

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS

**INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP
EM GATOS (*FELIS CATUS*) DE ÁREA ENDÊMICA
PARA AS LEISHMANIOSES**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Ciência Animal

Aluna: Stephanie Karoline Pereira Passos

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho

Belo Horizonte, 2016

Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - Campus Pampulha,
Av. Pres. Antônio Carlos, 6.627 - CEP 31270-901 - Caixa Postal 567 -
Telefone: (031) 3409-2229 - Fax: (031) 3409-2230 - Belo Horizonte, MG – Brasil

Catalogação na Publicação

PASSOS, Stephanie Karoline Pereira

Investigação de infecção por *Leishmania* spp em gatos (*Felis catus*) de área endêmica para as leishmanioses.

Belo Horizonte: [s.n], 2016.

44 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2016.

Orientador: Prof. Associada. Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho

PALAVRAS CHAVES:

1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmaniose felina. 3. Técnicas sorológicas. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Imunocromatografia.

FOLHA DE APROVAÇÃO**STEPHANIE KAROLINE PEREIRA PASSOS**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

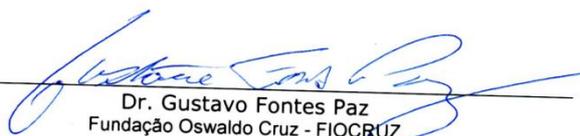
Aprovada em 15 de Fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:



Profª. Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho
Presidente - Orientador



Profª. Fabíola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. Gustavo Fontes Paz
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Agradecimentos:

A Deus, meu Pai celestial, fonte de toda a sabedoria e coo e que até aqui me sustentou.

Aos meus pais, em especial minha mãe, pela dedicação dispensada a mim permitindo que eu chegasse até aqui.

Ao meu irmão e minha sobrinha Maria Clara por darem um colorido especial a minha vida.

Ao meu namorado Élio, pela compreensão, amor, cuidado e apoio.

A minha orientadora, Adriane Pimenta Costa Val, que apesar do apelido de "tia" foi uma verdadeira "mãe" durante esses dois anos.

Ao Bruce, Max e Lara; meus cachorros-filhos e companheiros em noites de estudo.

Ao Dr. Leonardo Maciel, por ser tão solícito e ter um amor imensurável aos animais.

A toda a minha família e amigos pelo apoio e incentivo.

A toda a equipe do LAC (Laboratório de Análises Clínicas da UFMG) pela paciência, em especial a professora Fabíola, Gabriella Mattoso e Ayla Watanabe.

A minha companheira de experimento e amiga, Marina Pellegrino por todo o companheirismo e dedicação.

A toda a equipe da "Casa dos Gatos" por cederem tão gentilmente o lugar e os animais para contribuição científica.

A toda a equipe da FIOCRUZ, em especial ao Gustavo Paz, que abriu as portas do laboratório, sempre foi solícito, disposto a ajudar e sanar dúvidas, além de toda persistência e disposição.

Ao professor Marcos Xavier por dedicar o seu tempo e inteligência a ajudar as pessoas.

A todos os animais que fizeram parte do experimento, e tornaram tão prazeroso o tempo de estudo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
Lista de Abreviaturas	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Características da doença	11
2.2 Ciclo da doença	11
2.3 Resposta imunológica.....	13
2.4 Leishmaniose felina.....	14
3. HIPÓTESE	20
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo gerais	20
4.2 Objetivos específicos	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	20
5.1 Gatos	20
5.2 Coleta e conservação do material biológico	21
5.3 Exames realizados	21
5.3.1 Sangue total com EDTA	21
5.3.1.1 Hemograma	21
5.3.2 Soro	21
5.3.2.1 Perfil bioquímico	21
5.3.2.2 Imunocromatografia	21
5.3.2.3 Sorologia	22
5.3.2.3.1 RIFI	23
5.3.3 Punção de medula	23
5.3.3.1 Pesquisa do parasito em lâminas	23
5.3.3.2 Cultura	24

5.3.3.3 Biópsia de pele.....	24
5.3.4 Exames moleculares	24
5.3.4.1 Extração de DNA	25
5.3.4.2 Kdna E hsp70	25
5.4 Análise Estatística	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
6.1 Exames hematológicos	26
6.2 Exames bioquímicos	27
6.3 Resultados obtidos por exames de imunocromatografia.....	30
6.4 Resultados obtidos por exame sorológico	30
6.5 Resultados obtidos à partir de testes realizados por amostra de medula óssea	31
6.5.1 Pesquisa de <i>Leishmania</i> em lâminas	31
6.5.2 Cultura	31
6.5.3 Método molecular para análise de medula óssea e biópsia de pele	32
6.6 Resultados Comparados	32
7. Conclusão	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXO 1	43

Resumo

A leishmaniose visceral, causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, é considerada doença endêmica no Brasil. Sabe-se que o cão é o principal hospedeiro e reservatório da doença, no entanto, o papel do gato na epidemiologia da doença tem sido questionado. Este trabalho buscou investigar a infecção por *Leishmania* em felinos de um gatil localizado em área endêmica para leishmanioses. A amostra total foi de 100 gatos, escolhidos de maneira aleatória de um plantel de 250 animais. Cada um destes animais foi identificado com resenha e implantação subcutânea de “microchip”. Após exame clínico completo, colheu-se 5 ml de sangue para realização de perfis hematológico e bioquímico, imunocromatografia para diagnóstico de leishmaniose, FIV e FeLV, e testes sorológicos por RIFI para identificação de anticorpos anti-*Leishmania*. Procederam-se ainda exames parasitológicos pela punção de medula óssea: pesquisa direta de *Leishmania* por lâminas e cultura, e técnicas moleculares: PCR HSP70 e kDNA de medula óssea e biópsia de pele.

Nos exames parasitológicos e moleculares não foram obtidos resultados positivos. Desta forma, os resultados positivos obtidos no exame sorológico foram comparados com alterações hematológicas e bioquímicas pelo teste de Qui Quadrado e observou-se estatística significativa, ou seja, rejeitou-se a hipótese nula, comprovando assim a associação dos resultados de RIFI com anemia, plaquetopenia, leucopenia, aumento de uréia, aumento de creatinina, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, aumento de ALT e imunocromatografia positiva para FeLV, ou seja, obteve-se $p \leq 0,05$.

Com este trabalho foi possível demonstrar que felinos de gatil localizado em cidade endêmica para leishmaniose visceral canina apresentaram alterações hematológicas, bioquímicas, presença de retrovírus e de anticorpos anti-*Leishmania*, no entanto a presença do parasita na medula óssea ou na pele não foi confirmada por métodos parasitológicos e moleculares.

Palavras chave: leishmaniose visceral, leishmaniose felina, técnicas sorológicas, reação em cadeia da polimerase, *Leishmania infantum*.

Abstract

Visceral leishmaniasis, caused by the *Leishmania infantum* protozoa, is considered an endemic disease in Brazil. It is known that the dog is the main host and reservoir host for the disease. However, the cat's role in the epidemiology of leishmaniasis is being questioned. This research aimed at surveying feline leishmaniasis cases and also at evaluating diagnostic techniques and the frequency of the disease caused by *Leishmania infantum* in a cattery. The sample consisted of 100 cats, randomly selected from a population of 250 animals. Each of them was identified through identity sketches and had a microchip subcutaneously implanted. After a thorough clinical examination, 5mL of blood were collected for hematological and biochemical profiles, immunochromatographic assays for leishmaniasis, FIV and FeLV diagnoses, and serological tests - ELISA and IIFT - for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. Twenty-two cats, positive in both serological tests, were selected. Bone marrow biopsies were performed in order to prepare slides for *Leishmania* identification, for HSP70-PCR and kDNA-PCR assays, and for *Leishmania* cultures. Also, skin biopsies were performed for PCR assays. In the second stage of the experiment there were no positive results in the tests. Thus, using the Chi-square test and the Spearman correlation, the previous stage was analyzed in order to justify serology and inflammatory proteins results. A statistically significant association was found ($p < 0,05$) in the albumin (Spearman test) and in the creatinine (Chi-square test) categories. It is possible to demonstrate in this paper that the serological techniques (IIFT and ELISA) were not able to diagnose the disease in felines, and also that the albumin and creatinine variables presented positive correlations with serology.

KEY WORDS: visceral leishmaniasis, feline leishmaniasis, serological techniques, polymerase chain reaction, *Leishmania infantum*.

LISTA DE ABREVIATURAS

FeLV – Vírus da Leucemia Felina

FIV-Vírus da Imunodeficiência Felina

LF – Leishmaniose felina

LV - Leishmaniose visceral

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PIF – Peritonite Infecciosa Felina

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

ELISA – Ensaio imunoenzimático

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são doenças complexas, distribuídas por todo o mundo, causadas por protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* com características epidemiológicas que estabelecem diversas formas clínicas da doença (Ross, 1903). A principal forma de transmissão é pela picada de fêmeas de flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae) infectadas. Entre dezessete espécies de *Leishmania*, treze apresentam natureza zoonótica, distribuem-se pelo Velho e Novo Mundo e manifestam-se nas formas cutânea e visceral (Lainson e Shaw, 1987). A doença é endêmica em 65 países (Alvar et al., 2006) e mais que 90% dos 500 mil casos por ano no mundo ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. Estima-se que a leishmaniose visceral (LV) é responsável por cerca de 59.000 mortes por ano (Alvar et al., 2012).

No Brasil, a LV é uma zoonose endêmica causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, transmitida pela picada de vetores artrópodes do gênero *Lutzomyia* spp., sendo o *Lutzomyia longipalpis* o vetor mais importante do parasito no Novo Mundo. O reservatório doméstico mais relevante para a *L. infantum* é o cão (*Canis familiaris*) (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006). Em muitas cidades do Brasil, onde a LV é endêmica, a eutanásia de cães afetados por LV representa um dos pilares no controle da doença pelo governo (Ministério da Saúde, 2014). Apesar dessa medida de controle utilizada pelo Ministério da Saúde, associada à dedetização do ambiente em áreas endêmicas, a prevalência de cães afetados e o número de casos humanos aumentaram significativamente nos últimos anos. Desta maneira, têm se apontado a possível participação de mamíferos sinantrópicos, tais como gambás, ratos, capivaras e outros animais domésticos, como o gato (*Felis catus*) atuando como reservatórios alternativos ou até acidentais de *L. infantum* em áreas urbanas (Poli et al., 2002; Dantas Torres e Brandão-Filho, 2006 e Maroli et al., 2007).

A incidência de gatos infectados ou mesmo doentes em áreas endêmicas é drasticamente inferior ao de cães, sugerindo que o desenvolvimento de imunidade celular, quando infectados pelo parasito, seja efetivo para controlar a infecção e conferir certo grau de resistência natural a estes animais (Sobrinho, 2014). Cinco espécies dentro do gênero *Leishmania* foram identificadas em gatos: *Leishmania mexicana*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* no Novo Mundo, e *Leishmania infantum* tanto no Novo e do Velho Mundo. (Pennisi, 2015).

