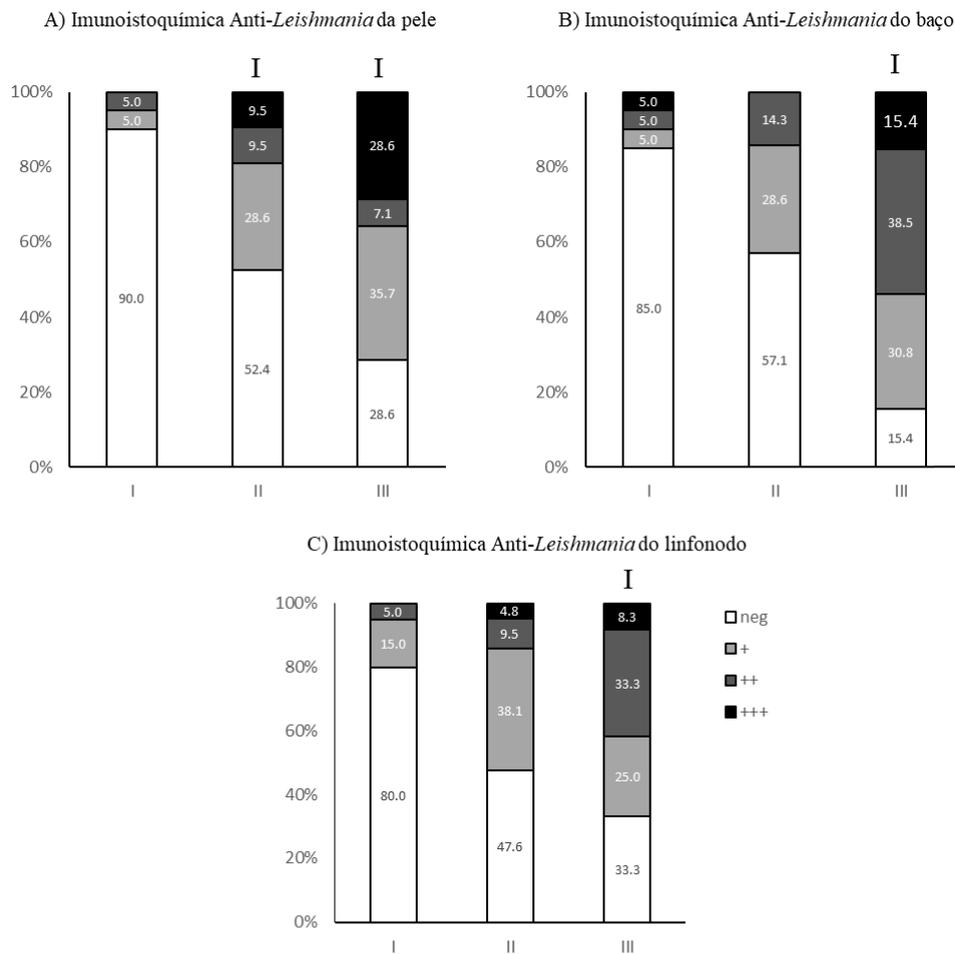


Figura 20: Porcentagem da carga parasitária na pele (da orelha), baço e linfonodo (poplíteo) empregando-se a Imuno-histoquímica (IHQ) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* por diferentes estadiamentos (I, II, III). O gráfico “A)” representa a IHQ na pele; o “B)” IHQ no baço; “C)” IHQ no linfonodo. O eixo X representa os diferentes estadiamentos (I, II, III); o eixo Y representa a porcentagem da carga parasitária por categorias (neg., +, ++, +++); a barra na cor branca representa o tecido em que não foi encontrado amastigotas de *Leishmania* (neg.), a barra em cinza mais claro representa a carga parasitária discreta (+), a barra cinza mais escuro representa a carga parasitária moderada (++) e a barra em preto representa a carga parasitária intensa (+++). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas correspondentes dos respectivos grupos do estadiamento clínico, conforme indicado acima das barras.

5.8 Avaliação da carga parasitária por qPCR

Ao avaliar a carga parasitária dos diferentes órgãos, considerando todos os cães infectados por *L. infantum*, observou-se que houve diferença apenas em relação à pele da orelha, com alta carga ($p < 0,05$) parasitária em relação a medula óssea. Entre os demais órgãos não houve diferença significativa (Figura 20).

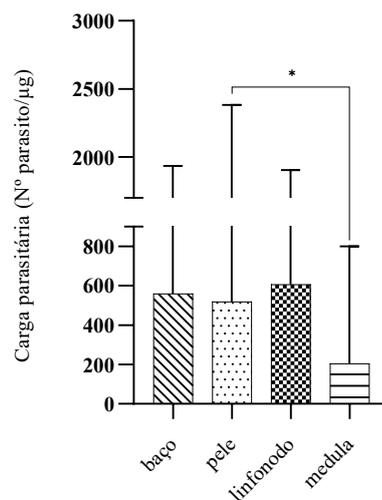


Figura 21: Avaliação da carga parasitária no baço, pele (da orelha), linfonodo (poplíteo) e medula óssea empregando-se a metodologia de qPCR em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. O eixo X representa os diferentes órgãos (baço, pele, linfonodo, medula óssea). O eixo Y representa carga parasitária de *L. infantum* (nº de parasitos por µg do órgão). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas barras conectoras com asterisco.

5.9 Avaliação da carga parasitária por diferentes estádios clínicos

Ao comparar a carga parasitária (CP) nos diversos órgãos com os estádios clínicos, observou-se diferença na CP da pele (orelha) entre o estágio III e os demais estádios ($p < 0,05$), bem como entre o estágio II em relação ao estágio I ($p < 0,05$) (Figura 21 A). No baço, verificou-se diferença entre os estádios I e III ($p < 0,05$), e não houve diferença entre o II e o III (Figura 21 B). Quanto ao linfonodo (poplíteo), houve diferença na CP entre os estádios II e III em relação ao estágio I ($p < 0,05$) (Figura 21 C). Na medula óssea, observou-se diferença entre o estágio III, com maior carga parasitária em relação aos demais estádios ($p < 0,05$), assim como entre os estádios II, que apresentou maior intensidade parasitária ($p < 0,05$) em relação ao estágio I (Figura 21 D).

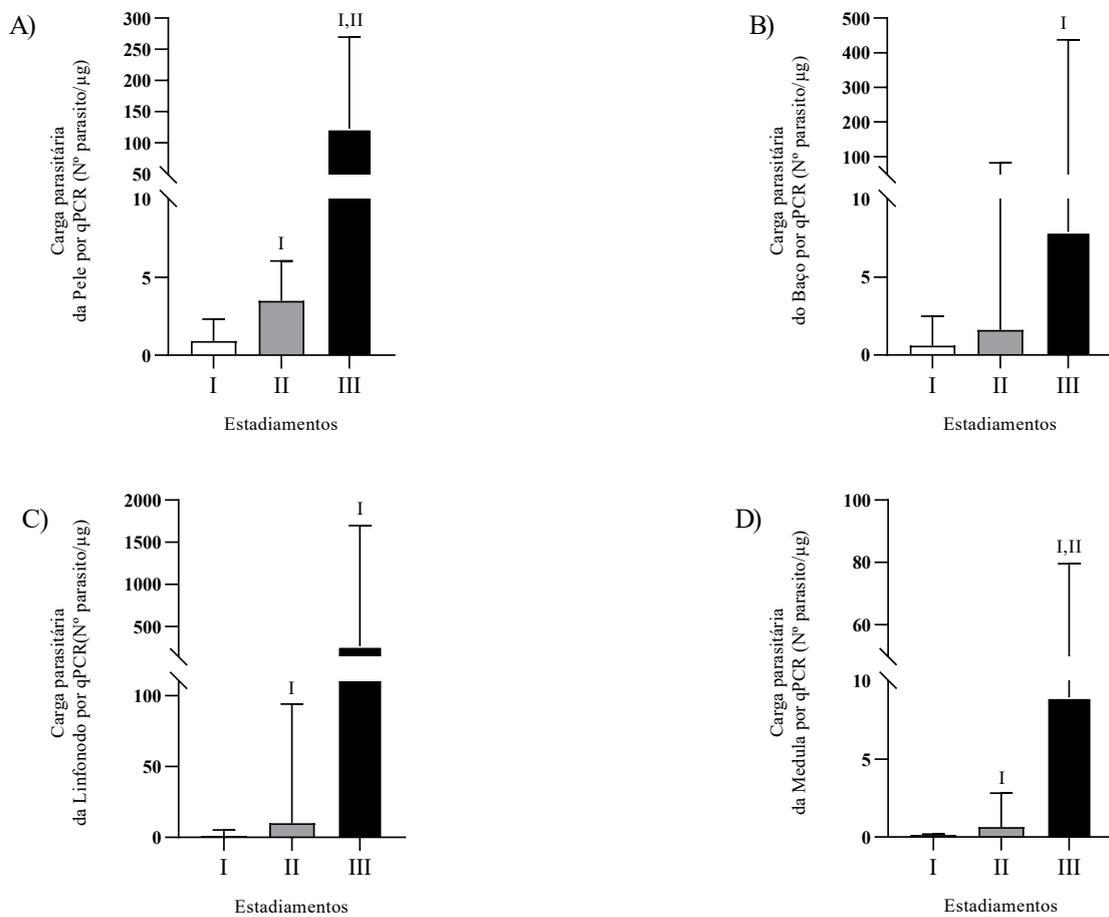


Figura 22: Avaliação da carga parasitária em relação aos diferentes estadiamentos (I, II, III) pele (de orelha; A), no baço (B), linfonodo (poplíteo; C) e medula óssea (D) empregando-se a metodologia de qPCR. O eixo x representa os diferentes estádios clínicos (I, II, III). O eixo y representa carga parasitária de *L. infantum* (n° de parasitos por µg de tecido). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas correspondentes dos respectivos grupos, conforme indicado acima das barras.

5.10 Avaliação dos parâmetros hematológicos por estádios clínicos

A análise dos parâmetros hematológicos de acordo com o estadiamento clínico está representado pela Figura 22, na qual os intervalos de referência (IR), de cada biomarcador, estão representados por linhas tracejadas nos diferentes gráficos. Ao analisar a contagem de eritrócitos (Figura 22 A), foi observado que os estádios I e II estão dentro dos IR, mas o estágio III está abaixo do limite de referência. Além disso, a contagem de eritrócitos no estágio III foi significativamente menor ($p < 0,05$) em comparação com os estádios I e II (Figura 22 A).

Quanto aos valores de hemoglobina (Figura 22 B), foi observado que os estádios II e III estão abaixo dos IR, e houve redução significativa ($p < 0,05$) no estágio clínico III em comparação aos estádios I e II. A porcentagem do hematócrito também foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo III em relação aos estádios I e II (Figura 22 C). A média dos valores do estágio III ficou abaixo do IR (Figura 22 C). Os valores do volume corpuscular médio (VCM), em todos os estádios, permaneceram dentro dos IR, e não houve diferença entre eles (Figura 22 D). Quanto à concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), todos os estádios permaneceram abaixo dos IR, sem diferenças entre eles (Figura 22 E).

