



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE ESTÁGIO
SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO NA ÁREA DE
DOENÇAS PARASITÁRIAS**

**NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *Leishmania infantum*(NICOLLE,1908)**

GABRIEL DE ARAÚJO LOBÃO

NOSSA SENHORA DA GLÓRIA-SERGIPE

2020

Gabriel de Araújo Lobão

Trabalho de conclusão de estágio supervisionado obrigatório na área de doenças parasitárias

Níveis séricos de vitamina D em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)

Trabalho apresentado à Coordenação do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Victor Fernando Santana Lima

Nossa Senhora da Glória-Sergipe

2020

GABRIEL DE ARAÚJO LOBÃO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO NA ÁREA
DE DOENÇAS PARASITÁRIAS**

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Victor Fernando Santana Lima (Orientador)
Núcleo de Medicina Veterinária – UFS

Profa. Dra. Geyanna Dolores Lopes Nunes
Núcleo de Medicina Veterinária – UFS

Profa. Dra. Roseane Nunes de Santana Campos
Núcleo de Medicina Veterinária – UFS

Nossa Senhora da Glória-Sergipe
2020

IDENTIFICAÇÃO

ALUNA: Gabriel de Araújo lobão

MATRÍCULA Nº: 201500433410

ORIENTADOR: Prof. Dr. Victor Fernando Santana Lima

LOCAL DO ESTÁGIO

1- Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (LDPAD/UFRPE).

Endereço: Rua Dom Emanuel de Medeiros S/N, Bairro Dois Irmãos na Cidade de Recife- Pernambuco. Tel: 3320-6422

Supervisor: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

Carga horaria: 680 horas

COMISSÃO DE ESTÁGIO DO CURSO:

Profa. Dra. YndyraNayan Teixeira Carvalho Castelo Branco

Profa. Dra. Debora Passos Hinojosa Schaffer

Profa. Dra. Monalyza Cadori Gonçalves

Prof. Dr. Victor Fernando Santana Lima

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, meus avós e meus tios. O carinho, afeto, dedicação e

cuidado de vocês permitiram o meu avanço, mesmo durante os momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A minha família em especial, minha mãe, Alyne Almeida de Araújo, meus avós, José Dantas de Araújo e Vera Lucia Almeida de Araújo, e meus tios, Tarciso Almeida de Araújo, Joemia Almeida de Araújo e Acácia Almeida de Araújo, que me apoiaram de todas as formas possíveis para conseguir realizar este trabalho, sendo base fundamental, com apoio sentimental, moral e financeiro. E que me amparou, apostando e crendo que tudo isso é o começo de muitas das minhas realizações.

Aos meus amigos, Izaura Nicolly Oliveira Santos, Elpidio Vicente dos Santos Júnior, Fernanda, Natália Luise Santana de Oliveira, Joyce Santana Filho, Geovania Rezende, Iris Gisele, Abraão e José Douglas Felix de Sá, e aos que sempre me apoiaram e em momentos de incerteza, clarearam e acalmaram minha mente com pequenas conversas e simples feitos. As palavras tem um poder enorme, ainda mais quando se acompanhadas de ações.

Ao meu orientador, Victor Fernando Santana Lima, que me guiou ao decorrer desse percurso, depositando sua confiança no meu progresso, tanto com críticas construtivas como por elogios.

A professora Roseane Nunes de Santana Campos, que me orientou durante o PIBIC com todo respeito, paciência e humanidade, concedendo-me a possibilidade de desenvolver o gosto tanto pela pesquisa, como pela área de doenças parasitárias.

A todos os que compõem o Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) da UFRPE, em especial ao Prof. Dr. Leucio Câmara Alves, coordenador do LDP, por todo apoio e por proporcionarem um ambiente acolhedor e participativo para o desenvolvimento do meu ESO.

Em especial, quero agradecer ao meu Pai, Idalino Mauricio Pinho Lobão (*in memoriam*), que apesar de toda dificuldade, sempre me guiou para um futuro melhor.