É válido questionamentos em prol do diagnóstico nesta espécie e compreensão de sua resposta imunológica, uma vez que já foi comprovado que gatos com leishmaniose possuem capacidade de infectar flebotomíneos (Sobrinho, 2014).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1 Características da doença

A Leishmaniose é uma doença parasitária zoonótica que engloba um grupo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Estes organismos são pleomórficos com formas promastigotas (flageladas e extracelulares) e amastigotas (aflageladas e intracelulares) que se reproduzem assexuadamente por fissão binária. Taxonomicamente *Leishmania* spp. pertence ao Reino Euglenozoa, Classe Kinetoplastea, Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae (Votýpka et al., 2015). O gênero *Leishmania* dá origem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* que se diferem quanto ao desenvolvimento no vetor. Ao primeiro gênero, de maior importância no Novo Mundo, pertencem 5 espécies: *L.tropica*, *L.major* e *L.aethiopica*, o complexo *L.donovani* (*L.infantum*, *L.donovani* e *L.chagasi*). No complexo *L.donovani*, a espécie *L.donovani donovani* está associada ao desenvolvimento da doença nos humanos e a espécie *L.donovani infantum* (sin. *L.donovani chagasi* na América) associada aos animais (SHAW et al., 2006). Ao passo que, a forma dermatópica é causada pela infecção da *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Basano e Camargo, 2004; Esch e Petersen, 2013).

2.2 Ciclo da doença

O ciclo biológico do protozoário é heteroxênico, sendo composto por hospedeiros vertebrados e invertebrados. No seu ciclo biológico este protozoário apresenta dois tipos morfológicos básicos, consoante o hospedeiro. A promastigota ocorre no hospedeiro invertebrado, e se apresenta de forma fusiforme, extracelular, com um flagelo na porção anterior. A amastigota ocorre no hospedeiro vertebrado, apresenta conformação arredondada ou oval, intracelular, com um flagelo rudimentar (Chang et al, 1985).

Os hospedeiros vertebrados são animais silvestres ou domésticos. O cão apresenta papel importante na transmissão da doença, o de reservatório natural e ainda apresenta uma severa doença sistêmica (Solano Gallego et al., 2009). O parasito já foi detectado em outras espécies de animais, incluindo pequenos roedores (Neafie e Connor, 1976; Ozon et al., 1998), ovelhas (Van der Lugt et al., 1992), cabras (Williams et al., 1991) e cavalos (Koehler et al., 2002; Solano-Gallego et al., 2003). São, todavia os cães, que apresentam um papel importante, apesar de controverso, na manutenção ao longo do tempo, da leishmaniose visceral humana (Cardoso et al., 2004). Estes apresentam todas as características de bons reservatórios da doença, com uma área de distribuição corporal semelhante à humana, contato frequente com flebotomos antropofílicos, modo de parasitismo favorável à transmissão, alto grau de infecção cutânea e evolução crônica e prolongada da doença (Bray, 1982).

Os hospedeiros invertebrados são representados por fêmeas de insetos dípteros, pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phebotominae e gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Chang et al, 1985). Os principais vetores envolvidos na transmissão das leishmanioses no Brasil compreendem várias espécies do gênero *Lutzomyia*, a saber, *Lutzomyia complexa*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia wellcomei* (infectados por *L. (V.) braziliensis*), *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia olmeca nociva* e o *Lutzomyia reducta* (infectados por *L. (L.) amazonensis*) (Pita-Pereira et al., 2009; Rebêlo et al., 1999), bem como o *Lutzomyia longipalpis* e a *Lutzomyia cruzi* (infectados por *L. infantum chagasi*) (Romero e Boelaert, 2010). São insetos pequenos, com 2 a 3 mm de comprimento, revestidos por pêlos de coloração palha, caracterizados pelo pouso com as asas entreabertas e discretamente eretas, deslocando-se em voos curtos e silenciosos, onde apenas a fêmea é hematófaga (Rey, 2001).

Sabe-se que a picada do flebotomíneo é a principal forma de transmissão da doença, havendo também vias secundárias cuja relevância ainda é desconhecida, como transmissão transplacentária, transfusão sanguínea, por ectoparasitos e via venérea (Dantas Torres, 2009).

O ciclo completo no inseto dura de 6 a 9 dias, dependendo da espécie. Assim, quando ocorre o repasto sanguíneo pelo flebotomíneo fêmea em um mamífero infectado, são ingeridos macrófagos parasitados com formas amastigotas de *Leishmania*, que se alojam na porção posterior do seu intestino médio. Estas formas se diferenciam à medida que migram ao longo do intestino, primeiramente em promastigotas procíclicos e posteriormente metacíclicos (forma infectante ao hospedeiro invertebrado) até atingirem a cavidade oral (Alves-Pires, 2008). Cada fase de diferenciação é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais que visam garantir a sua sobrevivência no vetor (Kamhawi, 2006). As promastigotas se fixam à válvula estomodeal (última porção do intestino anterior) e provocam a degeneração da mesma, permitindo às formas metacíclicas atingirem a cavidade oral e penetrarem no hospedeiro vertebrado quando de uma nova refeição (Tomás e Romão, 2008). A perda da funcionalidade da válvula juntamente com a oclusão do lúmen intestinal causada pelos parasitas e por uma matriz de fosfoglicanos secretados impede o inseto de realizar refeições completas. Este fato obriga o vetor a picar vários hospedeiros, na tentativa de obter a quantidade de sangue de que necessita (Rogers, Chance e Bates, 2002). Isso parece explicar que num determinado foco, se verifique uma elevada prevalência de Leishmaniose apesar de uma baixa taxa de infecção flebotomínica (Alves-Pires, 2008).

Fêmeas aladas dotadas de formas promastigotas metacíclicas, realizam o repasto em um animal sadio, no qual são inoculadas na epiderme e fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico (SMF) e, no interior de macrófagos diferenciam-se em formas amastigotas e multiplicam-se por intensa divisão binária. Uma vez repletos de amastigotas, os

macrófagos rompem-se e as liberam para outras células fagocíticas no fígado, baço, linfonodos, medula óssea, pele e outros órgãos (Alves-Pires, 2008).

Somente as fêmeas de *L. longipalpis* são hematófagas (Dantas Torres, 2009), as condições ambientais ideais para atividade dos flebotomíneos são temperaturas entre 15 e 28°C, alta umidade relativa e ausência de vento ou raios solares (Durrani et al., 2012). As fêmeas de flebotomos se alimentam principalmente nas áreas de pelagem escassa como cabeça, plano nasal, pina e áreas inguinal e perineal (Solano Gallego et al., 2009). A atividade dos flebotomíneos adultos é crepuscular e noturna durante todo o ano na América do Sul (Sharma e Shing, 2008).

2.3 Resposta imunológica

A resposta imunológica já foi descrita em cães, hamsters e no homem. Esta, inicia-se quando macrófagos parasitados e células apresentadoras de antígenos ativam linfócitos T do subtipo CD4+. Estes são induzidos a produzir interleucinas que provém o desenvolvimento de duas subpopulações de linfócitos T auxiliares (*T helper*), Th1 e Th2 (Barbiéri, 2006; Michalick e Genaro, 2007).

Os linfócitos Th1 ativados estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-), às interleucinas IL-1, IL-2, IL-6 e IL-12 e o interferon gama (IFN- γ), que eleva a eficiência dos fagócitos e dos linfócitos citotóxicos. Uma vez ativados, os macrófagos produzem superóxido e óxido nítrico (NO), os quais são potentes radicais livres capazes de controlar o parasitismo e eliminar a infecção (Pinelli et al., 1999; Abbas et al., 2008; Weaver et al., 2007).

Quando a infecção induz a resposta de linfócitos Th2, há síntese de citocinas anti-inflamatórias como o fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, bem como a proliferação de células B e subsequente produção de anticorpos (Murray et al., 2003). Apesar de ser intensa, a proliferação de imunoglobulinas é pouco efetiva na resposta imunológica contra o parasito intracelular e deletéria devido à deposição de complexos imunes circulantes em vários tecidos (Martínez -Moreno et al., 1995; Santos-Gomes et al., 2002; Weaver et al., 2007). Tanto a IL-12 como a IL-4, liberadas no início do processo inflamatório, desempenham um papel crucial no curso da infecção; já que influenciam a resposta imune inata e incitam os linfócitos TCD4+ (Abbas et al., 2008). Desta maneira, a resposta Th1 está relacionada à resistência e proteção contra a infecção, ao passo que a Th2 está envolvida na suscetibilidade e progresso da doença (Barbiéri, 2006; Michalick; Genaro, 2007).

2.4 Leishmaniose Felina

A leishmaniose felina (LF) foi descrita em 1912, quando Sergeant encontrou formas amastigotas na medula óssea de um gato de aproximadamente quatro meses, que convivia na mesma casa com um cachorro e uma criança infectada por *Leishmania infantum* (Sergeant, 1912 citado por Gramiccia e Grandoni, 2005). Vários relatos de infecções em felinos surgiram na literatura científica em países da Europa Central, América do Sul, bacia do Mediterrâneo e Ásia (Pennisi et al., 2004). Felinos são naturalmente infectados pelas mesmas espécies de *Leishmania* que afetam cães e seres humanos em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo: *L. infantum* na bacia do Mediterrâneo, Irã e Brasil; *L. mexicana* no Texas, EUA; *L. braziliensis* no Brasil e Guiana Francesa; *L. amazonensis* no Brasil; *L. venezuelensis* na Venezuela (Pennisi, 2013). Normalmente gatos infectados são encontrados em áreas endêmicas de leishmanioses, embora a doença clínica devido a *L. infantum* em gatos é rara (Pennisi et al., 2015). Um caso de animal infectado com *L. infantum* foi registrado na cidade de Cotia do Estado de São Paulo (Brasil), onde nenhum caso autóctone de LV humana ou canina foram reportados (Savani et al., 2004).

A leishmaniose causada por *L. infantum* é uma patologia global emergente. Usando técnicas moleculares de diagnóstico em cães em áreas endêmicas, mostrou-se que a prevalência da infecção é muito mais elevada do que a da doença; sendo o mesmo, verdade para as pessoas e felinos: em algumas áreas endêmicas, infecções latentes chegar a 30% da população, com base em teste de pele positivo para *Leishmania* (Pennisi, 2015).

Maia e Campino (2011) enunciaram que os gatos podem ser importantes hospedeiros da *Leishmania*, uma vez que são considerados fonte de alimentação sanguínea para os vetores biológicos. A característica que permite incluir essa espécie no ciclo biológico do parasita é a susceptibilidade natural à infecção por *L. infantum*, geralmente não acompanhada de sinais clínicos, que quando presentes são predominantemente cutâneos com poucos relatos de dispersão visceral.

A patogênese do desenvolvimento da doença é influenciada por fatores imunológicos, que estão ligados à base genética complexa dos hospedeiros, como demonstrada por estudos em animais de laboratório, cães e humanos. Nas pessoas, a *L. infantum* pode induzir lesões cutâneas locais e doença visceral grave. A última forma é a apresentação típica em pacientes imunossuprimidos. Em cães, a leishmaniose é uma doença multissistêmica com um vasto espectro de gravidade que reflete o equilíbrio entre a célula-mediada de proteção e a resposta imunológica humoral não protetora. Em todas as espécies hospedeiras há uma gama dinâmica de infecção subclínica com doença grave e não-auto-limitante, os macrófagos desempenham um papel central no controle da infecção. As citocinas, tais como IFN- γ , IL-2 e TNF- α , secretado por células T ativadas, estimulam a morte intracelular de formas amastigotas de *Leishmania* por macrófagos.