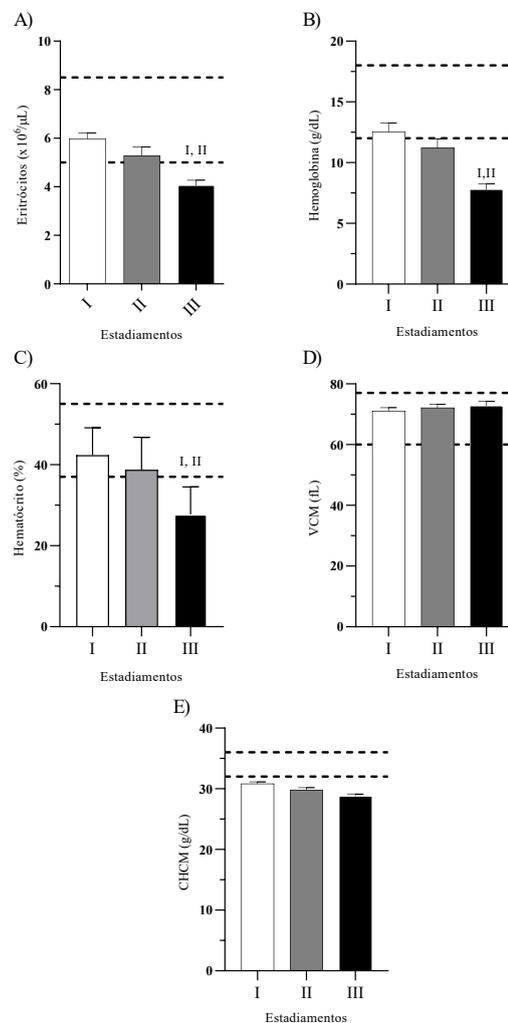


Figura 23: Avaliação dos parâmetros hematológicos da série vermelha em cães categorizados conforme os três estádios clínicos. O eixo X representa os diferentes estádios (I, II, III). O eixo Y representa os parâmetros hematológicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica intervalo de referência para cada biomarcador avaliado, conforme Kaneko (2022). O painel “A” representa o

número de eritrócitos, “B” representa a quantidade de hemoglobina, “C” representa a porcentagem de Hematócritos, “D” representa Volume Corpuscular Médio (VCM), “E” representa a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas dos grupos correspondentes acima de cada barra.

Ao avaliar o leucograma, foi observado que nenhum dos biomarcadores (leucócitos totais - A, linfócitos - B, monócitos - C, eosinófilos - D, neutrófilos segmentados - E) apresentaram valores fora do intervalo de referência, sem haver diferença estatística entre os diferentes estádios para cada um dos parâmetros avaliados (Figura 23). Em relação a contagem das plaquetas totais, todos os estádios ficaram abaixo do IR, mas sem haver diferença entre eles (Figura 23 F).

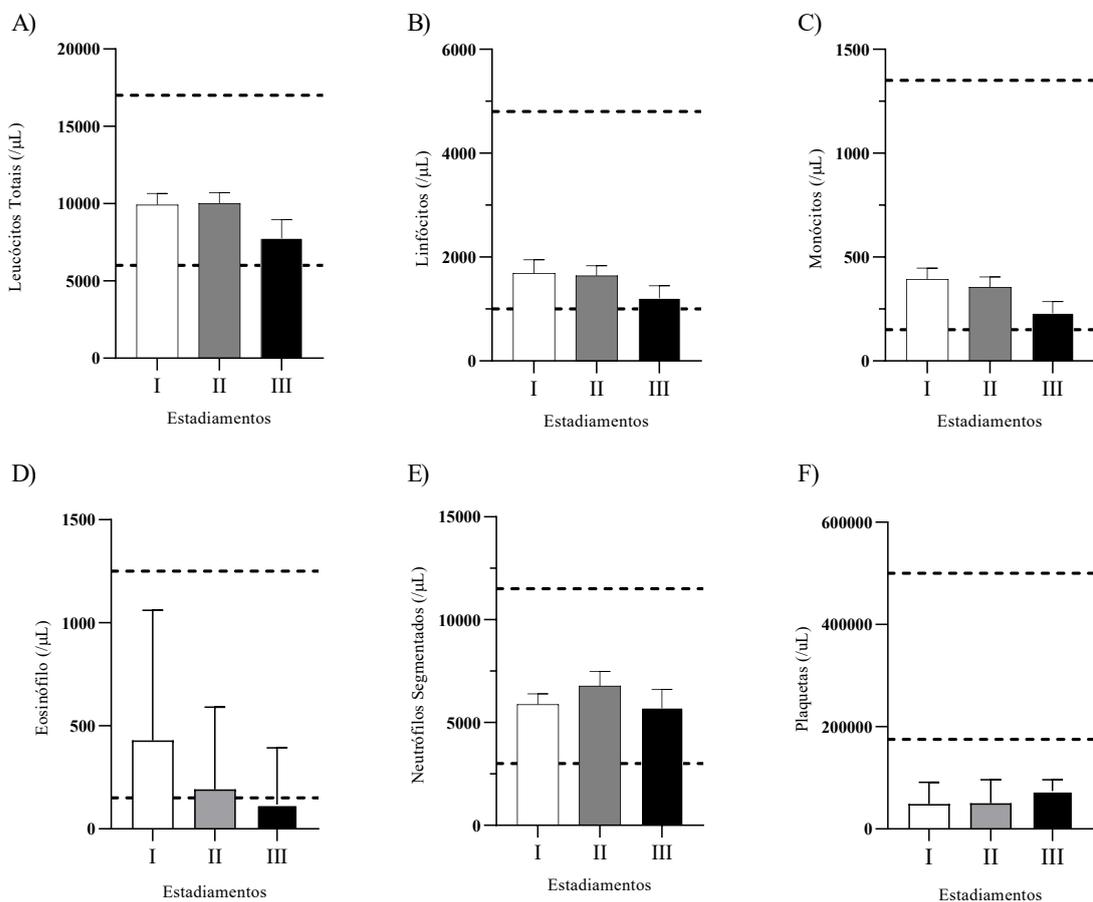


Figura 24: Avaliação do leucograma e plaquetograma em cães categorizados conforme os três estádios clínicos. O eixo X representa os diferentes estádios (I, II, III). O eixo Y representa os parâmetros hematológicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica intervalo de referência para cada biomarcador avaliado. O painel “A” representa o número de leucócitos totais, “B” o número de linfócitos, “C” representa a número de monócitos, “D” o número de eosinófilos, “E” representa o número de neutrófilos segmentados, e o “F” o número de plaquetas totais. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas dos grupos correspondentes

acima de cada barra.

5.11 Avaliação dos parâmetros bioquímicos por estádios clínicos

Ao analisar os biomarcadores bioquímicos (Figura 24), os valores de ureia apresentaram-se dentro do intervalo de referência (IR), sem haver diferença entre os estádios I, II e III (Figura 24 A). Em relação à creatinina, os valores permanecem dentro dos IR, sem haver diferença entre os estádios (Figura 24 B). Os valores de albumina apresentaram-se dentro do IR apenas para o estágio I, sendo o grupo de cães do estágio III com valores ($P < 0,05$) menores em relação ao estágio I (Figura 24 C). Os valores de globulina (Figura 24 D) e proteínas totais (Figura 24 E) permaneceram acima do IR, mas sem haver diferença entre os estádios. A razão albumina/globulina não apresentou diferença entre os estádios, e os valores médios, para todos os estádios clínicos, apresentaram-se abaixo do intervalo de referência (Figura 24 F).

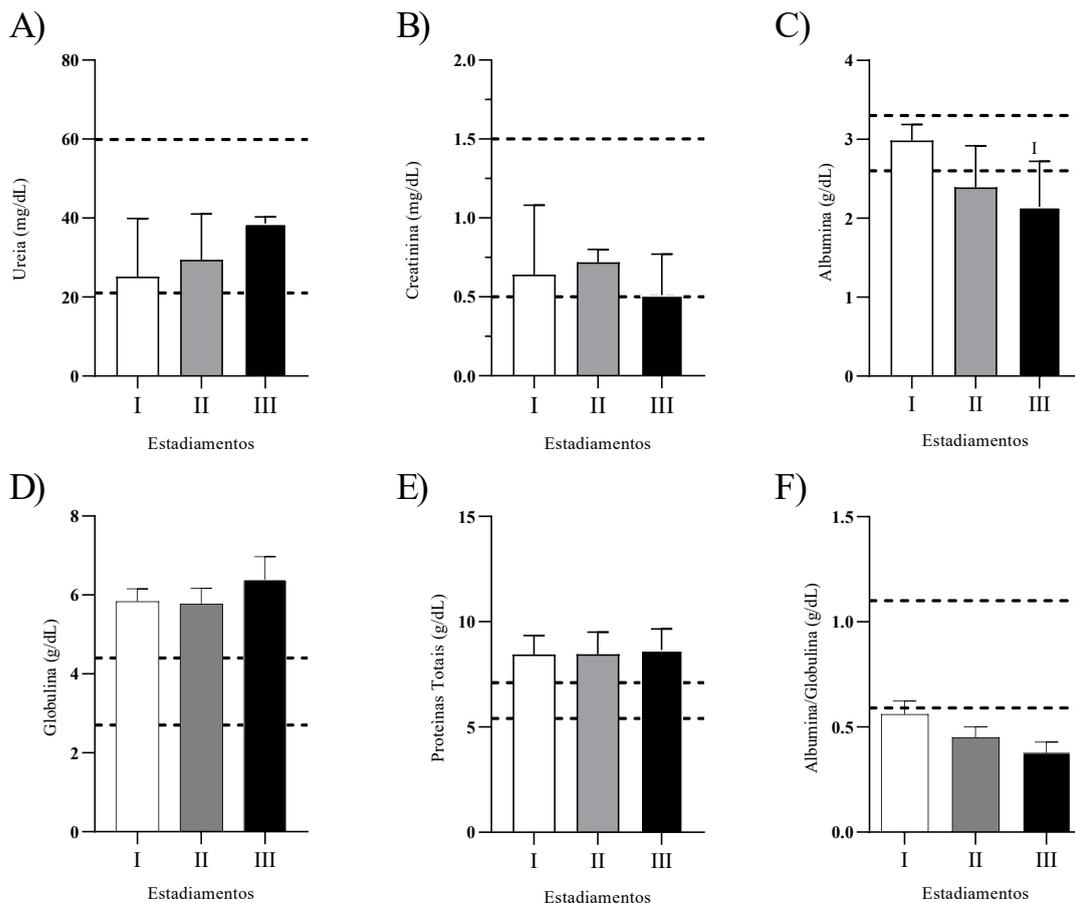


Figura 25: Avaliação dos parâmetros bioquímicos em cães categorizados conforme os três estádios clínicos. O eixo X representa os diferentes estádios (I, II, III). O eixo Y representa os parâmetros

bioquímicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica valores considerados como referência para cada biomarcador avaliado. O painel “A” representa os valores de ureia, “B” os valores de creatinina, “C” os valores de albumina, “D” os valores de globulina, “E” os valores de proteínas totais, “F” Razão albumina/globulina. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas dos grupos correspondentes acima de cada barra.

Em relação aos parâmetros bioquímicos enzimáticos (Figura 25), os valores da enzima alanina aminotransferase (ALT) permaneceram dentro do IR, e houve aumento significativo ($p < 0,05$) no estágio III em relação aos grupos I e II (Figura 25 A). Ao analisar os valores de aspartato aminotransferase (AST) foi observado que os valores médios permaneceram dentro do IR, sem haver diferença entre os grupos (Figura 25 B). Os níveis da gama glutamil transferase (GGT) permaneceram abaixo do IR apenas no estágio III, sem haver diferença entre os três grupos de estadiamento (Figura 25 C). A fosfatase alcalina também apresentou os resultados médios dentro do IR, e não houve diferença entre os três estádios (Figura 25 D).