EPÍGRAFE

“Nós não precisamos de magia para mudar o mundo,
nós carregamos todo o poder que precisamos já
dentro de nós: o poder de imaginar o melhor.”

(J.K Rowling)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de exames e técnicas empregadas na rotina do LDP/UFRPE no período do ESO.....	19
Tabela 2. Tipos de amostras e número de pesquisas realizadas.....	26
Tabela 1. Principais sinais clínicos observados nos cães que participem desse estudo.....	38
Tabela 2. Níveis séricos de 25(OH)D nos cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hospital Veterinário Escola (HVE) do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFRPE.....	17
Figura 2. Laboratório de Doenças Parasitárias do HVE da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).....	18
Figura 3. Planta baixa da estrutura do LDP/UFRPE.....	19
Figura 4. Visualização de microfilária em aumento de 40x.....	22
Figura 5. Identificação de endoparasita, <i>Toxocara cati</i>	22
Figura 6. (a) <i>Otodectes cynotis</i> ; (b) <i>Demodex canis</i> ; (c) <i>Knemidokoptes</i> sp.....	23
Figura 7. (a) Oocisto de <i>Cystoisospora</i> spp.; (b) Ovo de <i>Ancylostoma</i> spp.....	25
Figura 8. Técnica de Mini-FLOTAC.....	25
Figura 9. Visualização de amastigota de <i>Leishmanias</i> spp. dentro de macrófago.....	27
Figura 10. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.....	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Hematozoários diagnosticados no DPP do UFRPE, no período de 01 de Julho a 01 de Novembro de 2019.....	21
Gráfico 2. Distribuição dos ectoparasitas encontrados na rotina laboratorial do LDP.....	23
Gráfico 3. Proporção das espécies animais avaliados coproparasitologicamente durante o período de estágio no LDP do UFRPE/ Recife- PE.....	24
Gráfico 4. Distribuição do número de animais atendidos no Ambulatório de Doenças Parasitárias, de acordo com a suspeita clínica.	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESO	Estágio Supervisionado Obrigatório
LDPAD	Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
LDP	Laboratório de Doenças Parasitárias
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
HVE	Hospital Veterinário Escola
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
SRD	Sem Raça Definida
DPP	Dual Pack Platform
25 (OH) D	25 Hidroxivitamina D
1,25 (OH) D	1,25 Hidroxivitamina D
OMS	Organização Mundial da Saúde
LV	Leishmaniose Visceral
IL-2	Interleucina-2
IL-12	Interleucina-12
IL-4	Interleucina-4
IL10	Interleucina-10
IFN- γ	Interferon- γ
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante-B
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

DBP	Vitamin D Binding Protein
HGPT	HipoxantinaGuanina Fosforiboxiltransferase
BID	Duas vezes ao Dia
SID	Uma vez ao Dia
VO	Via Oral
NO	Óxido Nítrico
7DHC	7-Dehydrocholesterol
VRD	Receptor de Vitamina D
PTH	Hormônio da Paratireoide
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO.....	17
2.1. Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos.....	17
2.1.1. Estrutura Física do Laboratório de Doença Parasitárias dos Animais Domésticos da UFRPE.....	18
2.1.2. Descrição das Atividades Desenvolvidas.....	19
2.1.2.1. Pesquisa de Hematozoário.....	20
2.1.2.2. Pesquisa de Microfilaria.....	21
2.1.2.3. Identificação de Endoparasita.....	22
2.1.2.4. Identificação de Ectoparasita.....	23
2.1.2.5. Exames Coproparasitológicos.....	24
2.1.2.6. FLOTAC.....	25
2.1.2.7. Mini-FLOTAC.....	25
2.1.2.8. Teste Imunocromatográfico para Pesquisa de Anticorpos Anti- <i>Leishmania</i>	26
2.1.2.9. Pesquisa de Amastigota de <i>Leishmania</i> spp.....	27
2.1.3. Casuística da Rotina Ambulatorial do Laboratório de Doenças Parasitárias.....	27
3. REVISÃO DE LITERATURA	28
3.1. Leishmaniose Visceral Canina.....	28
3.2. Ciclo Biológico.....	30
3.3. Patogenia e Sinais Clínicos.....	31
3.4. Diagnóstico da LVC.....	32
3.5. Tratamento da LVC.....	33
3.6. Controle da LVC.....	34
3.7. Vitamina D e sua relação com a LVC.....	34