A presença de macrófagos infectados por *Leishmania* é geralmente associada com uma reação inflamatória linfóide, mas a hiperplasia granulomatosa também é comum (Pennisi, 2015).

Uma resposta de anticorpos maciça é responsável pela deposição de complexos imunes no rim, com glomerulonefrite e subsequente falência renal. Na histopatologia de lesões cutâneas dos felinos encontra-se principalmente uma dermatite granulomatosa difusa com macrófagos contendo muitos parasitas de *Leishmania*, ou uma perifolliculite granulomatosa e dermatite com reação do tecido liquenóide de interface, além de inflamação granulomatosa também vista no fígado. Estudos epidemiológicos mostraram que a infecção por *Leishmania* dos gatos é muito mais comum do que a doença associada; gatos podem permanecer PCR e anticorpo positivo para um longo tempo. Desta forma, gatos podem ser mais resistentes do que os cães para desenvolver a doença (Pennisi et al., 2002; Poli et al., 2002; Mancianti, 2004; Maroli et al., 2007; Pennisi et al., 2013).

Os sinais clínicos associados à infecção por *Leishmania* em gatos podem apresentar um padrão sistêmico e/ou dermatológico. A forma dermatológica é a mais comum (Pennisi et al., 2002; Poli et al., 2002; Mancianti, 2004; Maroli et al., 2007). As apresentações cutâneas são polimórficas, tais como lesões nodulares, ulcerativas, crostosas ou papulares (Gramiccia e Grandoni, 2005). As localizações mais comuns destas lesões são o nariz, lábios, orelhas, pálpebras e membros distais. Também podem surgir lesões generalizadas de dermatite, alopecia e descamação (Pennisi et al., 2002; Poli et al., 2002; Mancianti, 2004; Maroli et al., 2007).

A forma sistêmica da doença mostra envolvimento do fígado, baço, linfonodos e rins (Pennisi et al., 2002; Poli et al., 2002; Mancianti, 2004; Maroli et al., 2007). Outros sinais clínicos menos específicos são desidratação, corrimento ocular, uveíte, estomatite ulcerativa ou complexo gengivite-estomatite felino, febre, anorexia, vômito, otite, hipergamaglobulinemia, anemia normocítica normocrômica leve, linfadenopatia (local ou generalizada), distensão abdominal, diarreia crônica, podendo levar a morte (Mancianti et al., 2004; Pirajá et al. 2013; Pennisi et al. 2015).

Quanto aos aspectos epizootiológicos de LF, a prevalência da infecção foi estimada em populações do sul da Europa por meio de técnicas sorológicas que detectavam anticorpos de *L. infantum*. Os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* detectados foram menores que na LVC. Os valores de soroprevalência por RIFI variaram de 0,6 a 59,1% em diferentes áreas endêmicas (Boari et al., 2005).

Apesar de ser susceptível e de sua proximidade com humanos, o papel do felino na epidemiologia das leishmanioses ainda não foi esclarecido. Mesmo com a ocorrência de infecções esporádicas, os felinos não são considerados, até o momento, reservatório importante da doença (Pirajá et al., 2013). Existem discordâncias na literatura com relação à susceptibilidade dos felinos

domésticos à infecção por *Leishmania* sp., pois acredita-se que gatos infectados possuam certo grau de resistência natural à enfermidade, indicado por estudos de infecção experimental (Pennisi et al., 2004). Apesar da existência de alguns estudos sobre a soroprevalência da infecção em populações de felinos residentes em áreas endêmicas, não está claro ainda se a pequena prevalência é devida a baixa susceptibilidade ou por menor infecção pelo parasito. Algumas possibilidades são: falhas na detecção de anticorpos, possível resistência natural dos felinos, com produção de linfócitos Th1;(Costa et al. 2010), falta de sintomas característicos que facilitem a suspeita e até mesmo a triagem da infecção ou ainda por apresentarem a doença associada a outras enfermidades, muitas vezes mascarando a leishmaniose (Pirajá et al., 2013).

Os sinais clínicos da enfermidade são muitas vezes detectados em gatos infectados com doenças imunossupressoras como as causadas pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV), da leucemia felina (FeLV), da Peritonite infecciosa felina (PIF); diabetes melitus, doenças autoimunes e neoplásicas, que podem proporcionar a multiplicação do parasita (Pennisi et al., 2004; Maroli, 2007).

Apesar de alguns autores (Pennisi et al., 2004; Maroli, 2007) suspeitarem da forte associação de doenças imunossupressoras com a LF, um estudo (Garrido, 2012) efetuado em regiões endêmicas de Portugal, verificou que em gatos soropositivos para *Leishmania* os percentuais de anticorpos detectados de FIV, FeLV e PIF eram de 29,4%, 37,5% e 26,7% respectivamente, indicando assim não haver associação direta entre a presença de *Leishmania* e a infecção por estes vírus. Também na maior parte dos rastreios epidemiológicos a associação entre a positividade em relação a FIV, FeLV e/ou parasitoses concomitantes, como a infecção por *Toxoplasma gondii*, e a presença de anticorpos anti-*Leishmania* não foi observada (Sobrinho et al., 2010; Maia e Campino, 2011). Em um estudo realizado por Pennisi et al. (2004), foi observado maior ocorrência em felinos do sexo feminino e com idade superior a dois anos. Já Cardoso et al. (2010), observaram maior soroprevalência em animais de ambientes rurais, defendendo que estes são mais susceptíveis, pois permanecem a maior parte do tempo no exterior da casa e sem profilaxia inseticida.

O diagnóstico definitivo da leishmaniose associa a presença de sinais clínicos compatíveis com a infecção, histórico de exposição ao parasito e comprovação da presença do parasito *Leishmania*. As principais categorias de testes usados no diagnóstico da LV em gatos são métodos parasitológicos (detecção do parasito), métodos sorológicos (detecção de anticorpos anti-*Leishmania*) e métodos moleculares (amplificação do DNA do parasito) (Garrido, 2012).

Os métodos de diagnóstico parasitológicos diretos permitem a visualização do parasito, como a citopatologia, que consiste na demonstração da forma amastigota do parasito através de esfregaços corados de material biológico, nomeadamente da medula óssea, baço, linfonodos, pele

ou sangue periférico, que posteriormente são observados e identificados ao microscópio óptico (Maia e Campino, 2008). Existe a histopatologia, onde se obtém pequenos fragmentos de órgãos, como o fígado ou baço, obtidos por biópsia ou após a eutanásia, dos quais são realizados cortes histológicos em busca de infiltrado inflamatório mononuclear e formas amastigotas de *Leishmania* (Navarro et al., 2010). Esses métodos são comumente utilizados na identificação do parasito em gatos, devido a pequena detecção e contestável por métodos sorológicos (Garrido, 2012). E ainda a cultura de *Leishmania*, onde material biológico é coletado de forma estéril, normalmente de medula óssea, sendo submetido à um meio com condições ideais de temperatura e nutrientes para que estas, consigam se reproduzir e crescerem à ponto de serem identificadas em microscopia óptica (Pennisi et al., 2015).

Os métodos sorológicos consistem na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro sanguíneo do gato e constituem um instrumento para a triagem no diagnóstico de infecção por *Leishmania* spp. As técnicas mais utilizadas são ELISA e RIFI. A ELISA utilizada no diagnóstico de Leishmaniose permite a detecção de anticorpos específicos, utilizando um antígeno solúvel adsorvido a uma superfície de plástico sobre o qual são colocados os soros suspeitos. A evidenciação dos complexos antígeno/anticorpo é efetuada pela adição de um conjugado anti-espécie ligado a uma enzima, do substrato enzimático e de um cromógeno, desencadeando uma reação enzimática demonstrada pelo aparecimento de cor. De acordo com a literatura, os valores de sensibilidade variam entre 86%-99% e os da especificidade entre 94%-99,5%, apresentando maior interesse para a realização de rastreios epidemiológicos por serem analisadas um elevado número de amostras (Pennisi et al., 2010).

A principal limitação é a incapacidade de diagnosticar a doença quando não se produzem anticorpos, durante o período de soroconversão e em doentes assintomáticos (Solano-Gallego et al., 2009; Gramiccia, 2011).

A técnica de RIFI baseia-se na formação de imunocomplexos formados pelos antígenos de superfície figurados fixos ao suporte sólido de fixação com os anticorpos específicos existentes no soro do animal. Posteriormente, adiciona-se um anticorpo anti-espécie conjugado com um fluorocromo que permite observar os resultados finais num microscópio de fluorescência. O antígeno mais utilizado nesta técnica é constituído por formas promastigotas inteiras cultivadas *in vitro* (Maia e Campino, 2008), porém, na infecção natural, o hospedeiro vertebrado reage imunologicamente com as formas amastigotas do parasita. Em concordância com o anterior, num estudo realizado por Fernández-Pérez et al. (1999) é referido que a reação sobre amastigotas é mais sensível em casos assintomáticos e com baixos títulos de anticorpos específicos (Cardoso, 2004). Segundo Pennisi (2015), na realização de exames sorológicos pode ocorrer reação cruzada

entre anticorpos felinos para diferentes espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, como já demonstrado em cães.

A baixa produção de anticorpos específicos sugere que a sorologia convencional não é um método confiável em gatos (Maia e Campino, 2011) e a presença de anticorpos não implica o desenvolvimento da doença. Martín-Sánchez et al. (2007) verificaram que felinos com títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. mais elevados apresentavam menor ocorrência de positividade pela técnica de PCR. Por outro lado, houve maior proporção de positividade com PCR em felinos com baixas concentrações séricas de tais anticorpos. Desta maneira, alguns autores levantam a hipótese de uma resposta imunitária felina diferente daquela que ocorre usualmente em cães, o que pode explicar a baixa ocorrência de felinos assintomáticos, uma vez que a resposta imune do tipo celular é um indicativo de resistência à infecção por *Leishmania* spp. (Vita et al., 2005; Baneth et al., 2008; Maia e Campino, 2011).

A Reação em Cadeia Polimerase (PCR) consiste em um método molecular sensível, confiável e rápido para o diagnóstico da leishmaniose, podendo ser realizado com amostras de medula óssea, sangue, fragmentos de órgãos (com baço, fígado e pele). Atualmente, ensaios baseados nas técnicas de PCR constituem a principal abordagem molecular, produzindo resultados confiáveis no diagnóstico da LF. Tais ensaios permitem amplificar quantidades mínimas de DNA do parasita através da utilização de sequências iniciadoras específicas e confirmar sua presença na amostra (Maia e Campino, 2008). Os dois alvos moleculares mais utilizados em PCR ^{para} detecção de *Leishmania* spp. são o kDNA e o HSP70.