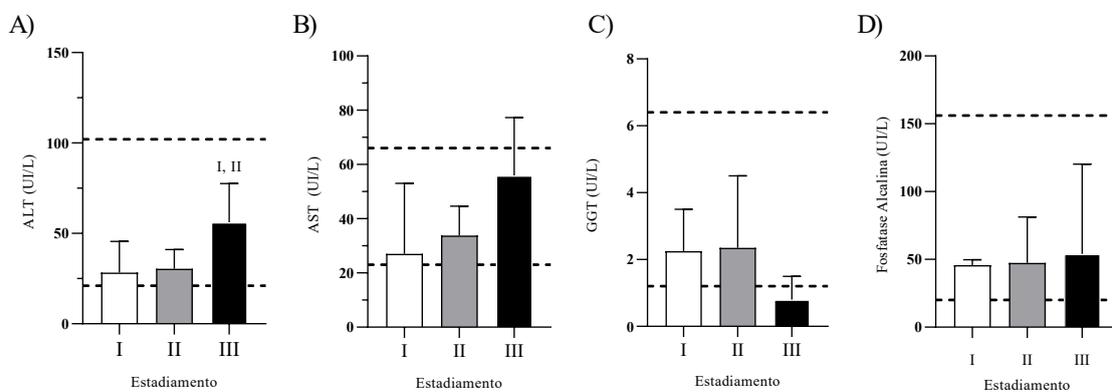


Figura 26: Avaliação dos parâmetros bioquímicos enzimáticos em cães categorizados conforme os três estádios clínicos. O eixo X representa os diferentes estádios (I, II, III). O eixo Y representa os parâmetros bioquímicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica o intervalo de referência para cada biomarcador avaliado. O painel “A” representa os valores de alanina aminotransferase (ALT), o “B” os valores de aspartato aminotransferase (AST), “C” os valores de gama glutamil transferase (GGT), “D” os valores de fosfatase alcalina (FA). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas dos grupos correspondentes acima de cada barra.

5.12 Avaliação do perfil celular *ex vivo* por citometria de fluxo

Abaixo estão representados os valores médios dos perfis celulares avaliados por imunofenotipagem de leucócitos circulantes de todos os cães do estudo. Foram observados os seguintes valores médios \pm desvio padrão: subpopulação de linfócitos T CD5⁺CD4⁺ (434,9 \pm 365) e T CD5⁺CD8⁺ (247,2 \pm 226,2); linfócitos B CD21⁺ (152,1 \pm 139); e monócitos CD14⁺ (34,84 \pm 24,18) (Tabela 8).

Tabela 9: Estatística descritiva dos marcadores celulares CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺.

Marcadores	N amostral	Média	Mediana	DP
CD4 ⁺	36	434.9	368.5	365
CD8 ⁺	33	247.2	165	226.2
CD21 ⁺	35	152.1	111	139
CD14 ⁺	32	34.84	27	24.18

Ao analisar cada marcador imunofenotípico (CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺) nos diferentes estádios clínicos (Figura 26), apesar de não ter sido observada diferença para a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ (Figura 26 A), foi identificada redução nos níveis linfócitos T CD8⁺, no grupo do estágio III em relação ao estágio I (Figura 26 B). No que diz respeito aos níveis de linfócitos B CD21⁺, houve redução nos estádios II e III em relação ao estágio I (Figura 26 C). em relação aos monócitos CD14⁺, foi verificada redução nesta população celular no estágio III em relação aos estádios I e II (Figura 26 D).

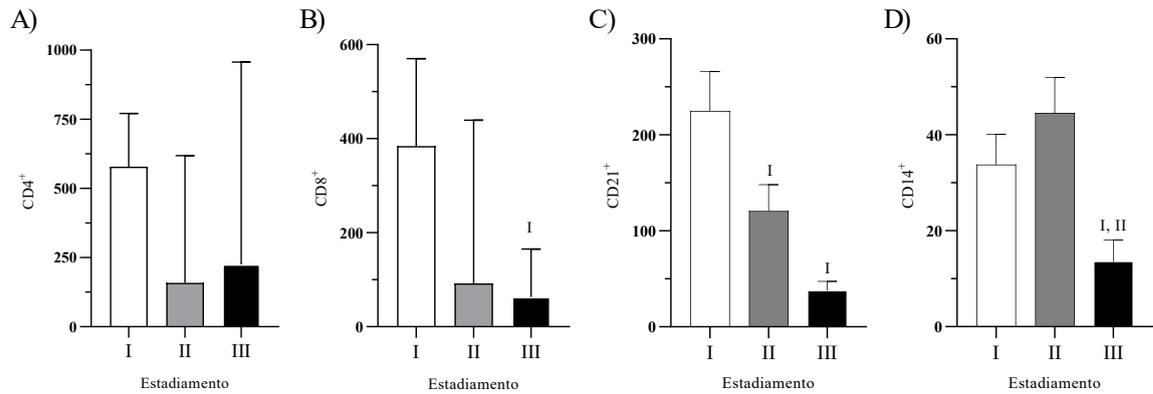


Figura 27: Avaliação do perfil imunofenotípico *ex vivo* em leucócitos circulantes de cães categorizados conforme os três estádios clínicos. O Painel “A” representa a subpopulação de linfócitos T CD5⁺CD4⁺. O Painel “B” representa a subpopulação de linfócitos T CD5⁺CD8⁺. O Painel “C” representa a população de linfócitos B CD21⁺. O Painel “D” representa a população de monócitos CD14⁺. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas siglas dos grupos correspondentes acima de cada barra.

6 DISCUSSÃO

A questão fundamental que esta pesquisa aborda é a busca por biomarcadores preditivos que possam ser relacionados à correlação da infectividade do cão aos flebotomíneos e o desenvolvimento de um estadiamento que possa prever esta correlação. Essa problemática é crucial, pois não sabemos quais cães possuem um potencial maior na transmissão da infecção ao vetor, e a análise clínica poderia consistir em um marcador epidemiológico, ou mesmo com um dos critérios de monitoramento de animais em tratamento. Assim, poderia ser estimado com maior precisão a chance de transmissão a partir de um cão infectado aos flebotomíneos. Neste sentido, atualmente, com a autorização do uso do medicamento Milteforan como tratamento da LVC, estes biomarcadores e o estadiamento elaborado neste estudo poderão ser utilizados no monitoramento e prognóstico do tratamento, além de estudos de imunoproteção de vacinas contra a LVC.

Foram avaliados diversos tipos de biomarcadores, incluindo as cargas parasitárias de diferentes órgãos, a absorvância da imunoglobulina IgG, parâmetros hematológicos (hemograma, leucograma, plaquetograma), parâmetros bioquímicos e enzimáticos, e imunológicos.

Primeiramente foi proposto investigar as possíveis correlações entre biomarcadores e o risco de cães parasitados por *L. infantum* transmitirem o parasito aos vetores, analisando a carga parasitária nos flebotomíneos através da qPCR com pelo menos cinco dias após se alimentarem em cães naturalmente infectados através da técnica de xenodiagnóstico. A técnica de xenodiagnóstico é extremamente valiosa para avaliar a importância epidemiológica de cães infectados com *L. infantum*. Essa metodologia permite a análise das taxas de alimentação e infecção em flebotomíneos, fornecendo informações cruciais sobre a potencial capacidade de transmissão da infecção (GUARGA et al., 2000b; MICHALSKY et al., 2007; MOLINA et al., 1994; SCORZA et al., 2021). Apesar de sua utilidade, não é recomendado o uso rotineiro devido à sua complexidade e à necessidade de um laboratório especializado com uma colônia estabelecida de flebotomíneos (DA COSTA-VAL et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008a)

Foi realizada, então, a quantificação do DNA de *L. infantum* em “pools” (10 espécimes) de flebotomíneos após a realização do procedimento de xenodiagnóstico em cada cão. Ao longo do estudo foi encontrado uma baixa quantidade de *L. infantum* nos pools dos vetores. Alguns estudos extraíram individualmente o DNA de cada flebotomíneo e constataram que apenas cerca de 10% dos flebotomíneos conseguiram se infectar ao se alimentarem em cães

naturalmente infectados (BORJA et al., 2016; COURTENAY et al., 2002b). Essas pesquisas ajudam a explicar a baixa quantidade encontrada neste estudo, podendo este ser um viés. A carga parasitária nos vetores foi avaliada com pelo menos cinco dias após o xenodiagnóstico, em um estudo anterior Borja et al. (2016) também relatou baixas cargas parasitárias em flebotomíneos após cinco dias da alimentação. Essa condição também pode explicar a baixa carga parasitária encontrada na maioria das amostras de flebotomíneos. Uma possível maneira de aprimorar a detecção do parasito seria submeter o inseto transmissor a dois repastos sanguíneos. Estudo anterior revelou que essa metodologia resultou em um aumento de até 69 vezes na carga parasitária para o *L. longipalpis* infectado com *L. infantum* e até 125 vezes para o *P. papatasi* infectado com *L. major* (SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020). Adicionalmente, observou-se um aumento significativo no número de metacíclicos dessas espécies, reproduzindo o comportamento encontrado na natureza, onde os insetos transmissores se alimentam várias vezes ao longo de suas vidas (SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020).

Aproximadamente metade dos cães pôde infectar os insetos transmissores com parasitos, sendo 24 (51,06%) de um total de 47 cães submetidos ao xenodiagnóstico. Esse resultado é semelhante ao encontrado por (BORJA et al., 2016).

Ao correlacionar a carga parasitária nos tecidos com a carga parasitária nos insetos transmissores, observou-se uma correlação positiva com a pele da orelha, os linfonodos poplíteos e a medula óssea, enquanto não houve correlação com a carga parasitária no baço. A correlação mais forte, entre os órgãos, encontrada foi com a quantidade de parasitos na medula óssea. Outros pesquisadores também encontraram resultados semelhantes em relação à correlação da CP na pele e a capacidade infecciosa em cães (Borja et al., 2016; De Amorim et al., 2011; Courtenay et al., 2002). Em um estudo com cães tratados com Miltefosina, foi constatada uma concordância entre os resultados obtidos por xenodiagnóstico e qPCR cutâneo, demonstrando uma redução estatisticamente significativa na carga parasitária na pele e na capacidade de infectar flebotomíneos (DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019). Esses pesquisadores consideraram uma carga parasitária elevada na pele do cão como um forte indicativo da capacidade infecciosa para quirópteros (COURTENAY et al., 2014). No entanto, (FERRO et al., 2001) não encontrou nenhuma associação entre a positividade da pele e a infectividade para flebotomíneos.

Em um estudo realizado em cães infectados verticalmente, observou-se uma concentração elevada de parasitos de *L. infantum* na pele, que foi significativamente maior do

que a encontrada no sangue e similar àquele presente no tecido esplênico (SCORZA et al., 2021). Além disso, Borja et al. (2016) e Verçosa et al. (2008) identificaram correlações positivas entre as cargas parasitárias no sangue dos cães e aquelas encontradas nos flebotomíneos. Até o momento, não foram encontrados estudos que investigaram a relação entre a carga parasitária nos linfonodos e na medula óssea e a capacidade infecciosa para os flebotomíneos.