3.7.1. Síntese Cutânea e Metabolismo de Vitamina D.....	35
3.7.2. Mecanismo de Ação da Vitamina D.....	36
4. NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Leishmania infantum</i> (NICOLLE,1908)	37
4.2. Introdução.....	37
4.3. Material e Métodos.....	38
4.4. Resultados.....	38
4.5. Discussão.....	39
4.6. Conclusão	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

RESUMO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso mostra as atividades técnicas desenvolvidas pelo discente Gabriel de Araújo Lobão no período de 01 de julho a 01 de novembro de 2019 no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, dentro da disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) da Universidade Federal de Sergipe, campus do Sertão. As atividades foram desenvolvidas na área de Doenças Parasitárias sob a supervisão do Prof. Dr. Leucio Câmara Alves e orientação do Prof. Dr. Victor Fernando Santana Lima. O objetivo deste trabalho é relatar as atividades realizadas no período do ESO, descrevendo toda a rotina clínica e laboratorial executada pelo discente, além de apresentar um estudo realizado durante o estágio, no qual foi avaliado os níveis séricos de vitamina D de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

1. INTRODUÇÃO

O médico veterinário apresenta um papel importante diante da sociedade, não apenas para o controle da qualidade de vida animal, como também como um profissional que atua na área da saúde pública.

A medicina veterinária preventiva é uma especialidade que tem como objetivo a promoção e proteção da saúde, além da vigilância da saúde das populações, sejam animais ou humanas. Assim, a nível veterinário, os especialistas que se dedicam à medicina preventiva encarregam-se de proteger e manter a saúde dos animais antes que a doença apareça.

Nos últimos anos, as pesquisas em doenças parasitárias como, por exemplo, leishmaniose, dirofilariose, babesiose, erliquiose e anaplasmosetomaram-se indispensáveis. Por isso o parasitologista veterinário tornou-se peça chave na equipe clínico-laboratorial.

Sendo assim, o estágio curricular supervisionado foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizada na Rua Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos – CEP: 52171-900- Recife/PE, no período de 01 de Julho a 01 de Novembro, totalizando 680 horas, sob supervisão do Professor Dr. Leucio Câmara Alves.

A escolha do LDP como local de estágio ocorreu devido a UFRPE ser umas das universidades mais antigas do Brasil, ao seu renome nacional e internacional e ao grande número de pesquisas na área de doenças parasitárias de animais domésticos e silvestres.

O presente relatório tem como objetivo apresentar as atividades acompanhadas e desenvolvidas durante o período de realização do estágio obrigatório supervisionado na área de Parasitologia Veterinária, além de um estudo realizado para avaliação da mensuração de Vitamina D em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

2. RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

2.1 Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos

O estágio curricular foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais (LDP) do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), durante o período de 01 de Julho a 01 de Novembro de 2019, com carga horaria semanal de 40 horas, totalizando 680 horas.



Figura 1. Hospital Veterinário Escola do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE
Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

O LDP faz parte do Hospital Veterinário Escola (HVE) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) (**Figura 1 e 2**), e situa-se à Rua Manoel de Medeiros, S/N, bairro Dois Irmãos, na cidade de Recife. Seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira das 8h00min às 12h00min e das 14h00min às 18h00min.