O DNA do cinetoplasto (kDNA, do inglês *kinetoplast*) representa 20-25% do DNA do parasito e consiste em uma rede de moléculas circulares, interligadas, divididas em maxicírculos e minicírculos (Telleria, 2006). São cerca de 50 maxicírculos (com 20.000 a 35.000 pb (pares de base)), que contêm genes que codificam proteínas mitocondriais e o RNA ribossomal (rRNA), enquanto os minicírculos são no número de 10.000 a 20.000, com sequências de 500 a 2.500 pb (Cortes, 2008). O minicírculo kDNA é o alvo mais estudado e aplicado nas pesquisas moleculares para o diagnóstico da leishmaniose humana. Sua vantagem está no fato do grande número de cópias por célula. Os iniciadores desenhados por Degrave et al. (1994) foram os mais aplicados na amplificação do minicírculo do kDNA. A região amplificada apresenta uma sequência de 120 pb, e os sistemas desenvolvidos já foram aplicados com sucesso na identificação de *Leishmania* em amostras de medula, sangue, soro e urina, de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (Attar, 2001; Fissore et al., 2004; Mary, 2004; Junior, 2009). Os bons resultados para esses iniciadores foram obtidos tanto utilizando técnicas convencionais de PCR como a PCR em Tempo Real (Mary, 2004; Fakhar, 2008). Os sistemas apresentaram valores de detecção de 0,001 parasito/mL, identificando DNA de *Leishmania* em portadores assintomáticos,

quando as técnicas convencionais de diagnóstico falharam, indicando uma boa correlação entre os níveis de parasitemia e o estado clínico dos pacientes (Mary, 2004; Fakhar, 2008).

Os parasitas como a *Leishmania infantum*, sofrem várias mudanças morfológicas durante seu ciclo de vida, incluindo a troca de organismo hospedeiro. Dentre essas, as *Heat Shock Proteins 70* (HSP70) são proteínas essenciais durante a passagem do vetor para o hospedeiro vertebrado, devido aos vários tipos de estresses ao qual o parasita é submetido, o que resulta em uma maior expressão destas proteínas. As proteínas de choque térmico ou chaperones moleculares, como, por exemplo, a Hsp70, têm a função auxiliar no processo de enovelamento proteico, no transporte de proteínas entre as membranas e em outras funções celulares ainda não elucidadas. As *Heat Shock Proteins* (HSPs) são identificadas como os principais imunógenos em várias doenças infecciosas (Arora et al., 2000), sendo a família da HSP70 comum em soro de pacientes com LV (Wallace et al., 1992; Arora et al., 2000). Após mapeamento de HSP70 cDNA (Arora et al., 1995; Arora et al., 2000), abordagens com PCR foram feitas utilizando os iniciadores *Hsp70sen* e *Hsp70ant* (Garcia, 2004). Um produto de 1.300 pb foi amplificado com estes parasitos, o mesmo encontrado com o DNA de *T. cruzi*, mas nenhum produto foi observado com *M. tuberculosis* ou *Sporothrix schenckii*. Dessa forma, falsos positivos podem ser obtidos em pacientes chagásicos.

Segundo Costa et al., (2010) em um estudo onde foram avaliados 200 gatos, a concordância observada entre o diagnóstico parasitológico e a técnica de ELISA indireto foi considerada fraca. Chama a atenção o fato de que dos oito gatos com exame parasitológico positivo, apenas dois eram sorologicamente positivos. Esta observação concorda com os relatos de Martín-Sánchez et al. (2007), que avaliaram amostras de soro de 183 gatos por RIFI e verificaram que os animais com os mais elevados títulos de anticorpos foram os que apresentaram a menor proporção de positividade para a presença de DNA na técnica de PCR. Por outro lado, as maiores proporções de PCR positivos ocorreram em gatos com pequenos títulos de anticorpos. Estes resultados sugerem que a resposta imune à infecção por *Leishmania* sp em gatos difere da observada em cães, o que deve explicar o pequeno número de animais infectados e sintomáticos. Esse fato pode subestimar o número real de gatos infectados, desta forma, facilitando a transmissão dos parasitos (Costa et al., 2010).

3. HIPÓTESE:

Felinos de gatil localizado em área endêmica para as leishmanioses apresentam marcadores biológicos de infecção para *Leishmania* spp.

4. OBJETIVOS:

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de infecção por *Leishmania* spp em gatos de área endêmica para as leishmanioses.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a presença de sinais clínicos de LV em gatos de área endêmica;
- b) Pesquisar a presença de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* no soro dos gatos;
- c) Pesquisar a presença do DNA de *Leishmania* spp. em pele e medula óssea de gatos de área endêmica;
- d) Isolar e caracterizar espécies de *Leishmania* infectam gatos e área endêmica;
- e) Determinar a frequência da infecção por FIV/ FeLV e determinar a possibilidade de co-infecção com *Leishmania* spp.e sua manifestação;

5. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho apresenta licença concedida pelo CEUA sob número 242/2014.

5.1 GATOS:

A população em estudo foi constituída por 100 gatos (*Felis catus*), escolhida aleatoriamente de um contingente de 250 animais resgatados de vida errante e do Parque Municipal de Belo Horizonte Américo Renné Giannetti. Esses animais residem no abrigo “Casa dos Gatos” na região da Pampulha, na cidade de Belo Horizonte, que por sua vez, representa uma área endêmica para leishmanioses.

Cada animal foi fotografado, resenhado e examinado (Anexo 1). A resenha consistiu em uma ficha, onde foram descritas características particulares de cada animal, como pelagem, cicatrizes, alterações anatômicas, sexo, idade aproximada (jovem, adulto ou idoso), raça, local de preferência (exterior, interior ou misto), temperamento. Nesta etapa, cada animal passou por exame clínico completo. Todos os animais foram identificados com o Microchip FDX-B (ISO standard - BackHome BioTec® (Virbac, São Paulo, Brasil) produzido de acordo com as normas ISO 11784 e NBR 14766. Este microchip é comercializado com a agulha de aplicação e foi aplicado por via subcutânea e entre escápulas.

5.2 Coleta e conservação do material biológico

Todas as amostras foram coletadas no próprio ambiente de moradia dos gatos. A coleta de sangue foi realizada prioritariamente da veia jugular, e ocasionalmente da veia cefálica com seringa (BD, Juiz de Fora, Brasil) de 5 ml e agulha BD (25 x 0,7. 22GX1). O sangue obtido foi fracionado em tubo para soro (com gel separador hemogard cap. 3,5ml) e em microtubo com

EDTA, com bico acoplado (cap. 250/ 500 uL). Essas amostras foram conservadas em caixa térmica com gelo biológico, para o posterior encaminhamento ao Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG

5.3 Exames realizados

5.3.1 Sangue total com EDTA

5.3.1.1 Hemograma

Com a amostra do tubo com EDTA foi realizado o hemograma, exame que consiste em três etapas: realização do hematócrito, contagem celular automática pelo aparelho Abacus® (Diatron – São Paulo) e correção dos valores e caracterização de células brancas por contagem diferencial em lâmina.

5.3.2 Soro

5.3.2.1 Perfil bioquímico

A amostra, colocada em tubo com gel separador, foi centrifugada por cinco minutos à 4000 rpm (Centribio®, modelo 80-2B-5ML, São Paulo, Brasil), no qual foi separado o soro para realização dos exames: perfil renal (uréia e creatinina), perfil hepático (ALT - Alanina aminotransferase; AST - Aspartato aminotransferase , GGT - Gama glutamil transpeptidase e FoAl - Fosfatase alcalina) e proteinograma (proteínas totais e frações - albuminas e globulinas). Todos estes exames que compõem o perfil bioquímico foram realizados no aparelho automático Cobas® (São José do Rio Preto, Brasil)

5.3.2.2 Imunocromatografia

Com a amostra do soro foi realizado o teste rápido para Leishmaniose (ALERE Lesihmaniose Ac- imunocromatografia), do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) (kit ALERE FIV Ac/ FeLV Ag).

O Teste Alere Leishmaniose Ac Kit é um imunoensaio imunocromatográfico para detecção qualitativa de anticorpos anti *Leishmania infantum*, através da proteína recombinante rK28 (baseada na fusão de epítomos de antígenos rK9, rK39 e rK26) em amostras de soro, plasma ou sangue total, com resultados qualitativos (positivo ou negativo) para o diagnóstico animal. Este teste apresenta elevada sensibilidade (99%) e especificidade (96%).

Para a realização do teste seguiu-se o protocolo:

- a) O cassete foi retirado da embalagem e colocado numa superfície plana e seca.

- b) Adicionaram-se 10 µL de soro, utilizando a pipeta capilar, no orifício marcado com a letra “S” no cassete de teste.
- c) Duas gotas de tampão foram adicionadas no orifício do cassete de teste.
- d) Os resultados foram interpretados após 10 minutos de reação.

O teste Alere FIV Ac/FeLV Ag é um teste rápido imunocromatográfico em cassete, desenvolvido para a detecção qualitativa do anticorpo IgG para Imunodeficiência Felina (FIV Ab) e dos antígenos p27 do vírus da Leucemia Felina (FeLV Ag) em amostras de sangue total, soro ou plasma felino. Alere FIV Ac/FeLV Ag Test Kit apresenta um cassete duplo com as letras T e C como linhas de controle e linhas de teste na sua superfície. As linhas não são visíveis nas janelas de resultado antes da aplicação das amostras. A Linha teste “T” será visível na janela de resultado (FIV Ab) se o anticorpo IgG anti-FIV estiver presente na amostra. A Linha teste “T” será visível na janela de resultado (FeLV Ag) se o antígeno do vírus da Leucemia felina estiver presente na amostra. Este teste apresenta sensibilidade de 96% para FIV e de 100% para FeLV, e especificidade de 98% para FIV e 100% para FeLV, quando comparados à técnica de Western Blot, segundo bula do fabricante.

Para a realização do teste:

- a) O cassete foi retirado da embalagem e colocado numa superfície plana e seca.
- b) Adicionaram-se 10 µL de soro, utilizando a pipeta capilar, no orifício marcado com a letra “S” no cassete de teste.
- c) Duas gotas de tampão foram adicionadas no orifício do cassete de teste.
- d) Os resultados foram, interpretados após 20 minutos de reação.

5.3.2.3 Exames sorológicos

Além disso, 200µL do soro foram congelados à -4°C , até que terminasse todo o período de coleta, e utilizado para a detecção de anticorpos específicos IgG anti-*Leishmania* por RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta Imunodot®).