Ao comparar a absorbância da imunoglobulina IgG total por ELISA com a CP de *L. infantum*, não foi identificado nenhuma correlação entre essas variáveis. Por outro lado, Courtenay et al. (2002) verificaram que tanto a probabilidade de infecção quanto a proporção de flebotomíneos infectados estavam positivamente correlacionadas com os níveis de anticorpos anti-*Leishmania*. No entanto, em cães monitorados antes e depois da quimioterapia, não foi encontrada nenhuma associação entre infecção e título de anticorpos por imunofluorescência indireta (ALVAR et al., 1994; GRADONI; GRAMICCIA; MANCIANTI, 1987)

Quanto à correlação dos parâmetros hematológicos do hemograma (série vermelha) com a CP nos flebotomíneos, só foi encontrado correlação nos eritrócitos. Não houve correlação entre essas variáveis nos demais parâmetros. Na contagem de eritrócitos, observou-se uma correlação negativa, embora fraca. Ao examinar a relação entre os parâmetros do leucograma e plaquetograma com a carga parasitária nos flebotomíneos, identificou-se correlações nos linfócitos, monócitos e eosinófilos. A correlação nos linfócitos foi negativa e moderada, enquanto nos monócitos e eosinófilos, a correlação também foi negativa e moderada. Ao analisar os parâmetros bioquímicos e enzimáticos em relação à CP nos flebotomíneos, encontrou-se correlação apenas no parâmetro de globulina, com uma correlação positiva e fraca. Quanto aos parâmetros enzimáticos, apenas a fosfatase alcalina (FA) apresentou correlação, sendo positiva e fraca. Não foram identificados outros estudos que tenham se proposto a correlacionar esses parâmetros com a capacidade de infectividade dos flebotomíneos após o xenodiagnóstico.

Ao analisar a correlação entre os marcadores celulares e a capacidade de parasitismo (CP) nos flebotomíneos, foi observado que apenas que o CD8⁺ apresentou correlação negativa e moderada. Não foi identificada correlação com os marcadores CD4⁺, CD21⁺ e CD14⁺. Em contraste com estes resultados, Courtenay et al. (2002) identificaram correlação negativa entre a infectividade e a porcentagem de células CD4⁺ circulantes. Guarga et al. (2000) também

encontraram uma correlação inversa entre a porcentagem de células T CD4⁺ e as taxas de infecção em fêmeas ingurgitadas de *P. perniciosus*, destacando a importância dessas células na resposta imunológica contra *L. infantum* em cães. Entretanto, não foi observada uma associação significativa no caso das células T CD8⁺.

Ao analisar a correlação entre a soma dos sinais clínicos e a capacidade parasitária (CP) nos flebotomíneos, foi verificada uma correlação positiva e moderada, destacando-se como a associação mais robusta entre os biomarcadores avaliados e a carga parasitária nos flebotomíneos. Em consonância com estes achados, diversos autores também apontaram que a capacidade de cães infectarem flebotomíneos, assim como as taxas de infecção desses insetos, estão positivamente correlacionadas com a presença de sinais clínicos em cães infectados (COURTENAY et al., 2002a; DA COSTA-VAL et al., 2007; FERRO et al., 2001; VERÇOSA et al., 2008). Estudos anteriores de Michalsky et al. (2007) indicaram que cães sintomáticos têm aproximadamente quatro vezes mais potencial de infectar os vetores da LV do que animais oligossintomáticos ou assintomáticos. Por outro lado, alguns pesquisadores relatam que nem a capacidade infecciosa canina nem as taxas de infecção dos flebotomíneos estão associadas às manifestações clínicas da LVC (BORJA et al., 2016; GUARGA et al., 2000a; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016; MOLINA et al., 1994). Um estudo conduzido em cães infectados verticalmente, utilizando o estadiamento da LeishVet, revelou que cães com doença leve a moderada (níveis LeishVet 2–3) foram os mais infecciosos para *L. longipalpis* em comparação com cães com doença subclínica (LeishVet nível 1) ou grave (LeishVet nível 4) (SCORZA et al., 2021). Essas discrepâncias na literatura podem ser atribuídas à falta de padronização nos protocolos de condução do xenodiagnóstico e a necessidade de critérios de estadiamento mais padronizados nas condições ambientais a que os cães e flebotomíneos estão submetidos (SCORZA et al., 2021).

Após identificar as possíveis associações entre os biomarcadores CP da pele, medula e linfonodo, juntamente com os valores de eritrócitos, linfócitos, monócitos e eosinófilos, além das globulinas e fosfatase alcalina, bem como as populações de linfócitos TCD 8, em relação à carga parasitária de *L. infantum* em *L. longipalpis* pós-xenodiagnóstico, e diante da necessidade de estabelecer critérios mais padronizados para o estadiamento, bem como a ausência de um estadiamento para avaliar a correlação da transmissão do parasito pelo cão ao vetor, foi elaborado um novo critério de estadiamento clínico para LVC.

Esse estadiamento baseia-se na correlação mais robusta encontrada, considerando a

somatória dos sinais clínicos, pois, além de ter sido a correlação mais forte, esse parâmetro é de fácil execução e baixo custo. Com base nesse estadiamento clínico, seria possível classificar os cães em relação ao risco de infecção (baixo risco, médio risco e alto risco) para os flebotomíneos. Para comprovar a validade deste novo estadiamento clínico, foram comparados os diferentes estádios em relação aos biomarcadores avaliados nos cães. Os cães foram categorizados nos estádios: estágio I, somatória dos sinais clínicos dentro do intervalo de 0-100, sem sinais clínicos ou sinais clínicos leves; estágio II, somatória entre 101-200, com sinais clínicos considerados moderados; estágio III, somatória > 200, considerado com sinais clínicos graves. A correlação entre o sistema de estadiamento clínico e os dados da carga parasitária no xenodiagnóstico reforça a hipótese do estudo indicando alto risco dos cães com maior agravamento clínico em infectarem flebotomíneos com alta carga parasitária de *L. infantum*.

Ao comparar a carga parasitária nos flebotomíneos em relação aos estadiamentos foi observado diferença entre os estádios I e III (Figura 18A), reforçando a capacidade dos animais com maior agravamento clínico resultarem na infecção de flebotomíneos por *L. infantum* com alta carga parasitária. De fato, ao se avaliar a correlação entre o agravamento clínico e carga parasitária dos flebotomíneos (Figura 18B), ficou evidente a correlação positiva e moderada entre estes parâmetros reforçando que os animais mais afetados clinicamente são capazes de infectar com alta carga parasitária os flebotomíneos.

Primeiramente avaliou-se a comparação dos estádios clínicos diante a carga parasitária encontrada nos cães através da Imuno-histoquímica. A Imuno-histoquímica (IHQ) anti-*Leishmania* foi utilizada para investigar a carga parasitária (CP) na pele de orelha, linfonodo poplíteo e baço.

Antes de se comparar com o estadiamento elaborado, foi avaliado, de forma geral, como cada órgão se comportou em relação a carga parasitária avaliada pela IHQ. Ao avaliar a carga parasitária por IHQ nos diferentes tecidos dos cães naturalmente infectados, descobriu-se que a porcentagem de tecidos sem amastigotas foi semelhante, não havendo diferença estatística entre os órgãos comparados. Toplu e Aydogan (2011) observaram que apenas a pele não apresentou amastigotas no tecido. Quanto à porcentagem de cães com baixa carga parasitária, em todos os tecidos, a porcentagem foi semelhante. Toplu e Aydogan (2011), ao compararem os mesmos órgãos, constataram que a pele apresentou 20% de CP baixa, o linfonodo apresentou 10% dos cães com CP baixa, e o baço foi o órgão com a maior frequência de CP baixa encontrada (30%). Em relação à frequência de cães com carga parasitária média, o órgão que

apresentou maior percentagem foi o baço. De acordo com Toplu e Aydogan (2011), eles encontraram o mesmo nível de frequência de CP média no baço e linfonodo (45%), enquanto a pele foi o órgão com menor frequência (30%) em relação à CP baixa. Quanto à carga parasitária alta, constatou-se que a pele foi o órgão com maior intensidade parasitária, seguido pelo baço e por último o linfonodo. No entanto, Toplu e Aydogan (2011) observaram que a porcentagem de CP alta foi maior no linfonodo, seguida pela pele e com menor frequência no baço.

Na avaliação da densidade parasitária no linfonodo por meio de Imuno-histoquímica anti-*Leishmania*, Giunchetti et al. (2008) identificaram uma forte relação entre o parasitismo no linfonodo e na pele. No entanto, apesar dessa correlação, apenas o parasitismo na pele estava associado a maior gravidade de sinais clínicos na LVC. Ao avaliar a pele de 20 cães com resultado positivo para PCR, Solano-Galego et al. (2004) constataram que seis cães não apresentaram amastigotas no tecido, cinco animais apresentaram baixa carga parasitária, cinco cães tinham carga parasitária moderada e três cães apresentavam alta carga parasitária.

Com relação à carga parasitária nos diferentes estádios da doença, considerando o tipo de órgão, observou-se que, na pele de orelha, o estágio I apresentou a maior frequência de amostras negativas (90%) e nenhuma amostra com alta carga parasitária. Já o estágio II teve cerca de metade das amostras negativas, mas aproximadamente 10% apresentaram média carga parasitária e quase 10% apresentaram alta carga parasitária. O estágio III apresentou a menor frequência de amostras negativas e a maior frequência de carga alta (28,6%). Corroborando com os achados deste estudo, Giunchetti et al. (2006) constataram, ao realizar o teste de IHQ anti-*Leishmania*, que a porcentagem de animais com carga parasitária alta na pele era maior no grupo "sintomático" do que no grupo "assintomático". Além disso, estes autores também encontraram uma maior frequência de amostras negativas no grupo assintomático, além de não ter encontrado amostras com carga parasitária alta neste grupo. No grupo de cães oligossintomáticos, foi encontrado uma porcentagem de cães com carga baixa e alta semelhante às relatadas neste trabalho. No grupo sintomático, assim neste estudo, observaram a maior frequência de carga alta (Giunchetti et al., 2006).

No estudo de Solano-galego et al. (2004), ao examinarem a pele de 20 cães PCR positivos por meio de IHQ, foi observado que no grupo assintomático não foram encontrados amastigotas de *Leishmania*. Em contraste, em 14 dos 20 cães sintomáticos, foi constatada a presença de *Leishmania* na pele. No entanto, Xavier et al. (2006) não encontraram correlação entre o estado clínico do animal e o resultado da IHQ.

No linfonodo, o estágio que teve a maior ocorrência de resultados negativos foi o com menor comprometimento clínico (estádio I), e nenhuma das amostras apresentaram carga parasitária alta. No estágio II, quase metade das amostras foram negativas e, entre as amostras positivas, a carga parasitária mais comum foi a baixa. Em relação ao estágio III, observaram-se as maiores frequências de carga parasitária média e alta. Em geral, foi encontrada diferença significativa entre os estádios I e III, com o estágio III apresentando uma média de carga parasitária mais alta em relação ao estágio I.

Resultados semelhantes foram encontrados por Giunchetti et al. (2008), em que foi observado que o grupo sintomático tinha uma frequência menor de resultados negativos na Imuno-histoquímica em comparação com os grupos assintomático e oligossintomático.

No baço, no estágio I, 85% das amostras foram negativas, enquanto o restante mostrou uma carga parasitária de 5% para cada grau (baixa, média e alta carga parasitária). Já no estágio II, mais da metade das amostras foram negativas e nenhuma delas apresentou uma carga parasitária alta. No que diz respeito ao estágio III, no baço, foi o estágio com a menor porcentagem de amostras negativas (15,4%) e a maior frequência de carga parasitária alta, sendo significativamente diferente do estágio I.

Embora a análise do fígado não tenha sido realizada, é importante destacar que Giunchetti et al. (2008), observaram, por meio de IHQ, que a frequência de parasitismo hepático no grupo sintomático foi maior do que no grupo assintomático, sugerindo uma possível relação entre a intensidade do parasitismo hepático e a evolução das manifestações clínicas da LVC. Xavier et al. (2006) realizaram uma análise da sensibilidade da IHQ em relação a outras metodologias, constatando que a IHQ apresentou sensibilidade de 62,1%, a PCR de 82,8% e os exames histopatológicos (HE) de 44,8%. Estes dados reforçam que a PCR foi mais eficaz que a IHQ, enquanto a IHQ se mostrou superior aos exames histopatológicos. É importante ressaltar que houve uma concordância significativa entre a PCR e a IHQ, o que sugere que a IHQ pode ser utilizada como um método alternativo. Toplu e Aydogan (2011) também relacionaram outras técnicas, como o exame histológico e citológico, com a IHQ, concluindo que a Imuno-histoquímica foi a técnica mais sensível e específica.