Figura 2. Laboratório de Doenças Parasitárias do HVE da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Possuindo mais de 15 pesquisadores entre residentes, mestrandos, doutorandos e estagiários. Além disso, o LDP funciona como laboratório didático para as aulas teórico-práticas das disciplinas Parasitologia dos Animais Domésticos e Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, ministrada pelo Prof. Dr. Leucio Camara Alves.

2.1.1 Estrutura física do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da UFRPE

O LDP está situado no Hospital Veterinário Escola da UFRPE e todos os seus setores encontram-se próximo, permitindo assim a interação entre as diferentes áreas da medicina veterinária. O LDP é constituído por diferentes instalações, sendo três salas dos professores, sala de Estudo e Reuniões, banheiro masculino e banheiro feminino, copa, sala de Diagnóstico Sorológico, dois Almoxarifados, sala de Diagnóstico Parasitológico de Hemoparasitos, sala de Biologia Molecular, sala de Microscopia Ótica, sala de Microscopia de Imunofluorescência, sala de Diagnóstico Parasitológico de Endoparasitas, Ectoparasitos e Insetário (**Figura 3**)

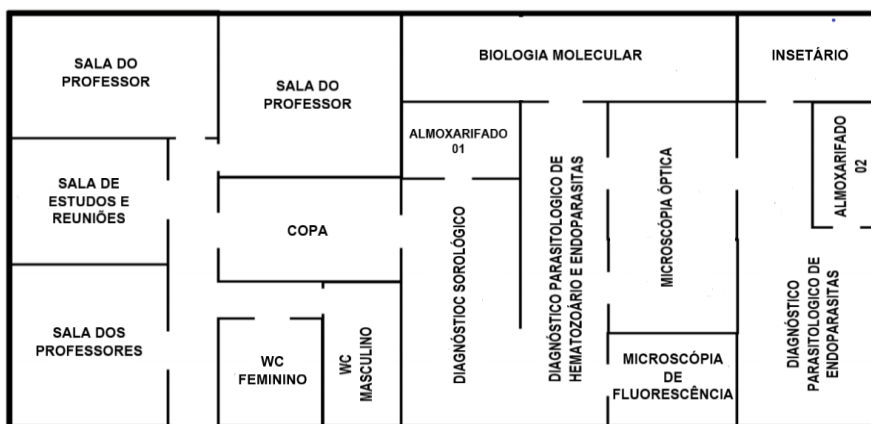


Figura 3: planta baixa da estrutura do LDP/UFRPE. Fonte: Arquivo pessoal (2019).

2.1.2. Descrição das Atividades Desenvolvidas

Durante o período foi possível desenvolver as seguintes atividades: atendimento clínico de cães naturalmente infectados com parasitos, sendo alguns de importância em saúde pública, coleta de amostras biológicas para diagnóstico de enfermidades parasitárias (**Tabela 1**), o acompanhamento e auxílio nas atividades de pesquisa aplicadas a doenças parasitárias também foram realizados, além da participação em aulas teóricas e práticas da disciplina Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos.

Tabela 1. Número de exames e técnicas empregadas na rotina do LDP/UFRPE no período do ESO.

EXAME	TÉCNICA	Nº de AMOSTRAS
Pesquisa de hematozoários	Esfregaço Sanguíneo	118
Pesquisa de microfilária	Knott modificado	13
Exames coproparasitológicos	FLOTAC e Mini-FLOTAC	53
Identificação de endoparasitos	Avaliação Morfológica do verme adulto	03
Identificação de ectoparasitos	Raspado de pele/Tricograma	28
Teste sorológico para LVC	Imunocromatografia	298
Pesquisa de <i>Leishmania</i> spp.	Pesquisa direta*	141
TOTAL		654

*amostras de medula óssea, pele e linfonodos.

2.1.2.1. Pesquisa de Hemoparasitos

Os hemoparasitos são agentes (protozoários, bactérias e nematódeos), que, obrigatoriamente, parasitam células sanguíneas de cães e gatos (DURANTE, 2012), promovendo complicações no hospedeiro, como anemia hemolítica, trombocitopenia, insuficiência renal, podendo evoluir para óbito.