5.3.2.3.1 RIFI Imunodot® para felinos

Os soros-teste foram centrifugados a 5.000 rpm durante 15 minutos, em temperatura ambiente e foram diluídos à titulação de 1:40 (ex. 1 µL de soro + 39 µL do PBS 1X concentrado). Retiradas as lâminas do refrigerador e as expostas à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos,

foi adicionado 10 µL do soro controle negativo na cavidade de número 6 da lâmina, 10 µL do soro controle positivo na cavidade 7 e 10 µL dos soros teste diluídos nas cavidades restantes, registrando-se a posição de cada uma conforme a marcação na lâmina. Incubou-se as lâminas por 30 minutos em estufa a 37°C em câmara úmida. Utilizando cuba de vidro, lavou-se as lâminas três vezes em PBS 1X concentrado, cronometrando 5 minutos em cada lavada. Adicionou-se 10 µL do conjugado diluído em azul de Evans e incubamos as lâminas por 30 minutos novamente em estufa a 37°C, em câmara úmida. Com o auxílio de uma cuba de vidro, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS 1X concentrado, 5 minutos em cada lavada. E por fim, montou-se as lâminas com lamínula e glicerina tamponada (com proteção a exposição de luz) e realizou-se a leitura em microscópio (Olympus DP10, Modelo BX50F), equipado para leitura de imunofluorescência, usando objetiva de 40X. Reação positiva: os parasitas apresentaram fluorescência esverdeada distribuída por toda a sua superfície. Reação negativa: não houve fluorescência e o campo apareceu escuro.

5.3.3 Exames parasitológicos

Os animais que apresentaram positividade no teste sorológico RIFI foram submetidos à punção de medula óssea.

Para o procedimento de punção de medula óssea, todos os animais apresentavam exames laboratoriais de uréia e creatinina dentro dos parâmetros, uma vez que foram submetidos a sedação e anestesia local. Os animais foram sedados com a associação de três fármacos: cloridrato de ketamina (10mg/kg), midazolam (0,5mg/kg) e acepromazina (0,2mg/kg). Inicialmente foi realizada tricotomia do local a puncionar (crista da tíbia) e antisepsia com iodo povidine e álcool iodado a 70%. Foi realizada a punção com agulha 40x12G, sendo que o material coletado foi separado para: confecção de esfregaços sanguíneos, colocado em eppendorfs para realização de PCR e por fim, manuseadas próximo ao fogo em prol de evitar contaminação do restante do material que foi acondicionado em tubos com meio NNN-LIT e mantidos em bolsa térmica até a chegada no Laboratório de Leishmanioses da FIOCRUZ- Centro de Pesquisa René Rachou.

5.3.3.1 Pesquisa do parasita em lâminas

Uma gota do material puncionado foi depositada em cada lâmina e realizado o procedimento de esfregaço, sendo selecionadas duas de melhor qualidade que foram coradas com Panótico simples para pesquisa de *Leishmania* em microscópio óptico com aumento de 100x em lente de imersão.

5.3.3.2 Cultura

Da amostra da punção de medula óssea, o remanescente foi colocado em tubos falcon contendo meio Novy-MacNeal-Nicolle associado ao meio líquido complexo Liver Infusion Tryptose - LIT, conhecido como meio NNN-LIT, com manuseio próximo ao fogo, afim de evitar contaminações. As amostras foram identificadas com a data e número de cadastro do animal, sendo mantidas em estufa B.O.D (modelo 347, Florianópolis, Brasil) a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, examinadas semanalmente. No exame avaliou-se ausência de contaminação e buscava-se encontrar motilidade e morfologia característica de forma promastigota do parasita sempre procedendo-se o repique para outros tubos contendo meio novo. Este procedimento foi repetido a cada sete dias de um total de dois meses de avaliação.

5.3.3.3 Biópsia de pele

Para a coleta de um fragmento de pele, foi necessário sedação com a associação de três fármacos: cloridrato de ketamina (10mg/kg), midazolam (0,5mg/kg) e acepromazina (0,2mg/kg). Inicialmente foi realizada tricotomia da borda externa da orelha esquerda e antissepsia com iodo povidine e álcool iodado a 70%. Foi injetada com agulha 6 mm x 0,25 mm (de insulina), uma solução de anestésico local (cloridrato de lidocaína a 2%) e aguardado três minutos para ação da medicação. Com tesoura fina-fina reta foi realizada a coleta de tecido de 1cmx1cm de forma asséptica e acondicionado em eppendorf com solução de RNAlater. O RNAlater é um reagente de tecido e armazenamento de células aquoso, não-tóxico que estabiliza e protege o RNA celular, em amostras de tecidos e de células intactas não congeladas. RNAlater elimina a necessidade de processar as amostras imediatamente ou congelar as amostras em nitrogênio líquido para posterior processamento.

Com o fragmento de pele foi realizada a extração de DNA e a amplificação do material genético da mesma forma descrita anteriormente, com alvo molecular kDNA, com verificação da amplificação dos fragmentos de DNA de 120 pb foi feita com 8 μL do produto de PCR por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, corado com nitrato de prata.

5.3.4 Exames moleculares

A técnica de PCR foi realizada no Laboratório de Leishmanioses da FIOCRUZ - Centro de Pesquisa René Rachou .

5.3.4.1) Extração do DNA

A medula óssea coletada dos animais e o fragmento de pele foram submetidos à extração do DNA. A metodologia de extração seguiu as instruções do fabricante do Puregene Cell and

Tissue kit – QIAGEN. Fragmentos de 20 mg do tecido foram submetidos à lise enzimática a 55°C por 15 horas para digestão das proteínas e em seguida a digestão pela RNase a 37°C por meia hora. As proteínas desnaturadas foram então precipitadas pelo acréscimo de Solução de Precipitação de Proteínas. Após centrifugação, o DNA foi recuperado no sobrenadante, precipitado com solução isopropanol, centrifugado, foi realizada uma lavagem do pellet de DNA com etanol 70%, centrifugado, reidratado e armazenado a -20°C até o momento do uso.

5.3.4.2 kDNA e HSP70

Nas amostras de DNA extraídas dos pequenos mamíferos foram realizadas PCRs direcionadas a dois alvos:

- kDNA (DNA do cinetoplasto de *Leishmania*) utilizando os iniciadores A: 5'(C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3', gerando um fragmento de 120pb (Degrave et al., 1994). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 5µl do DNA molde, 0,75 µl de MgCl₂ a 50 mM, 1 µl de dNTP mix a 10 mM (Promega), 0,14 µl de Taq DNA polimerase platinum® a 5U/µl (Invitrogen), 1µl do iniciador kDNA A a 15 pmol e 1µl do iniciador kDNA B a 15 pmol (Eurofins mwg/operon). A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (Veriti – Applied Biosystems) utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por quatro minutos, seguindo de 35 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 60°C por 30s e extensão a 72°C por 30s. A extensão final foi a 72°C por 10 min.

- hsp70 (proteína de choque térmico de 70 kilodáltons) utilizando os iniciadores HSP70 senso: 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' e HSP70 anti senso: 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3', gerando um fragmento de 1300pb (Garcia et al., 2004). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 5µL do DNA molde, 0,75 µl de MgCl₂ a 50 mM, 0,5 µl de dNTP mix a 10 mM (Promega), 1,5 µl de DMSO 5,0% (Invitrogen), 0,25 µl de Taq DNA polimerase platinum® a 5U/µl (Invitrogen), 1µl do iniciador HSP70 for a 10 pmol e 1µl do iniciador HSP70 ver a 10 pmol (IDT, prodimol). A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (Veriti – Applied Biosystems) com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e alternando 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 61°C por 1 min e extensão a 72°C por 3 min, seguidos por um passo de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados nas PCRs dirigidas a ambos os alvos foram visualizados em exposição à luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel de agarose 2.0% corado com brometo de etídeo. A visualização e a captura das imagens foram obtidas através do Transluminador L Pix – Loccus Biotecnologia.

5.4 Análise Estatística:

Para a análise estatística dos resultados, recorreu-se ao programa GraphPad InStat 3. Foram utilizados métodos de estatística descritiva e como medidas estatísticas usaram-se frequências absolutas e percentuais (relativas) para a apresentação das variáveis estudadas em tabelas. Para a realização das associações estatísticas, foi utilizado o Teste Qui-Quadrado (χ^2), que foi escolhido por a amostra em causa ter uma dimensão pequena ($n=100$). Para as associações entre variáveis o nível de significância assumido foi $p < 0,05$, para um intervalo de confiança (IC) de 95%. O Teste de Qui-Quadrado é utilizado para o estudo de relações entre variáveis nominais, aplicando-se a uma amostra em que a variável nominal tem duas ou mais categorias, comparando as frequências observadas com as que se esperam obter no universo para se inferir sobre a relação existente entre as variáveis. Se as diferenças entre os valores observados e esperados não se considerarem significativamente diferentes, o valor do teste pertence à região de aceitação e as variáveis são independentes, caso contrário, rejeita-se a hipótese de independência, ou seja, os valores do teste pertencem à região crítica.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

6.1 Exames hematológicos:

Dos 100 animais analisados por hemograma, foram utilizados os parâmetros de hematócrito, plaquetas e leucócitos para melhor avaliação dos dados obtidos.

Na análise da série vermelha, os valores de referência para hematócrito variam de 24-45% (Kaneko et al., 1997; Latimer et al., 2003), a média (\bar{x}) dos valores obtidos foi de 40,7% com desvio padrão (s^2) de 4,7. Apenas 3% apresentaram anemia normocítica normocrômica, logo, não apresentavam indícios de resposta medular. Esta alteração é por provável causa patológica: leishmaniose felina (Pennisi, 2015), hemobartonelose ou doenças virais (FIV/FeLV). De acordo com Pennisi (2015) o tipo de anemia mais comum em casos de leishmaniose felina é do tipo normocítica e normocrômica devido ao parasitismo medular, o que por sua vez, pode culminar em uma depressão na formação de componentes sanguíneos que pode ser seletiva da eritropoiese, ou ainda, em associação com trombocitopenia e leucopenia.

Na análise dos trombócitos, os valores de referência variam de 300- 800 ($\times 10^3$) (Kaneko et al., 1997; Latimer et al., 2003), a $\bar{x}=260 \times 10^3$, com $s^2 =143,75$. Pela análise média pode-se perceber valores abaixo dos valores de referência, ou seja, 58% apresentavam trombocitopenia na contagem automática de células. Do total de animais analisados, 40% apresentaram agregados plaquetários na contagem diferencial realizada por lâmina em microscópio óptico, o que justificaria valores inferiores ao referencial felino (300.000), sem, no entanto, estar associado a nenhuma alteração clínica. Do total de animais, 32% apresentaram macroplaquetas, um achado comum em felinos, que não sugere patologias. Esse achado é característico pelo tipo de célula,

pela formação de agregados plaquetários (o que afeta a contagem total) e a presença de macroplaquetas. Desta forma, segundo Latimer et al.(2003), as alterações de trombocitopenia descritas devem ser analisadas apenas em conjunto com outras variações dos componentes sanguíneos, não apresentando confiabilidade quando interpretados de maneira isolada.

Na análise do leucograma, os valores de referência variam de 5,5- 19,5 ($\times 10^3$) (Kaneko et al., 1997; Latimer et al., 2003), \bar{x} = 16,67 $\times 10^3$, com s^2 = 8,3. Do total de análises, 39% dos felinos apresentaram leucocitose, com \bar{x} = 23,3 ($\times 10^3$) e s^2 = 5,2 ($\times 10^3$), indicando pela média obtida, leucocitose branda. Dos mesmos, 31% apresentaram características de leucocitose fisiológica: neutrofilia, eosinofilia e linfocitose, alterações no leucograma que condizem com estresse agudo: tais como punção venosa, medo ou excitação (Latimer et al., 2003). Do total de animais, 7 % dos felinos apresentaram leucopenia, com todos os avaliados apresentando linfopenia, o que pode ser justificado por contato com doenças virais (Garrido, 2012), dado este, que foi confirmado por correlação positiva na análise estatística nas avaliações de FIV/FeLV ($P \leq 0,05$).