No presente estudo foi avaliado também a comparação dos estádios clínicos considerando a quantificação da carga parasitária encontrada nos órgãos dos cães através da qPCR. A seleção dos órgãos para a quantificação de *L. infantum* foi baseada no tropismo do parasito para órgãos linfoides, como medula óssea, linfonodos e baço, tornando-os importantes

para a detecção desse protozoário. Além disso, considerou-se ainda o primeiro sítio de contato da *Leishmania* pelos flebotomíneos, a pele. Do ponto de vista epidemiológico, já foi descrito nas regiões endêmicas para LVC que há uma grande população de cães assintomáticos, e que apesar de não demonstrarem clinicamente a presença da doença, apresentam-se parasitados, possibilitando a manutenção do ciclo de transmissão (SOLANO-GALLEGO et al., 2009, 2011).

A análise da carga parasitária (CP) em diferentes órgãos, considerando todos os cães infectados por *L. infantum*, revelou diferenças apenas entre a pele da orelha e a medula óssea. Nos demais órgãos, não foram observadas diferenças estatísticas. Ferreira et al. (2012) investigaram a CP por qPCR em amostras de esfregaço conjuntival, medula óssea e pele. As cargas parasitárias nos esfregaços conjuntivais e na medula óssea não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Entretanto, a carga parasitária na pele foi estatisticamente superior às obtidas em outras amostras clínicas, o que confirma os resultados do presente estudo, onde a CP da pele foi maior que a da medula. Apesar dos esfregaços conjuntivais exibirem baixa carga parasitária, eles foram semelhantes às cargas da medula óssea, sugerindo sua utilidade como recurso auxiliar para o diagnóstico molecular da LVC devido à obtenção não invasiva. Ramos et al. (2013) não encontraram diferenças entre as CP da medula, linfonodo e baço, alinhando-se com os dados deste estudo, no qual nenhum destes três órgãos apresentou diferenças estatísticas. Em contraste, Reis et al. (2013) identificaram uma carga maior no baço do que na pele, o que difere deste estudo, que não demonstrou diferença entre as amostras destes órgãos. Em um estudo realizado por Aschar et al. (2016), avaliando esfregaço oral e conjuntival, sangue e linfonodo, tiveram como resultado uma maior CP encontrada no linfonodo, seguido pelo esfregaço oral, que foi semelhante ao conjuntival e menor CP no sangue periférico. Caldas et al. (2020), avaliando a CP da medula, linfonodo e esfregaço conjuntival, também não encontraram diferença entre a CP do linfonodo e da medula óssea, mas o esfregaço conjuntival obteve uma CP inferior, especialmente quando comparado ao linfonodo. Em um estudo conduzido por Chagas et al. (2021), a CP foi maior na pele em relação aos demais tecidos, enquanto o linfonodo poplíteo apresentou uma carga semelhante à da medula óssea, corroborando com os resultados do presente estudo e com os encontrados por Ramos et al. (2013).

Ao se avaliar a carga parasitária em diferentes grupos clínicos na LVC, Ramos et al. (2013) observaram correlação positiva entre cães sintomáticos e as cargas parasitárias. De forma semelhante, Ferreira et al. (2012) verificaram que cães com sinais clínicos da LVC

exibiram cargas parasitárias aumentadas em esfregaços conjuntivais e medula óssea em comparação com cães assintomáticos. Estes achados corroboram com os dados obtidos neste estudo, demonstrando de forma geral que cães com maior comprometimento clínico possuíram carga parasitária maior que cães assintomáticos, ou com sinais clínicos mais discretos.

Aschar et al. (2016) estratificaram os cães em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos e verificaram que em ambos os tecidos (pele e baço) a CP aumentou com a progressão da doença. Aschar et al. (2016) observaram que em cães assintomáticos o esfregaço conjuntival e oral não demonstrou bom desempenho em comparação com o grupo sintomático. O sangue apresentou resultados equivalentes entre cães assintomáticos e sintomáticos, porém com baixa CP. Já o linfonodo teve a maior positividade, mas também foi mais alta na população sintomática em comparação com a população assintomáticas, o que corrobora com os achados deste estudo. Caldas et al. (2020) não observaram diferenças na carga parasitária entre cães assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos, em diferentes órgãos, corroborando aos achados de Borja et al. (2016), que não identificaram diferenças significativas na CP em relação às manifestações clínicas de LVC. Estes dados também são semelhantes aos de Quaresma et al. (2009), em que não foi encontrada diferença entre cães sintomáticos e assintomáticos com a relação a CP de diferentes órgãos alvo do parasitismo na LVC.

Estes estudos não corroboram com os achados do presente estudo, em que em todos os órgãos apresentaram maior intensidade do parasitismo em pelo menos o estágio III (cães com manifestação de sinais clínicos mais graves) e o estágio I (cães sem sinais clínicos ou com sinais mais discretos). Chagas et al. (2021) dividiram os cães com LV em três grupos por escore clínico, semelhante ao este estudo, sendo: grupo 1 (sem manifestações clínicas); grupo 2, (manifestações clínicas moderadas); e grupo 3 (manifestações clínicas intensas). Estes autores relataram que o grupo 3 apresentaram maior carga parasitária em diferentes amostras (pele, linfonodo, medula óssea, esfregaço conjuntival) quando comparados aos animais dos grupos 1 e 2. De fato, estes dados corroboram os achados deste estudo, pois na pele de orelha e medula óssea o estadiamento III apresentou maiores CP em relação aos estadiamentos I e II. No entanto, no linfonodo poplíteo e no baço, o estadiamento III apresentou resultados semelhantes da CP com o estadiamento II. De forma interessante, o presente estudo demonstrou em todos os órgãos avaliados que o estágio III apresentou maior CP em relação ao estágio I. Estudos que buscam analisar a carga parasitária em cães em diversas amostras biológicas e sob distintas formas clínicas podem evidenciar algumas limitações. Essas restrições decorrem da extensa

diversidade de carga parasitária entre os animais, o que gera dados consideravelmente heterogêneos. Esta observação foi constatada neste estudo, dado que foi identificado uma considerável variabilidade nas cargas parasitárias, mesmo quando os animais pertenciam ao mesmo grupo clínico.

Outro biomarcador utilizado incluiu os parâmetros hematológicos. Muitas doenças são inicialmente evidenciadas por uma anormalidade detectada no sangue periférico. Portanto, o conhecimento das alterações hematológicas causadas pela infecção por *Leishmania* pode auxiliar no seu diagnóstico (LOPES et al., 2018). As alterações hematológicas na LVC são consideradas inespecíficas (PALTRINIERI et al., 2016). No entanto, estudos que investigam o perfil hematológico e imunológico em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, com diferentes perfis clínicos, são fundamentais para avaliar biomarcadores relacionados à patogênese e prognóstico da LVC (REIS et al., 2009). Os principais achados na literatura em relação ao hemograma incluem anemia normocítica e normocrômica (CORTESE et al., 2009; DA COSTA-VAL et al., 2007; FREITAS et al., 2012; KIRAL F. KARGIN et al., 2004; NICOLATO et al., 2013; REIS et al., 2006, 2009b). No presente estudo, foi observado anemia em cães em estágio clínico mais avançado, especificamente no estágio III, apresentando níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito abaixo dos valores de referência. A anemia no estágio III foi normocítica, com valores de volume corpuscular médio (VCM) dentro da faixa de referência em todos os estágios, mas hipocrômica, evidenciada pelos valores de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) abaixo dos valores de referência, intensificando-se com a gravidade da doença. Esses achados corroboram com estudos anteriores de Reis et al. (2006a) e Almeida et al. (2014), os quais verificaram que cães sintomáticos apresentaram anemia grave com diminuição proeminente no número de glóbulos vermelhos, hemoglobina e hematócrito em comparação com cães assintomáticos e oligossintomáticos. Ribeiro et al. (2013) verificaram uma associação significativa entre anemia e a presença de sinais clínicos. Nicolato et al. (2013) também associaram a anemia com as alterações na hematopoese e parâmetros hematológicos, principalmente em cães sintomáticos, enquanto cães assintomáticos ou não infectados mantiveram valores normais de contagem, tanto na medula óssea quanto no sangue periférico, corroborando com achados deste estudo. É provável que mais de um fator esteja envolvido na etiologia da anemia, como hemorragia, hemólise, insuficiência renal crônica, hipoplasia ou aplasia da medula óssea e diminuição da fluidez lipídica da membrana eritrocitária (DE LUNA et al., 2000; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; RIBEIRO et al., 2018).

Embora alterações quantitativas ou qualitativas nas populações de leucócitos sejam menos comuns (PALTRINIERI et al., 2016), alguns estudos indicaram que cães sintomáticos podem manifestar diminuição pronunciada nas populações de leucócitos (leucopenia), associada à eosinofilia, monocitopenia e linfopenia destacada (COURA-VITAL et al., 2011; DE ALMEIDA LEAL et al., 2014; LOPES et al., 2018; REIS et al., 2006a). Neutrofilia, causada por uma resposta inflamatória sistêmica, também pode estar presente, sendo especialmente proeminente em casos com lesões cutâneas ulcerativas e infecção bacteriana secundária (KIRAL et al., 2004; NICOLATO et al., 2013). Entretanto, ao analisar os achados deste estudo no leucograma, foi observado que nenhum dos parâmetros (leucócitos totais, linfócitos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos segmentados) apresentaram desvio dos valores de referência, e não houve diferença estatística entre os estádios em cada um dos parâmetros avaliados. Esses resultados são consistentes com os achados de Nicolato et al. (2013), que não encontraram diferenças significativas em relação aos leucócitos, granulócitos e neutrófilos. da Costa-Val et al. (2007) também não observaram uma correlação entre os valores leucocitários e os sinais clínicos na LVC, exceto para linfócitos em cães assintomáticos em comparação com outros grupos. Ulchar et al. (2015) não encontraram nenhuma alteração no leucograma que poderia ser um indicador relevante para o grau de progressão clínica em cães sintomáticos e assintomáticos soropositivos para *L. infantum*, corroborando aos achados deste estudo.

No que diz respeito a contagem das plaquetas, observou-se que todos os estádios apresentaram contagens significativamente abaixo dos valores de referência, mas não houve diferença estatística entre eles. Esse padrão contrasta com outros estudos nos quais a trombocitopenia foi observada entre os animais (ALVAR et al., 1994; CIARAMELLA et al., 1997). Em um estudo conduzido por Lopes et al. (2018), foram observadas contagens significativamente menores de plaquetas em cães clinicamente afetados em comparação com animais controles e subclínicos.

Segundo Paltrinieri et al. (2016), a trombocitopenia leve a moderada é bastante frequente em cães com LVC e sem infecções concomitantes. Casos com trombocitopenia acentuada ocorrem quando há coinfeção com outros patógenos transmitidos por vetores (por exemplo, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* ou *A. platys*). O mecanismo mais provável responsável pela trombocitopenia na LVC é uma destruição periférica imunomediada de plaquetas circulantes, pois foram demonstrados anticorpos anti-plaquetas em cães infectados (CORTESE et al., 2009; TERRAZZANO et al., 2006).

Os parâmetros bioquímicos podem ser utilizados para avaliar o estado geral de saúde na LVC. A disproteinemia é considerada uma das alterações mais importantes da LVC (RIBEIRO et al., 2013). O desequilíbrio proteico é representado pelo aumento das proteínas séricas totais (hiperproteinemia), hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, o que também resulta na inversão da relação albumina/globulina.