As hemoparasitoses são transmitidas biologicamente durante o repasto sanguíneo de carrapatos, principalmente pelo *Rhipicephalus sanguineus*, pelos gêneros *Amblyomma* e *Anocentor*, possuindo importância no ciclo de algumas destas enfermidades (Torres et al., 2004).

Os hemoparasitos encontrados na rotina clínica foram: *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp., *Hepatozoon* sp. e *Haemobartonella* sp. (BREDA et al., 2018; BURR, 1982; ALMOSNY & MASSARD, 2002; SALGADO, 2006).

A técnica para o diagnóstico de hematozoários mais utilizada no LDP é o estiramento sanguíneo. Sendo assim, durante o período de estágio foram avaliados 104 estiramentos sanguíneos provenientes da rotina ambulatorial do HVE da UFRPE. Do total de 104 animais avaliados, uma amostra de bovino e equino foi avaliada, respectivamente, assim como duas amostras de felinos. As outras 100 amostras de sangue eram pertencentes a cães, sendo que 58 não possuíam raça definida (SRD) e 42 eram de raça definida: Poodle, Labrador, Pit Bull, Rottweiler, Buldogue Francês, Pinscher, Daschund e Pastor suíço. Os caninos apresentavam faixa etária entre 1 ano a 14 anos de idade, e 48 eram machos e 52 fêmeas.

As amostras de bovino, equino e felino avaliadas hemoparasitologicamente, foram negativas. Nas amostras caninas, 75% (79/104) estavam negativas para Hematozoários, entretanto 25% (26/104) estavam positivas, sendo identificado: *Anaplasma platys* (80%), *Hepatozoon* sp. (16%) e *Ehrlichia* sp. (4%) (**Gráfico 01**).

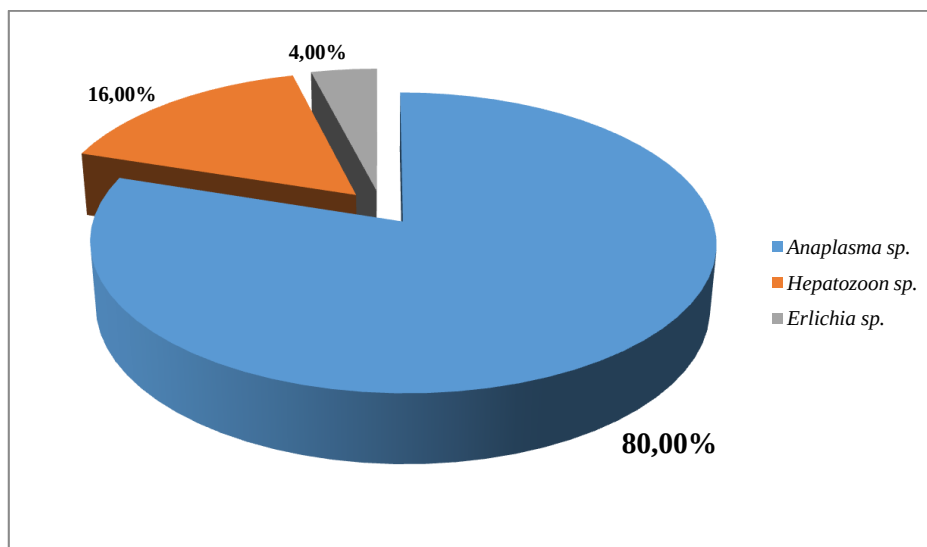


Gráfico01. Hematozoários diagnosticados no LDP da UFRPE, no período 01 de Julho a 01 de Novembro de 2019.

2.1.2.2. Pesquisa de microfilária

A *Dirofilaria immitis* é um nematódeo filarídeo de cães e gatos. O verme adulto localiza-se no lado direito do coração e vasos sanguíneos adjacentes dos carnívoros, causando lesões cardíacas, pulmonares e renais (RAELINGS & CALVERT, 1992).