ALTERAÇÃO HEMATOLÓGICA	PERCENTUAL DE ANIMAIS	OBSERVAÇÃO/ CAUSA
Anemia	3%	100 % Normocítica/Normocrômica → Patológica
Plaquetopenia	58%	40% agregados plaquetários / 32% macroplaquetas → fisiológica
Leucocitose	39%	31% estresse → fisiológica 8% infecção/ inflamação → patológica
Leucopenia	7%	100% linfopenia → patológica

Tab 1: Resultados de alterações hematológicas e causas.

6.2 Exames bioquímicos

As 100 amostras foram submetidos a exames bioquímicos de função renal (uréia, creatinina) função hepática (ALT, AST, GGT, FoAl), proteínas totais e frações (globulinas e albumina).

Na análise de função renal foi mensurada: uréia, cujos valores de referência variam de 10-60 (Kaneko et al., 1997; Latimer et al., 2003), obteve-se \bar{x} = 45,84 e s^2 = 2,86; creatinina, com valores de referência de 0,8 – 1,8, obteve-se \bar{x} = 1,65 e s^2 = 0,33. Do total de animais submetidos aos exames, 44% apresentaram aumento nos valores de uréia (\bar{x} dos alterados= 74 com s^2 = 19) e 29% apresentaram aumento em creatinina (\bar{x} dos alterados= 2,2 com s^2 =0,6) destes, deve-se

considerar uma parcela de aproximadamente 9% que apresentou indícios de desidratação (aumento de proteínas plasmáticas totais, aumento de hematócrito e indícios de desidratação pelo exame clínico – como aumento de turgor cutâneo e ressecamento de mucosas), logo houve hemoconcentração, elevando estes valores mensurados. Entretanto, ainda houveram animais (19%) acima dos valores de referência, podendo ser um indício de injúria renal aguda ou crônica. As lesões renais em animais portadores da leishmaniose, ocorrem por deposição de imunocomplexos em túbulos renais. Segundo Penissi (2015), a produção de anticorpos em felinos contaminados com o protozoário é menor que nos cães. Acredita-se que estes animais produzem imunidade celular em maior proporção que a humoral, desta forma, a injúria pode ocorrer, porém em menor frequência que nos cães.

Formas de *Leishmania* também se multiplicam em macrófagos do fígado, produzindo uma hepatite ativa crônica, desta forma a avaliação minuciosa do fígado se faz necessária em animais com suspeita de leishmaniose (HOFFMANN; LANGONI, 2007). Na avaliação hepática, foram dosadas 4 enzimas: AST, ALT, GGT e FoAl. A enzima AST apresenta valores de referência de 23-43 (Kaneko et al., 1997; Latimer et al., 2003), para tanto, nestas análises obteve-se $\bar{x} = 43,29$ e $s^2 = 26,21$. A enzima ALT apresenta referencial de 6-83 (Kaneko et al., 1997; Latimer et al., 2003) e foram obtidas $\bar{x} = 57,49$ e $s^2 = 23,43$. A mensuração de GGT apresenta valores de referência entre 1,3-5,3 (Kaneko et al., 1997; Latimer et al., 2003) e foram obtidas $\bar{x} = 4,09$ e $s^2 = 6,69$. A enzima FoAl apresenta referencial de 25-93 (Kaneko et al., 1997; Latimer et al., 2003) e foram obtidas $\bar{x} = 34,65$ e $s^2 = 28,14$. Do total de análises, 50% dos animais apresentaram aumento em AST, 7% apresentaram valores da enzima ALT superiores aos valores de referência, 28% apresentaram aumento em GGT e 56% aumento em FoAl. A alteração mais relevante foi observada em ALT, pois se trata de uma enzima livre no citoplasma dos hepatócitos, logo para que esta se encontre na circulação sanguínea, ocorreu lesão celular, sendo assim a melhor enzima para determinação de lesão hepática. Já as alterações em AST e FoAl são enzimas hepáticas menos relevantes, pois AST encontra-se no citoplasma de hepatócitos, mas também em músculo cardíaco e esquelético, não sendo uma enzima hepato-específica. A FoAl é uma enzima de indução sintetizada no fígado, osteoblastos, epitélio intestinal, renal e placenta; sendo assim pequenas alterações no organismo resultam alterações enzimáticas, o que justifica mais da metade dos animais apresentarem valores aumentados nesta enzima. As alterações em GGT podem ser justificadas, pois assim como a FoAl, é uma enzima de indução sintetizada em quase todos os tecidos corporais, principalmente no pâncreas e nos rins. A lesão hepática aguda e colestase podem provocar

elevação imediata da atividade dessa enzima devido à liberação de fragmentos de membrana que contém GGT (HOFFMANN; LANGONI, 2007).

Na análise de proteinograma, as proteínas totais (Pt) apresentam valores de referência de 5,4-7,8 (Kaneko et al., 1997; Latimer et al., 2003), e obteve-se $\bar{x}=7,85$ e $s^2=0,68$. A albumina apresenta valores de referência de 2,1-3,3, e foram obtidas $\bar{x}=3,10$ e $s^2=0,50$. Já a mensuração de globulinas apresenta valores de referência entre 2,6-5,1 e foram obtidas $\bar{x}=6,21$ e $s^2=1,07$. Do total de amostras submetidas a mensuração, 82% apresentaram aumento no valor de proteínas totais e 90% apresentaram alteração em globulinas, destes 88% apresentaram o valor superior ao valor de referência, o que pode ser justificado por infecções, inflamações agudas ou crônicas. Do total de amostras, 39% apresentaram o valor de albumina alterado, sendo 30% abaixo do valor de referência, o que pode ser justificado pelo fato de esta proteína ser caracterizada como "fase aguda negativa", ou seja, em ocorrências de inflamações, seu valor mensurável seria abaixo do valor de referência, o que corrobora com o achado no aumento das globulinas, sendo um indício de inflamação nestes animais. Já os outros 9% que apresentaram valores acima do referencial, apresentaram outros indícios como aumento de hematócrito e de sólidos totais na hematologia, justificando assim um quadro de desidratação.

ALTERAÇÃO BIOQUÍMICA	PERCENTUAL DE ANIMAIS	OBSERVAÇÃO/ CAUSA
Alteração renal	 44% uréia  29% creatinina	9% desidratação 19% lesões em uréia/creatina → injúria renal
Alteração hepática	 50% AST  7% ALT  28% GGT  56% FoAI	7% lesão hepática Outras enzimas → Alterações menos específicas no âmbito de lesão
Proteinograma	 82% Ptf  88% Glob  30% Alb	Inflamação/ Infecção → 88% com aumento de globulinas e 30% com redução em albumina Desidratação → 9% com aumento de albumina, sólidos totais e hematócrito

Tab 2: Resultados de alterações bioquímicas e causas.

6.3 Resultados obtidos dos exames de imunocromatografia:

Dos 100 animais avaliados pela técnica de imunocromatografia pelo teste Alere Leishmaniose, não foi encontrado nenhum animal positivo, ou seja, em nenhum felino foi detectado a presença do antígeno rK28.

Já dos 100 animais testados para FIV/FelV, 2% apresentaram positividade para a detecção de anticorpos IgG do Vírus da Imunodeficiência Felina e 26% apresentaram resultado positivo para detecção de antígenos p27 do Vírus da Leucemia Felina através da técnica de imunocromatografia.

6.4 Resultados obtidos por exame sorológico

O teste sorológico realizado foi o RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) Imunodot específico para felinos na titulação e 1:40. Após a leitura constatou-se 54% com resultados positivos. Como já citado, é possível a reação cruzada com outros *Trypanosomas*, porém, o número de animais positivos é demasiadamente elevado para ser justificado apenas por reações cruzadas. Nos animais positivos para RIFI, foram englobados 1 de 2 animais que apresentou resultado positivo para o FIV e 20 de 26 animais que apresentaram resultados positivos para o FelV.

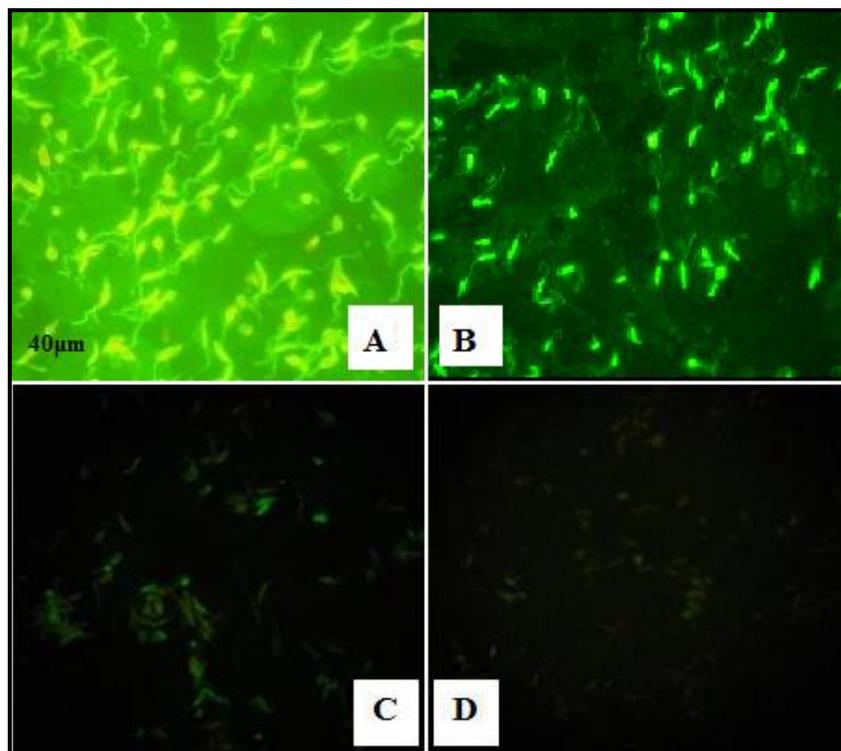


Fig 1: Aspecto de várias amostras pela técnica de RIFI de *Leishmania*, titulação 1:40. A - Controle positivo para *Leishmania*, B - Amostra positiva para a infecção por *Leishmania*; C - Amostra com positividade fraca para a infecção por *Leishmania*; D - Amostra com resultado negativo.

Após realização do teste sorológico, os animais foram submetidos à punção de medula óssea e demais testes parasitológicos.

6.5 Resultados obtidos à partir de testes realizados por amostra de medula óssea.

Após realização do procedimento de punção de medula, foi coletada amostra para divisão entre os procedimentos de: Pesquisa de *Leishmania* em lâminas, PCR e cultura de *Leishmania*.