Neste estudo, foi confirmada a presença de hiperproteinemia, com níveis de proteínas totais acima dos valores de referência, sem diferença entre os estádios clínicos, corroborando com (Ribeiro et al. (2013) e Andrade et al. (2014), que observaram que em todas as formas clínicas os valores de proteínas séricas totais estavam acima dos valores de referência. Alves et al. (2013) e Freitas et al. (2012) também observaram um aumento significativo da hiperproteinemia em comparação com os cães controle.

Quando analisados os valores de globulina, observou-se que os valores foram superiores ao IR, mas não houve diferença entre os grupos em cada fase, apresentando assim hiperglobulinemia. Giunchetti et al. (2008) verificaram que os níveis de globulina plasmática foram maiores nos grupos sintomáticos e oligossintomáticos em comparação com o grupo não infectado. Além disso, a globulina plasmática aumentou significativamente no grupo sintomático em comparação com o grupo assintomático. Alves et al. (2013) e Freitas et al. (2012) também observaram hiperglobulinemia em relação ao controle. Andrade et al. (2014) e Ulchar et al. (2015) constataram que os valores de globulina foram superiores aos valores de referência.

Todos os valores da albumina observados neste estudo encontraram-se dentro dos IR. Possivelmente, devido a heterogeneidade dos dados nos grupos dos estádios II e III, não foi possível identificar valores abaixo dos níveis de referência, porém, o estágio III apresentou valores menores em relação ao estágio I. Os valores da albumina apresentaram uma tendência de queda com a gravidade dos sinais clínicos. Diversos estudos apontam que a hipoalbuminemia é um problema regular na LVC (ALMEIDA et al., 2003; ALVES et al., 2013; AMUSATEGUI et al., 2003; DE CASTRO et al., 2004; FREITAS et al., 2012; LOPES et al., 2018; REIS et al., 2006a; ULCHAR et al., 2015). de Castro et al. (2012) verificaram que o valor médio da albumina variou entre os grupos analisados, sendo que nos cães sintomáticos manteve-se com níveis abaixo dos demais, corroborando com os achados deste estudo em que o estágio III apresentou valores menores em relação ao estágio I.

A razão albumina/globulina (A/G) não apresentou diferença entre os estádios, apesar de

haver tendência de queda com o agravamento dos sinais clínicos. A razão A/G ficou abaixo do IR nos estádios clínicos II e III. Lopez et al. (2018) descobriram que cães com sinais subclínicos e clínicos apresentavam proporções A/G significativamente mais baixas do que cães controle. Alguns pesquisadores descreveram que uma diminuição na relação A/G está significativamente associada ao agravamento clínico na LVC (AMUSATEGUI et al., 2003; DE CASTRO et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2008; HEIDARPOUR et al., 2012; LOPES et al., 2018; REIS et al., 2006b; RIBEIRO et al., 2013). Giunchetti et al. (2008) observaram uma diminuição significativa na relação A/G nos grupos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos em comparação com o grupo não infectado. Além disso, a relação A/G foi menor no grupo sintomático do que no grupo assintomático, achado muito semelhante ao encontrado neste estudo.

Os testes de função hepática e renal evidenciaram valores de ureia dentro da faixa do IR e sem diferenças entre os estádios clínicos. López et al. (2018) relataram que cães do grupo “clínico” apresentavam concentrações de ureia significativamente mais baixas do que o grupo “subclínico”. Neste estudo os autores relataram que embora os valores de ureia fossem inferiores aos do grupo subclínico, ainda eram considerados normais em comparação com a literatura, corroborando com os dados do presente estudo, em que todos os grupos se encontraram dentro dos IR. Ribeiro et al. (2013) descreveram valores de ureia acima dos IR para todos os grupos clínicos (assintomático, oligossintomático e sintomático). Valores mais elevados de ureia podem ser esperados em cães em estádios tardios de LVC grave, especialmente naqueles com alterações anatomopatológicas graves que apresentam insuficiência renal crônica (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; ULCHAR et al., 2015).

Em relação a creatinina, os valores encontrados neste estudo permaneceram dentro dos IR, sem haver diferenças entre os estádios. Corroborando a estes achados, Ribeiro et al. (2013) não encontraram alterações nos valores de creatinina em todos os diferentes grupos (assintomático, oligossintomático e sintomático). Já Lopes et al. (2018) observaram que cães “clínicos” apresentam concentrações significativamente menores de creatinina em comparação com animais “subclínicos” e “controles”. Entretanto, os valores de creatinina apresentaram-se dentro dos resultados de referência de cães normais, semelhante aos nossos achados. Heidarpour et al. (2012) verificaram que a concentração de creatinina aumentou significativamente com o aumento da gravidade dos sinais clínicos. Ulchar et al. (2015) também constataram que cães sintomáticos apresentavam níveis de creatinina mais elevados em

comparação com cães assintomáticos.

A Fosfatase Alcalina (FA) também apresentou resultados dentro dos IR conforme descrito neste estudo, e não foi observada diferença entre os três estádios. Esses achados estão em concordância com os resultados obtidos por Heidarpour et al. (2012), Castro et al. (2012) e Ribeiro et al. (2013). Ciaramella et al. (1997) identificaram atividades moderadamente elevadas da enzima hepática fosfatase alcalina em apenas 16% dos cães em seu estudo. Por outro lado, o estudo conduzido por Ari; Bildik; Ertug (2017) observaram que os níveis de FA foram mais altos nos cães soropositivos do que nos cães soronegativos. Andrade et al. (2014) constataram que, em cães infectados por *L. infantum*, os níveis de FA foram superiores aos valores de referência. Lopes et al. (2018) encontraram um aumento significativo na atividade da FA em cães de ambos os grupos clínicos (subclínicos e clínicos) em comparação com os animais controle.

Em relação a enzima Alanina Aminotransferase (ALT), foi observado neste estudo que os valores estavam dentro do intervalo de referência. No entanto, foi identificada uma diferença entre os grupos do estágio III em comparação com os grupos I e II, exibindo níveis mais elevados de ALT. De maneira semelhante aos resultados deste estudo, Kiral et al. (2004) observou elevações moderadas, embora não significativas, nas atividades séricas de ALT, mantendo-se dentro dos IR em cães com LVC. Ribeiro et al. (2013) não encontraram valores médios para ALT fora dos IR, e tampouco observaram diferenças entre os grupos avaliados. Em contraste, Heidarpour et al. (2012) identificaram um aumento significativo na atividade de ALT em cães do grupo assintomático em comparação com o controle, enquanto o grupo sintomático apresentou um aumento significativo em relação ao assintomático e ao controle. Por outro lado, Lopes et al. (2018) observaram reduções significativas na ALT em cães clinicamente afetados em comparação com animais controles e subclínicos. No entanto, assim como em aos achados do presente estudo, os valores de ALT se mantiveram dentro dos resultados de referência para cães normais.

No que diz respeito a outro parâmetro enzimático, a Aspartato Aminotransferase (AST), foi descrito neste estudo que os valores dos estádios I e II permaneceram dentro do IR, enquanto o grupo do estágio III permaneceu acima do IR, sem haver diferença entre os grupos. Esses resultados podem ser atribuídos ao alto desvio padrão ou ao alto coeficiente de variação (CV), indicando heterogeneidade no grupo. Vários estudos, incluindo este trabalho, não relataram valores para AST fora do IR e nem diferença entre os grupos clínicos (HEIDARPOUR et al.,

2012; KIRAL et al., 2004; LOPES et al., 2018; RIBEIRO et al., 2013).

Em relação à enzima Gama Glutamil Transferase (GGT), todos os valores permaneceram dentro do intervalo de referência (IR), e, novamente, não foi observada diferença entre os três estádios clínicos avaliados. Poucos estudos abordam a GGT, e, assim como em nossa pesquisa, também não relataram alterações na GGT entre os grupos clínicos, com os valores médios dentro dos limites normais (HEIDARPOUR et al., 2012; KIRAL et al., 2004).

As alterações hematológicas e bioquímicas, tais como anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia, e elevações de ALT, AST e FA, identificadas na LVC, também podem ser presentes em pelo menos uma das infecções por hemoparasitos, como *Anaplasma*, *Ehrlichia* e *Babesia* (ALBERNAZ et al., 2007; DE HOLANDA et al., 2019; HARRUS et al., 1999; SASANELLI et al., 2009; SILVEIRA et al., 2015), ou em coinfeções dessas doenças (Otranto et al., 2009; Sasanelli et al., 2009). Dessa forma, a existência de coinfeções pode ter influenciado nos marcadores analisados, uma vez que os animais analisados eram provenientes da área endêmica. Importante ressaltar que uma das principais limitações deste estudo é a falta de informações sobre coinfeções por *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, sendo necessário interpretar os resultados com cautela.

A análise da resposta imunológica com base no perfil das populações de células imunológicas no sangue periférico e de citocinas relacionado à resistência ou susceptibilidade em cães com LVC desempenha um papel relevante no monitoramento clínico da progressão da doença (DE ALMEIDA LEAL et al., 2014; GIUNCHETTI et al., 2019; REIS et al., 2010b). A citometria de fluxo é a metodologia atualmente empregada para explorar novas associações de biomarcadores com resistência ou susceptibilidade de doenças com foco na resposta imune (DE ALMEIDA LEAL et al., 2014; GIUNCHETTI et al., 2019; REIS et al., 2009b, 2010). Assim, foi analisado o perfil das populações de células descritas na literatura como sendo de maior importância na resposta imunológica à LVC, tais como linfócitos T CD5⁺CD4⁺, T CD5⁺CD8⁺, linfócitos B CD21⁺ e monócitos CD14⁺ (DE ALMEIDA LEAL et al., 2014; GIUNCHETTI et al., 2019; LEITE et al., 2023; REIS et al., 2009b, 2010).

Com relação aos linfócitos T, especialmente as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, observou-se que não houve diferença no marcador CD4⁺ entre os estádios clínicos. Provavelmente isto ocorreu devido à heterogeneidade dos dados obtidos, resultando em um desvio padrão elevado nos estádios II e III, apesar de uma tendência de queda de CD4⁺ ter sido

observada nestes estádios clínicos. Em relação a subpopulação de linfócitos T CD8⁺, foi encontrada diferença entre o estágio III e I, com valores menores no estágio III. Aumento nos níveis e estimulação dos linfócitos T, especialmente das subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8, associada a predominância de citocinas inflamatórias como IFN- γ , IL-2, IL-12 e TNF- α , têm sido associados a um perfil de resistência à LVC (GIUNCHETTI et al., 2019; GONÇALVES et al., 2019; LEITE et al., 2023). Reis et al. (2006b) observaram que as contagens de células T CD4⁺ eram mais altas nos cães assintomáticos quando comparados aos cães sintomáticos. Por outro lado, foram documentados valores elevados de células CD8⁺ em cães assintomáticos e oligossintomáticos em comparação com os controles e os sintomáticos. Resultados semelhantes foram demonstrados em cães com alto parasitismo, mostrando números mais baixos de células T e nas subpopulações de células T (CD4⁺ e CD8⁺) (REIS et al., 2009b, 2010). Coura-Vital et al. (2011) encontraram altas frequências de linfócitos T CD4⁺ tanto no grupo de cães assintomáticos I (sorologia negativa e resultados moleculares positivos) quanto no assintomáticos II (com sorologia positiva e resultados moleculares positivos) quando comparados ao grupo de controle. Por outro lado, os níveis de células T CD8⁺ foram maiores apenas no grupo assintomático II em comparação com o grupo controle. De Almeida Leal et al. (2014) também constataram que os animais do grupo assintomático II e sintomático apresentaram valores absolutos significativamente menores de linfócitos T e suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺) em relação aos grupos controle e assintomático I, além de observarem uma correlação negativa com o estado clínico.

Alguns pesquisadores associaram o nível de células T CD8⁺ com a proteção durante a LVC assintomática em cães com baixo parasitismo tecidual e/ou em cães vacinados com LBSap (-VITAL et al., 2011; GIUNCHETTI et al., 2007; GUERRA et al., 2009; PINELLI et al., 1994; REIS et al., 2006b). de Almeida Leal et al. (2014) também indicou que as células T CD8⁺ atuam na resposta imunológica por mecanismos citotóxicos, contribuindo para a proteção durante a fase inicial das infecções.

Já (REIS et al., 2009b) sugeriram que a presença contínua de células T (tanto CD4⁺ quanto CD8⁺) nos grupos assintomáticos e com baixo parasitismo pode ser resultado da intensa atividade do sistema imunológico do hospedeiro que realiza a apresentação de antígenos e elimina parasitos dos locais afetados. Níveis elevados de linfócitos T CD8⁺ parecem ser a principal característica fenotípica da doença assintomática (REIS et al., 2009b). Além disso, de Almeida Leal et al. (2014) também mencionaram que as células T CD8⁺ exercem o papel de

mediadoras na resposta imunológica por meio de mecanismos citotóxicos que auxiliam na proteção durante a fase inicial das infecções.

Neste estudo, também foi avaliado o perfil celular dos linfócitos B (CD21⁺), observando diferença nos valores entre os estádios III e II em comparação com o estágio I. Os estádios II e III apresentaram valores mais baixos em comparação ao I. Esses resultados são consistentes com outros estudos (COURA-VITAL et al., 2011; DE ALMEIDA LEAL et al., 2014; REIS et al., 2006b, 2009b, 2010). Além disso, Reis et al. (2006b) relataram números absolutos mais baixos em cães sintomáticos em relação aos grupos controle e assintomático. Resultados semelhantes foram encontrados em cães com alto parasitismo, mostrando contagens mais baixas de células B CD21⁺ (REIS et al., 2009b, 2010). Por outro lado, Coura-Vital et al. (2011) verificaram um aumento nos linfócitos B CD21⁺ do grupo de cães assintomáticos II, mas uma diminuição nos cães sintomáticos. No estudo conduzido por de Almeida et al. (2014), foi observado que os cães dos grupos assintomático II e sintomático apresentaram uma redução nas contagens de linfócitos B (CD21⁺) em comparação ao grupo assintomático I e ao grupo controle. Além disso, os pesquisadores também identificaram uma correlação negativa entre o número de linfócitos B e os grupos clínicos. Outros estudos relataram resultados semelhantes, principalmente em cães sintomáticos, o que sugere que a diminuição dos linfócitos B CD21⁺ pode ser um marcador de susceptibilidade e/ou de grave infecção por LVC (BOURDOISEAU; MARCHAL; MAGNOL, 1997; COURA-VITAL et al., 2011). Alguns autores sugerem que, em relação à progressão natural da LVC, a redução dos linfócitos B CD21⁺ pode estar relacionada ao aumento da carga parasitária na medula óssea e à gravidade dos sinais clínicos desta doença (AGUIAR-SOARES et al., 2020; REIS et al., 2006a).

Em relação aos monócitos (CD14⁺), foi observado, no presente estudo, uma diminuição nos valores no estágio III em comparação aos estádios I e II. Resultados semelhantes foram encontrados por Coura-Vital et al. (2011), nos quais foi constatado que o grupo assintomático I e o grupo controle apresentaram uma frequência maior de monócitos CD14⁺ em comparação ao grupo assintomático II e sintomático. Isso indica que quantidades mais altas de monócitos CD14⁺ no grupo assintomático I podem ter um papel significativo no controle da carga parasitária nos tecidos e no desenvolvimento de mecanismos de resistência durante a LVC.

Outros estudos também revelaram que grupos sintomáticos mostraram uma diminuição nos monócitos CD14⁺ circulantes (GIUNCHETTI et al., 2006; REIS et al., 2006b). Resultados parecidos foram observados em cães com alto nível de parasitos, os quais apresentaram uma

redução nas contagens de monócitos CD14⁺ (REIS et al., 2006b, 2009, 2010). Essa observação sugere que contagens mais elevadas de monócitos CD14⁺ no grupo assintomático I podem desempenhar um papel importante no controle da carga parasitária e na criação de mecanismos de resistência durante o desenvolvimento da LVC. No entanto, de Almeida Leal et al. (2014) não identificaram diferenças significativas nos monócitos CD14⁺ ao comparar todos os grupos. Contudo, uma correlação negativa foi encontrada entre o número de monócitos e os grupos clínicos.

7 CONCLUSÕES

Diante da análise abrangente dos biomarcadores em relação à carga parasitária (CP) de *Leishmania infantum* nos flebotomíneos alimentados em cães naturalmente infectados, pode-se concluir que:

(i) A correlação positiva na pele, linfonodo e medula entre a CP nos tecidos e a CP nos flebotomíneos destaca a importância desses órgãos na manutenção e possível transmissão da infecção.

(ii) Os parâmetros hematológicos, especialmente os eritrócitos, e os marcadores celulares, como os linfócitos T CD8⁺, revelaram correlações significativas com a CP nos flebotomíneos.

(iii) O estadiamento clínico elaborado nesse trabalho revelou-se uma ferramenta útil para indicar alto risco dos cães com maior agravamento clínico em infectarem flebotomíneos com alta carga parasitária de *L. infantum*.

REFERÊNCIAS

AGUIAR-SOARES, R. D. DE O. et al. Phase i and ii clinical trial comparing the lbsap, leishmune®, and leish-tec® vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Vaccines*, v. 8, n. 4, p. 1–17, 1 dez. 2020.

ALBERNAZ, A. P. et al. Canine ehrlichiosis in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil / Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 799-806, 2007.

ALMEIDA, B. F. M. et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 196, n. 1–2, p. 6–12, 1 set. 2013.

ALMEIDA, M. A. O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, v. 127, n. 3–4, p. 227–232, fev. 2005.

ALVAR, B. J. et al. Canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 88, n. 4, p. 371–378, 1994.

ALVES, G. B. B. et al. Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães infectados por *Leishmania (Infantum) chagasi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 55, n. 2, p. 105–112, mar. 2013.

AMUSATEGUI, I. et al. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. 2003.

ANDRADE BARATA, R. et al. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, an Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004.

ANDRADE BARATA, R. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2005.

ANDRADE BARATA, R. et al. Comunicação/Communication *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(3):386-388, mai-jun, 2011

ANDRADE, G. B. et al. Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, v. 23, n. 4, p. 509–515, 1 out. 2014.

ARI, M.; BILDIK, A.; ERTUG, S. Investigation of the bone metabolism in dogs with leishmaniasis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 20, n. 2, p. 411–415, 1 mar. 2017.

ASCHAR, M. et al. Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, v. 225, p. 108–113, 30 jul. 2016.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, v. 14, n. 5, p. 523–532, set. 1996.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, jul. 2008.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 69, n. 3, p. 89–95, mar. 2001.

BODAGHI, A.; FATTAHI, N.; RAMAZANI, A. Biomarkers: Promising and valuable tools towards diagnosis, prognosis and treatment of Covid-19 and other diseases. *Heliyon*, v. 9, n. 2, p. e13323, fev. 2023.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 1, p. 121–134, jan. 1998.

BORJA, L. S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Veterinary Parasitology*, v. 229, p. 110–117, 2016.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.-P. Immunohistochemical Detection of *Leishmania Infantum* in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections of Canine Skin and Lymph Nodes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 9, n. 4, p. 439–440, 25 out. 1997.

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

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomy: Biology of Neotropical Phlebotomine Sand Flies. Em: *Brazilian Sand Flies*. Cham: Springer International Publishing, p. 299–318. 2018.

BRODSKYN, C. I.; KAMHAWI, S. Biomarkers for Zoonotic Visceral Leishmaniasis in Latin America. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* Frontiers Media S.A., 26 jul. 2018.

CALDAS, S. et al. Visceral leishmaniasis: a practical strategy for quantitative molecular diagnosis in naturally infected dogs. *Parasitology Research*, v. 119, n. 5, p. 1683–1690, 1 maio 2020.

CALIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, v. 243, n. 3, p. 213–221, 6 fev. 2018.

CARNEIRO BORGES, V. et al. Intradermorreação de Montenegro após sucessivas repetições do teste em Porteirinha, MG *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002.

CHAGAS, Ú. M. R. et al. Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, v. 291, p. 109368, mar. 2021.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, nov. 2007.

CHEN, T. K.; KNICELY, D. H.; GRAMS, M. E. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management. *JAMA*, v. 322, n. 13, p. 1294, 1 out. 2019.

CIARAMELLA, P. et al. Papers and Articles A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. 1997. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/>>.

CORTESE, L. et al. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, v. 164, n. 25, p. 778–782, 20 jun. 2009.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Revista de Saúde Pública*, v. 24, n. 5, p. 361–372, out. 1990.

COURA-VITAL, W. et al. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. *Veterinary Journal*, v. 190, n. 2, nov. 2011.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 186, n. 9, p. 1314–1320, nov. 2002.

COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin

Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 1, p. e2583, 9 jan. 2014.

DA COSTA-VAL, A. P. et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *Veterinary Journal*, v. 174, n. 3, p. 636–643, nov. 2007.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 10 nov. 2007.

DAY, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. *Veterinary Parasitology*, v. 147, n. 1–2, p. 2–8, jun. 2007.

DE ALMEIDA FERREIRA, S. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 4, abr. 2012.

DE ALMEIDA LEAL, G. G. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, v. 205, n. 3–4, p. 472–482, 2014.

DE CARVALHO, F. L. N. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiology and Infection*, v. 146, n. 5, p. 571–576, 26 abr. 2018.

DE CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: Clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*, v. 119, n. 1, p. 73–86, 5 jan. 2004.

DE HOLANDA, L. C. et al. Hematological observations in the blood and bone marrow of dogs naturally infected by *Ehrlichia* spp. And *Anaplasma* spp. *Ciencia Animal Brasileira*, v. 20, 2019.

DE LIMA RUY DIAS, A. F. et al. Monitoring of serum and urinary biomarkers during treatment of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary World*, v. 13, n. 8, p. 1620–1626, 1 ago. 2020.

DE LUNA, R. et al. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. *Journal of Comparative Pathology*, v. 122, n. 2–3, p. 213–216, 2000.

DE TOMMASI, A. S. et al. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 534, 2 dez. 2014.

DEANE LM. Leishmaniose visceral no brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do ceara. Tese (Livre Docência) São Paulo: Universidade de São Paulo, 1956.

LEISHVET. Guidelines for the Practical Management of Canine Visceral Leishmaniosis (CVL). [Documento PDF]. LeishVet. Disponível em: <https://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2018/09/PO-Guidelines.pdf>. Acesso em: 17 de setembro de 2023.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F. et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites and Vectors*, v. 12, n. 1, 8 fev. 2019.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, v. 5, n. 1, p. 276, 3 dez. 2012.

FERNANDES, C. B. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine*, v. 32, n. 11, p. 1287–1295, mar. 2014.

FERRO, C. et al. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 64, n. 3, p. 119–124, 1 mar. 2001.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. The Program for the Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil: The Effect of the Systematic Euthanasia of Seropositive Dogs as a Single Control Action in Porteirinha, a Brazilian City with an Intense Transmission of Visceral Leishmaniasis. *Pathogens*, v. 12, n. 8, p. 1060, 18 ago. 2023.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 137, n. 3–4, p. 214–221, abr. 2006.

FREITAS, J. C. C. DE et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 24–29, fev. 2012.