6.5.1 Pesquisa de *Leishmania* em lâminas

Das quatro lâminas produzidas pela técnica de esfregaço sanguíneo, foram escolhidas as duas de maior qualidade para corar e estas, foram avaliadas por um microscópio óptico na objetiva de 100x. Do total de lâminas produzidas, coradas e analisadas não foram visualizadas formas amastigotas de *Leishmania* em nenhuma lâmina.

6.5.2 Cultura

Em meio NNN-LIT estéril acondicionado em estufa e examinadas semanalmente, avaliou-se através de microscopia óptica, a ausência de contaminação. Procedeu-se realizando o repique em um total de 8 semanas, e não foi observado motilidade e morfologia característica de forma promastigota do parasita em nenhuma cultura.

6.5.3 Método molecular para análise de medula óssea e biópsia de pele

Após a extração de DNA da medula óssea e da pele, foram realizadas duas técnicas distintas, o kDNA, que visa a amplificação de 120 pares de bases e outra, o HSP70, que visa a amplificação de 1300 pares de bases. Após a realização do PCR, a verificação da amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada em gel de agarose, onde não se obteve nenhum resultado com mesmo peso molecular que as amostras controle de *Leishmania* spp.

6.6 Resultados comparados:

A análise da dispersão de frequência utilizou o teste de qui quadrado (χ^2), e quando o resultado obtido de p for igual ou menor que 0,05 existiu diferença significativa entre extratos (categorias).

Na análise de Qui quadrado foi comparado os resultados obtidos no exame sorológico (RIFI) com os resultados hematológicos e bioquímicos.

Do total de animais analisados, 3% dos animais apresentaram anemia normocítica normocrômica e todos estes se encontram inclusos em sorologia positiva por RIFI para LV (100%). De 58% dos animais que apresentaram plaquetopenia, 42% encontram-se inclusos em sorologia positiva (72%). Já dos 39% que apresentaram leucocitose, apenas 10% apresentou sorologia positiva em RIFI (25%), o que reforça o achado de leucograma de estresse na maioria

destes animais, já citado anteriormente, não relacionado assim, com indícios de infecção ou inflamação. Dos 7% dos felinos que apresentaram leucopenia, todos apresentaram sorologia positiva (100%). Desta forma, pela análise de qui quadrado, houve diferença significativa entre os grupos com anemia, plaquetopenia e leucopenia, ou seja $P \leq 0,05$. Apesar do parasitismo medular ser menor nos felinos, Maia e Campino (2011) apontaram que sinais de hipoplasia medular, ou seja, redução da produção de componentes sanguíneos (hemácias, plaquetas e leucócitos) pode ser caracterizado como sinal de leishmaniose felina.

ANÁLISE ESTATÍSTICA	P valor
Anemia	0,01 ^{QQ}
Plaquetopenia	0,05 ^{QQ}
Leucopenia	0,01 ^{QQ}

Tab 5: Análise de χ^2 comparativas das alterações hematológicas com o teste sorológico, encontrou-se $P \leq 0,05$ em anemia, plaquetopenia e leucopenia.

Em vista da comparação de exames bioquímicos com o exame sorológico, encontrou-se 44% dos animais com sorologia positiva para LV pela técnica de RIFI. Do total de animais analisados, 44 % apresentaram aumento em uréia, destes, 33 estavam inclusos no grupo de animais com sorologia positiva (75%); o mesmo ocorreu com 29% dos animais que apresentaram aumento em creatinina e destes, 19 estavam inclusos no grupo de animais com sorologia positiva (65,5%). Desta forma, os resultados englobaram em grupos com diferença estatística os marcadores biológicos de alterações renais, o que sugere que a presença de anticorpos anti-*Leishmania* está associada com deposição de imunocomplexos, que podem levar a glomerulonefrite, responsável pelo aumento de uréia/creatinina.

Na análise do proteinograma, 82% dos animais apresentaram aumento de proteínas totais, 88% apresentaram hiperglobulinemia e 30% apresentaram hipoalbuminemia. Dos 54% dos animais positivos no exame sorológico, todos apresentaram hiperglobulinemia (100%) e dos 30% com hipoalbuminemia, 29 (96,69%) estavam inclusos em na sorologia positiva. Sendo assim, pela análise de χ^2 , obteve-se diferença significativa estatisticamente entre os extratos analisados, o que justifica por este meio que a hiperglobulinemia (aumento da proteínas inflamatórias) e a hipoalbuminemia (redução da albumina \rightarrow proteína de fase aguda negativa) estão correlacionados e podem, assim, ser justificados pela sorologia positiva; como citado por Pennisi (2015) a hiperglobulinemia é um sinal comumente encontrado em felinos testados e confirmados para LV.

Nas análises de enzimas hepáticas: 7% apresentaram valores da enzima ALT superiores aos valores de referência, e destes, 100% apresentou sorologia positiva para LV, o que na análise

estatística demonstrou diferença significativa entre o extrato de ter alteração em ALT e ter exame sorológico positivo, com ambos os resultados negativos; logo P valor encontrado foi $P \leq 0,05$. Do total de análises, 50% dos animais apresentaram aumento em AST e destes 12% encontraram-se inclusos no exame sorológico positivo, 28% apresentaram aumento em GGT e destes 25% apresentaram RIFI positivo, e 56% dos animais avaliados apresentaram alteração em FoAI, sendo que destes 51% estavam inclusos em RIFI positivo. Porém destas enzimas, nenhuma apresentou diferença estatística significativa quando comparados aos exames sorológicos. Isso corrobora com o fato de a presença de anticorpos estar relacionada com uma possível lesão hepática, uma vez que de todas as enzimas analisadas, apenas ALT (única enzima exclusivamente hepática) obteve resultados estatisticamente significantes quanto ao exame sorológico específico para felinos testado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA	P valor
Uréia	0,01 ^{QQ}
Creatinina	0,02 ^{QQ}
Globulinas	0,00 ^{QQ}
Albumina	0,00 ^{QQ}
ALT	0,00 ^{QQ}

Tab 6: Análise de χ^2 comparativas das alterações bioquímicas com o teste sorológico, encontrou-se $P \leq 0,05$ em uréia, creatinina, globulinas, albumina e ALT.

Na avaliação comparada do exame sorológico com os testes rápidos, obteve-se 2% do total de animais positivos para FIV (destes apenas 1 apresentou positividade também no RIFI - 50%) e 26% positivos para FeLV (sendo destes, 22 apresentaram positividade no RIFI - 84,61%). Pela análise estatística, apenas os resultados de FeLV foram estatisticamente significativos, ou seja, apesar de Pennisi (2013) ter citado uma possível reação cruzada na detecção dos anticorpos anti-*Leishmania* com anticorpos para FeLV, neste caso isso não foi confirmado, uma vez que a técnica utilizada pesquisa antígenos p27 do vírus da leucemia felina. Desta forma, a hipótese a ser levantada pode ser de aumento da prevalência de *Leishmania* em felinos quando associada a alguma doença imunossupressora de base (FeLV, por exemplo).

Ainda para a análise estatística, foi realizado um estudo de caso controle, onde os animais foram agrupados em 4 grupos distintos: animais positivos para RIFI e negativos para FeLV (34%), um grupo de animais positivos para RIFI e positivos para FeLV (22%), um grupo de animais negativos para RIFI e positivos para FeLV (4%) e por fim um grupo de animais negativos para RIFI e negativos para FeLV (32%). Após análise, houve diferença estatística significativa entre

os extratos, o que mais uma vez firma a hipótese da relação de retrovíroses imunossupressoras com a presença de anticorpos anti-*Leishmania*.

Além disso, uma hipótese que tem sido levantada é a produção de imunidade celular e humoral conjunta nos felinos, o que levaria a possibilidade de debelar a infecção por leishmaniose, ou seja, sem permanecer a presença do parasito, tornando-a mais difícil de ser detectada, porém associada a produção de anticorpos detectáveis (técnica sorológica), ou seja, uma resposta conjunta Th1 e Th2.

Devemos pensar na possibilidade de mudar a direção em busca do diagnóstico de leishmaniose felina, talvez o aprofundamento na imunologia da doença neste hospedeiro, a pesquisa de outras doenças imunossupressoras, como PIF, toxoplasmose, esporotricose, etc. uma vez que utilizamos todas as etapas, as quais na rotina clínica obtemos sucesso no diagnóstico de cães e não obtivemos sucesso na detecção do parasito. Existe a possibilidade desses animais realmente não possuírem a infecção por *Leishmania infantum* ou de não ter sido possível detectar a doença nos animais testados.

7. CONCLUSÃO

Felinos de gatil localizado em cidade endêmica para leishmaniose visceral canina apresentaram alterações hematológicas, bioquímicas, presença de retrovíroses e de anticorpos anti-*Leishmania*, no entanto a presença do parasita na medula óssea ou na pele não foi confirmada por métodos parasitológicos e moleculares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABBAS, A.B.; LINHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular, Rio de Janeiro: Elsevier, p. 288 e 297. 2008.

ALVES PIRES, C. Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal. Tese de doutorado em Medicina Veterinária. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. p 9-17. 2008.

ALVAR, J., YACTAYO,S., BERN, C. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol. 22, 552–557. 2006.

ALVAR, J., VÉLEZ, I.D., BEM, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012; 7: e35671.

ARORA, S.K. ; KAUR,D.; SEHGAL,S.; DATTA,U. Identification of sero-specific epitope of recombinant heat shock protein (HSP70) of *Leishmania donovani*. Journal of Parasitic Disease, 24: 21-26. 2008

ARORA, S.K.; MELBY, P.C.; SEHGAL, S. Lack of serological specificity of recombinant heat shock protein 70 of *Leishmania donovani*. *Immunology and Cell Biology*, (73): 446-451. 1995

ATTAR, Z.J.; CHANCE, M.L.; EL-SAFI, S.; CARNEY, J.; AZAZY, A.; EL-HADI, M.; DOURADO, C.; HOMMEL, M.. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Tropical*, 78: (1): 11-16. 2001.

BANETH, G., KOUTINAS, A.F., SOLANO-GALLEGO, L., BOURDEAU, P., FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitology*, 24 (7), July 2008, pp. 324-30. 2008.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.28, p.329-337, 2006.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7 (3), p.328-337, 2004.

BOARI, A.; VITA, S.; PETROTTA, E.; LUCIANI, A.; BRITTI, D. Feline leishmaniasis: serological investigation in Abruzzo. *Proc. Third World Congress on Leishmaniasis, Palermo-Terrasini 10–15 April 2005*, p.115. 2005.

BRAY, R. S. The zoonotic potencial of reservoirs of leishmaniasis in the old world. *Ecol. Dis.* v.1, p.257-267, 1982.

CARDOSO, L. Estudos de infecção canina por *Leishmania* no Alto Douro. Tese de doutorado em Medicina Veterinária. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 205f. 2004.

CARDOSO, L., LOPES, A.P., SHERRY, K. & SCHALLIG, H. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet. Parasitol.* v.174 (1–2), pp. 37–42, 2010.

CHANG, KP, FONG, D, BRAY, RS. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: K.P.Chang & R.S.Bray eds *Leishmaniasis*, elsevier London 1-30.1985.

CORTES S.J.C. Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal. Tese (Doutorado)–Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 163 p. 2008.

COSTA, T. A. C; ROSSI, C.N; LAURENTI, M.D; GOMES, A. A.D; VIDES, J.P; SOBRINHO, L. S. V; MARCONDES, M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área

endêmica para leishmaniose visceral. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 213-217, 2010.

DANTAS- TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 48 (3), 151–156. 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South América. *Parasites & Vectors* v. 2, p 1-8. 2009.

DESJEUX, P., Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* v.14, p.417–423. 2004.

DEGRAVE, W., FERNANDES, O., CAMPBELL, D., BOZZA, M., LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463-469. 1994.

DURRANI, A.Z; DURRANI, H.Z; KAMAL, N. Prevalence of *Leishmania* in Sand Fly in Pakistan. *Pak. J. of Zoo.* v.44, n.1, p. 61-65, 2012.

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal disease of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 1, p. 71-76, 2013.

FAKHAR M. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2008.

FISSORE C. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004.

GARCIA L. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004.

GARRIDO, J.M.C.B.G. Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por *Leishmania Infantum* em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 115f. 2012.

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 202f. 1993.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181, pp. 23-30. 2011.

GRAMICCIA, M., GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* v.35 p.1169-1180. 2005.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, v.22 n.9. p.439-445. 2006.

KANEKO, J.J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic, 1997. 932p.

KOEHLER, K., STECHELE, M., HETZEL, U., DOMINGO, M., SCHONIAN, G., ZAHER, H., BURKHARDT, E. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* v.109. p.9-17. 2002.

JUNIOR M.S.C.L. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2009.

LAISON, R., RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 811–827. 2005.

LAINSON, R., SHAW, J.J. Evolution classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. 1st ed. London: Academic Press 1987; 1-120.

LATIMER, K.S. *Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology*. 4.ed. Ames: Iowa State, 2003. 468p.

MAIA, C. & CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, v.27 (8), p.341-344. 2011.

MANCIANTI, F. Feline Leishmaniasis: What's the epidemiological role of the cat? *Vet. Parasitol.* v.46 (1-2) p.203-206. 2004.

MARY C. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004.

MAROLI, M., PENNISI, M. G., DI MUCCIO, T., KHOURY, C., GRANDONI, L., GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* v.145 p.357-360. 2007.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOS-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* v.30, n.145, p.267-273, 2007.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNÁNDEZ, S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 48, n. 3-4, p. 209-220, 1995.

MICHALICK, M. S.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, p. 67-83. 2007.

MINISTRY OF HEALTH, Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (Brasil), Brasília. 2014.

MURRAY, H.W.; MOREIRA, A.L.; LU, C.M.; DeVECCHIO, J.L.; MATSUHASHI, M.; MA, X.; HEINZEL, F.P. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 188, p. 458-464, 2003.

NAVARRO, J.A., SANCHEZ, J., PENATIEL-VERDU, BUENDIA, A.J., ALTIMIRA, J., VILAFRANCA, M. Histopathologica lesions in 15 cats with leishmaniosis. *Comp Pathol* 143: 297-302. 2010.

NEAFIE, R.C., CONNOR, D.H. Visceral leishmaniasis. *Pathol. Trop. Dis.* vol.1. Institute of Pathology, Washington, DC, p.265-277. 1976.

OZON, C., MARTY, P., PRATLONG, F., BRETON, C., BLEIN, M., LEVIÈVRE, A., HAAS, P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet. Parasitol.* v.75, p. 273-277. 1998.

PENISSI, M.G., HARTMANN, K., LLORET, A., ADDIE, D., BELÁK, S., BOUCRAUT-BARALON, C., EGBERINK, H., FRYMUS, T., GRUFFYDD-JONES, T., HOSIE, M.J., LUTZ, H., MARSILIO, F., MOSTL, K., RADFORD, A.D., THIRY, E., TRUYEN, U., HORZINEK, M.C. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*, 15(7):638–642. 2013.

PENNISI, M.G., CARDOSO, L., BOURDEAU, P., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., OLIVA, G., SOLANO GALLEGO, LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. v.8. P.302. 2015.

PENNISI, M. G., VENZA, M., REALE, S., VITALE, F. Case Report of leishmaniasis in four cats. *Vet. Res. Commun.*, v.28 p.363-366. 2004.

PETERSEN, C. A.; ESCH, K.J. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, p.74, 2013.

PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S.Y.; SLAPPENDEL, R.; FRAGIO, C.; RUITENBERG, E.J.; BERNADINA, W.; RUTTEM, V.P.M.G. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 69, p. 121-126, 1999.

PIRAJÁ, G. V; SILVA, D. T; PERUCA, L. C. B; ALVES, M. F; PAIXÃO, M. S; LUCHEIS, S. B; SANTOS, W. J; GUIRALDI, L. M. Leishmaniose Felina- Revisão de Literatura. *Rev. Vet. e Zoo.* v.20 n.2. FMVZ UNESP- Botucatu, SP- Brasil. 2013.

PITA-PEREIRA, D.; SOUZA, G. D.; ZWETSCH, A.; CALVES, C.R.; BRITTO, C.; RANGEL, E.F. Short Report: first report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a Periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 4, p. 593-595, 2009.

POLI, A., ABRAMO F., BARSOTTI P., LEVA S., GRAMICCIA M., LUDOVISI A., MANCIANTI F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet. Parasitol.* v.106 p.181-191. 2002.

RÊBELO, J.M.C.; LEONARDO, F.S.; COSTA, J.M.L.; PEREIRA, Y.N.O.; SILVA, F.S. Flebotomíneos (Dyptera, Psychodide) de área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estado do Maranhão, Brasil. *Caderno de Saúde Pública.* v. 15, n. 3, p. 623-630, 1999.

REY, L. *Parasitologia.* 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, , p. 214-240. 2001

ROGERS, M.; CHANCE, M.; BATES P. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology*, 124 (5), pp. 495-507. 2002.

ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, M. Controlo f Visceral Leishmaniasis in Latin America – A Systematic Review. *PLos Neglected Tropical Diseases*, 4(1), e584, 2010.

Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. Further notes on leishman's bodies. *Br Med J* 1903; 2: 1261-1401.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 88, p. 21-30, 2002.

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

SERGENT, E. T.; LOMBARD, J.; QUILICHINI, M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la meme habitation. *Bulletin de Societé de Pathologie Exotique*, v. 5, p. 93-98, 1912.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J. Vector Borne Dis.* v.45 n.4 p.255–272, 2008.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 577-579, 2006.

SOBRINHO, L.S.V., ROSSI, C.N., VIDES, J.P., BRAGA, E.T., GOMES, A.A.D., LIMA, V.M.F., PERRI, S.H.V., GENEROSO, D. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* v.187 (1-2). p.302-306. 2012.

SOBRINHO; L.S.V. Validação da intradermoreação de montenegro para o diagnóstico de leishmaniose em felinos Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária. Araçatuba. 88f. 2014.

SOLANO-GALLEGO, L., FERNÁNDEZ-BELLON, H., SERRA, P., GÁLLEGO, M., RAMIS, A., FONDEVILA, D., FERRER, L. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Vet. J.* v.35 p.320-323. 2003.

SOLANO-GALLEGO, L; KOUTINAS, A; MIRÓ,G; CARDOSO, L; PENNISI, M.G; FERRER, L; BOURDEAU, P; OLIVA, G; BANETH, G. Direction for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* v.165. p.1-18. 2009.

TELLERIA J. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental Parasitology*. 2006.

TOMÁS, A. & FREITAS ROMÃO, S. Leishmaniose Canina. Capítulo I: Biologia do parasita. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., p.7-26. 2008.

VAN DER LUGT, J. J., CARLYON, J. F. AND DE WAAL, D. T. Cutaneous leishmaniosis in a sheep. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* v. 63 p.74-77. 1992.

VITA, S., SANTORI, D., AQUZZI, I., PETROTTA, E. & LUCIANI, A. Feline Leishmaniasis and Ehrlichiosis: Serological Investigation in Abruzzo Region. *Veterinary Research Communications*, 29 (2), pp. 319–321. 2005.

VOTÝPKA, J., D'AVILLA-LEVY, C.M., GRELLIER, P., MASLOV, D.A., LUKES, J. & YURCHENKO, V. New approaches to systematics of Trypanosomatidae: Criteria for taxonomic (re)description. *Trends in Parasitology* 31: 460–469. 2015.

WALLACE G.R.. Mapping of a visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* Hsp70. *Infection and Immunity*, 1992.

WEAVER, C.T.; HATTON, R.D.; MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Reviews Immunology*, v. 25, p. 821-852, 2007.

WILLIAMS, A. O., MUTINGA, J. AND RODGERS, M. Leishmaniasis in a domestic goat in Kenya. *Mol. Cell. Probes.* v. 5 p.319-325. 1991.

ANEXO 1

Resenha: _____

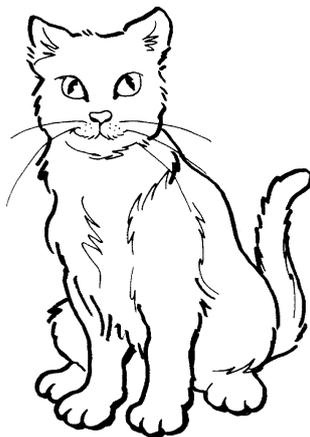
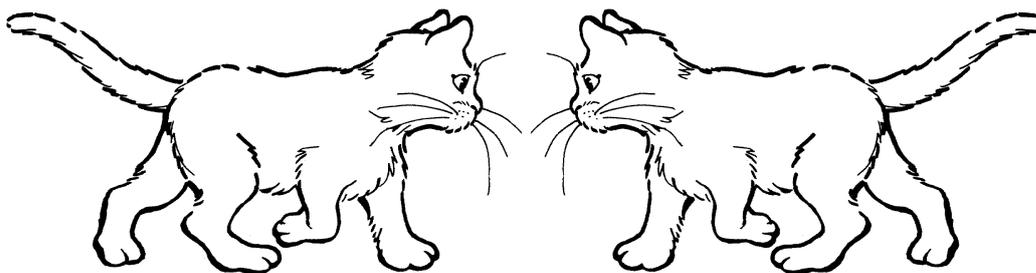
____/____/____

Animal: _____ Chip: _____

Sexo: _____ Idade aproximada: ()jovem ()adulto ()idoso

Raça: _____ Habitat: ()exterior ()interior ()misto

Pelagem: _____(desenhe alterações de pelagem,)



Estado nutricional: ()ruim ()regular ()bom ()obeso

Temperamento: ()dócil ()intermediário ()arisco

Exame Clínico:

Peso: _____ Mucosas: ()hipocoradas ()normocoradas ()congestas

Linfonodos: () não palpáveis ()normais ()reativos Temperatura: _____

Hidratação: () normal () desidratado --> grau de desidratação: _____

TPC: _____ FC: _____ FR: _____ Alterações: _____

Palpação abdominal: () sem alteração () sensibilidade () órgão aumentado

Qual (is)? _____

Pelagem: () quebradiça () normal () brilhante () descamação

Outras observações: _____