GANNAVARAM, S. et al. Biomarkers of safety and immune protection for genetically modified live attenuated *Leishmania* vaccines against visceral leishmaniasis - discovery and implications. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. MAY, 2014.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J. D. et al. Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Research in Veterinary Science*, v. 99, p. 204–207, abr. 2015.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Relationship between Canine Visceral Leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* Burden in Dermal Inflammatory Foci. *Journal of Comparative Pathology*, v. 135, n. 2–3, p. 100–107, ago. 2006.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, v. 25, n. 44, p. 7674–7686, 1 nov. 2007.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 121, n. 1–2, p. 23–33, 15 jan. 2008.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Veterinary Parasitology Elsevier B.V.* 1 jul. 2019.

GOMES, A. H. S. et al. *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v. 119, n. 3, p. 319–324, jul. 2008.

GONÇALVES, A. A. M. et al. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology Frontiers Media S.A.*, 18 dez. 2019.

GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Veterinary Parasitology*. 1987

GUARGA, J. L. et al. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop.*, v. 77, n. 2, p. 203–207, nov. 2000. DOI: 10.1016/s0001-706x(00)00141-8.

GUARGA, J. L. et al. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Research in Veterinary Science*, v. 69, n. 3, p. 249–253, dez. 2000b.

GUERRA, L. L. et al. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, v. 104, n. 3, p. 611–622, fev. 2009.

HARRUS, S. et al. MINIREVIEW Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1999.

HEIDARPOUR, M. et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. Parasitology Research, v. 111, n. 4, p. 1491–1496, out. 2012.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 103, n. 1–2, p. 77–81, jan. 2005.

KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. August 2008.

KIRAL, F. K. et al. Some Haematological, Biochemical and Electrophoretic Findings in Dogs with Visceral Leishmaniasis. Revue Méd. Vét., v. 155, n. 4, p. 226–229, 2004.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. Veterinary Pathology, v. 51, n. 2, p. 527–538, mar. 2014.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. [s.l.] ACADEMIC PRESS INC., 1987. v. I

LEITE, J. C. et al. Transmission-Blocking Vaccines for Canine Visceral Leishmaniasis: New Progress and Yet New Challenges. Vaccines, v. 11, n. 10, p. 1565, 5 out. 2023.

LM DEANE; G GRIMALDI. Leishmaniasis in Brazil. Amsterdam: Elsevier, p. 247–281, 1985.

LOPES, V. V. et al. IgG avidity index and complete blood count as biomarkers of clinical disease in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*. Veterinary Parasitology, v. 261, p. 96–103, 15 set. 2018.

LUKEŠ, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, n. 22, p. 9375–9380, 29 May 2007.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. Veterinary Parasitology, v. 223, p. 120–126, jun. 2016.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Veterinary Parasitology, 20 dez. 2008.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 4, p. 566–567, jul. 1988.

MARTINEZ-SUBIELA, S. et al. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 180, n. 3–4, p. 197–202, ago. 2011.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunological Reviews*, v. 201, n. 1, p. 206–224, 10 out. 2004.

MICHALSKY, É. M. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary Parasitology*, v. 147, n. 1–2, p. 67–76, 20 jun. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial. **Nota técnica nº 5/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS**: Trata-se da proposta de incorporação das coleiras impregnadas com inseticida (deltametrina a 4%) para o controle da leishmaniose visceral em municípios prioritários. Brasília, 6 p., 2021.

MIRÓ, G. et al. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasites and Vectors*, v. 4, n. 1, 2011.

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, n. 4, p. 491–493, jul. 1994.

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LOPEZ, V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Veterinary Sciences*, v. 9, n. 8, p. 387, 27 jul. 2022.

MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, v. 145, n. 3–4, p. 245–252, abr. 2007.

NICOLATO, R. D. C. et al. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, 23 fev. 2013.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 236, n. 11,

p. 1184–1191, 1 jun. 2010.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology* American Society for Veterinary Clinical Pathology, 1 dez. 2016.

PINELLI, E. et al. Brief Communication A canine CD8⁺ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania* in fan tum-infected macrophages. *Tissue Antigens*. 1994.

POZIO, E. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy) V. Further isolation of *Leishmania* from *Rattus rattus* in the Province of Grosseto. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 75, n. 4, p. 393–5, ago. 1981.

PRAJEETH, C. K. et al. *Leishmania*-Infected Macrophages Are Targets of NK Cell-Derived Cytokines but Not of NK Cell Cytotoxicity. *Infection and Immunity*, v. 79, n. 7, p. 2699–2708, jul. 2011.

PROVERBIO, D. et al. Relationship between *Leishmania* IFAT Titer and Clinicopathological Manifestations (Clinical Score) in Dogs. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–5, 2014.

QUARESMA, P. F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, v. 111, n. 3, p. 289–294, set. 2009.

RAMOS, Rafael Antônio Nascimento et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal*, v. 22, n. 3, p. 346-350, jul.-set. 2013.

RANASINGHE, S. et al. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n. 9, p. 875–882, set. 2008.

REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec[®] vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*, v. 34, n. 19, p. 2233–2239, abr. 2016.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, v. 81, n. 1, p. 68–75, ago. 2006a.

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by

Leishmania chagasi. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 146, n. 2, p. 303–311, 27 set. 2006b.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 15 mar. 2009.

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, jul. 2010.

REIS, L. E. S. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Veterinary Parasitology*, v. 197, n. 3–4, p. 498–503, 8 out. 2013.

RIBEIRO, R. R. et al. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 3, p. 373–378, set. 2013.

RIBEIRO, R. R. et al. *Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control*. BioMed Research International. Hindawi Limited, 2018.

ROATT, B. M. et al. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: Promising treatments for this neglected disease. *Frontiers in Immunology* Frontiers Research Foundation, 2014.

ROCHA, M. F. et al. Dogs with divergent serology for visceral Leishmaniasis as sources of leishmania infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies – an observational study in an endemic area in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 2, 1 fev. 2020.

SASANELLI, M. et al. Atypical clinical presentation of coinfection with *Ehrlichia*, *Babesia* and *Hepatozoon* species in a dog. *Veterinary Record*, v. 164, n. 1, p. 22–23, 3 jan. 2009.

SCORZA, B. M. et al. *Leishmania infantum* xenodiagnosis from vertically infected dogs reveals significant skin tropism. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 10, 1 out. 2021.

SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. *Leishmania infantum*. *Trends in Parasitology* Elsevier Ltd, 1 jan. 2020.

SILVEIRA, J. A. G. et al. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 6, n. 3, p. 242–245, 1 abr. 2015.

SILVESTRINI, P. et al. Iron status and C-reactive protein in canine leishmaniasis.

Journal of Small Animal Practice, v. 55, n. 2, p. 95–101, 27 fev. 2014.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. Journal of Comparative Pathology, v. 130, n. 1, p. 7–12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Veterinary Parasitology Elsevier, 28 out. 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasites and Vectors, 2011.

SOLCÀ, M. S. et al. Circulating Biomarkers of Immune Activation, Oxidative Stress and Inflammation Characterize Severe Canine Visceral Leishmaniasis. Scientific Reports, v. 6, 6 set. 2016.

STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-Mediated Innate Host Defense Against Protozoan Parasites Critical Reviews in Microbiology. 28 mar. 2002.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. Journal of Immunological Methods, v. 292, n. 1–2, p. 17–23, set. 2004.

TERRAZZANO, G. et al. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 110, n. 3–4, p. 331–337, 15 abr. 2006.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. Parasitology Research, v. 109, n. 4, p. 1051–1057, out. 2011.

TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J. J.; GARCÍA-MARTINEZ, J. D. Serum and urinary adiponectin in dogs with renal disease from leishmaniasis. Veterinary Record, v. 171, n. 12, p. 297–297, 22 set. 2012.

ULCHAR, I. et al. Hematological and biochemical parameters in symptomatic and asymptomatic leishmania-seropositive dogs. Macedonian Veterinary Review, v. 38, n. 2, p. 175–182, 2015.

VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. BMC Veterinary Research, v. 4, 2008.

WALTERS, L. L. *Leishmania* Differentiation in Natural and Unnatural Sand Fly Hosts

¹. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 40, n. 2, p. 196–206, mar. 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Covid-19: Weekly epidemiological update. [Documento PDF]. OMS. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364350/WER9745-575-590-eng-fre.pdf?sequence=1>. Acesso em: 02 de setembro de 2023.

XAVIER, S. C. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research*, v. 2, 8 jun. 2006.

ZIJLSTRA, E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3, n. 2, p. 87–98, fev. 2003.

ANEXO 1: CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 8/2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

COMPROVANTE

Comprovamos o recebimento da solicitação de uso de animais para o projeto intitulado "Avaliação de biomarcadores preditivos e de monitoramento da leishmaniose visceral em cães naturalmente infectados de municípios da região Norte de Minas Gerais.", protocolo do CEUA: 8/2022 sob a responsabilidade de Rodolfo Cordeiro Giunchetti que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino).

Belo Horizonte, 01/06/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2: TABELA DE SINAIS CLÍNICOS

Sinais clínicos, pontuação da gravidade e o peso atribuído para cada sinal clínico para a elaboração do estadiamento.

Sinais clínicos/cão	Gravidade dos sinais clínicos	Peso atribuído
Linfadenopatia poplíteo	0 - 5	5
Linfadenopatia pré-escapular	0 - 5	5
Linfadenopatia submandibular	0 - 5	5
Linfadenopatia generalizada	0 - 5	8
Emagrecimento	0 - 5	10
Palidez das mucosas	0 - 5	8
Vasculite de ponde de cauda	0 - 5	9
Vasculite ponta de orelha	0 - 5	9
Epistaxe	0 - 5	9
Dermatite Periocular	0 - 5	2
Dermatite na cauda	0 - 5	2
Ulceração na cauda	0 - 5	3
Dermatite na orelha	0 - 5	2
Ulceração na orelha	0 - 5	3
Dermatite no espelho nasal	0 - 5	2
Ulceração no espelho nasal	0 - 5	3
Dermatite nas patas	0 - 5	2
Ulceração nas patas	0 - 5	3
Dermatite nas regiões articulares	0 - 5	2
Ulceração nas regiões articulares	0 - 5	3
Dermatite mucocutânea	0 - 5	2
Ulceração mucocutânea	0 - 5	3
Furfurácea localizada	0 - 5	2
Furfurácea generalizada	0 - 5	6
Dermatite nodular	0 - 5	2
Dermatite papular	0 - 5	2
Dermatite pustular	0 - 5	2

Onicogribose	0 - 5	8
Blefarites	0 - 5	5
Conjuntivite	0 - 5	4
Ceratoconjuntivite comum	0 - 5	6
Ceratoconjuntivite seca	0 - 5	6
Uveíte	0 - 5	9
Lesão oral	0 - 5	8
Lesão genital	0 - 5	3
Atrofia no músculo masseter	0 - 5	7
Poliartrite	0 - 5	9
Edema de pata	0 - 5	7

ANEXO 3: TERMO DE DOAÇÃO TERMO DE DOAÇÃO

Eu, _____, nacionalidade _____,
CPF _____, RG _____, idade ____, estado civil _____,
profissão _____,
endereço _____, estou DOANDO meu(s)
animal(ais) ou PARTES DELE (informar qual) para o pesquisador Rodolfo Cordeiro Giunchetti
podendo o mesmo utilizar para o projeto “Avaliação de biomarcadores preditivos e de
monitoramento da leishmaniose visceral em cães naturalmente infectados de municípios da
região Norte de Minas Gerais”.

Porteirinha, MG, ___ de _____ de 2022.

Tutor/Responsável

Pesquisador Principal