O diagnóstico da dirofilariose é baseado no encontro de microfilária no sangue. As técnicas de detecção de microfilária utilizadas no LDP incluem gota espessa (KNIGHT, 1977) ou Knott (Newton & Wright, 1956), sendo esta última a mais utilizada no laboratório.

No período de estágio foram encaminhadas, para LDP da UFRPE, amostras sanguíneas de 13 cães, seis machos e sete fêmeas com faixa etária entre 1 a 9 anos de idade. Destes, seis eram SRD, e sete pertenciam às raças Labrador, Pastor Alemão, Boxer e Pitbull.

Dentre as 13 amostras analisadas, 75% (9/13) foram negativas, enquanto 25% (4/13) foram positivas no teste de Knott para presença de microfilária no sangue (**Figura 04**).

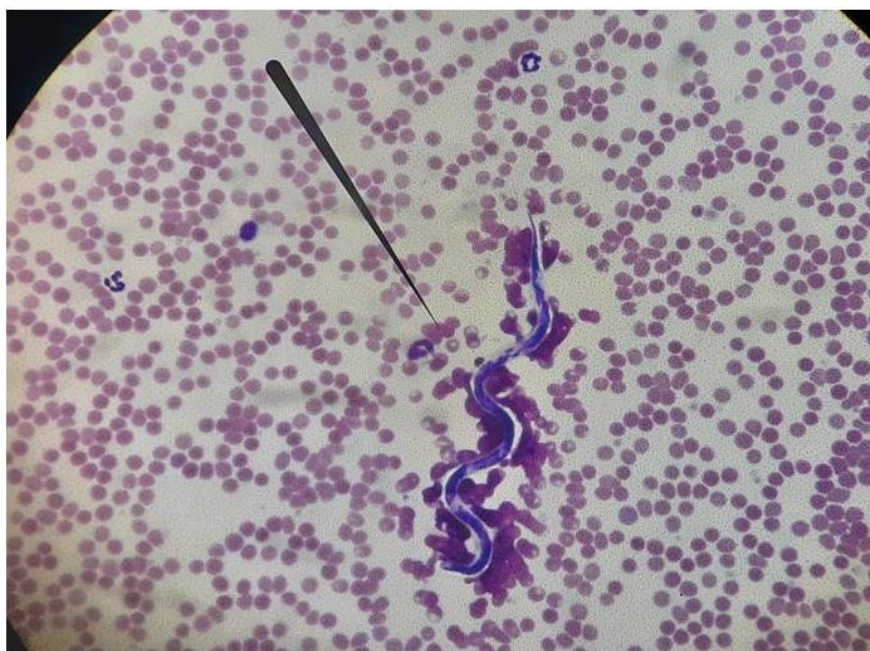


Figura 4. Visualização de microfilária em aumento de 40x. Fonte: Arquivo pessoal (2019).

2.1.2.3. Identificação de endoparasitos

A técnica de identificação de endoparasita consiste na clarificação da amostra com lacto fenol de Amann. Depois do processo de clarificação que tem como objetivo a redução na camada de quitina dos parasitos, os exemplares eram depositados em placas de Petri e encaminhado para visualização no microscópio óptico. Assim, no período do ESO foi avaliado apenas uma amostra de endoparasito, oriundo de um gato do HVE. De acordo com as características morfológicas foi identificado como *Toxocara cati* (**Figura 5**).



Figura 5. Identificação de endoparasito, *Toxocara cati*. Fonte: Arquivo pessoal (2019).

2.1.2.4. Identificação de ectoparasitos

Para a técnica de identificação de ectoparasita deve ser realizado o raspado profundo da pele do animal, que deve estar contido para que seja realizado a escarificação da pele utilizando uma lâmina de bisturi até que a mesma sangre levemente. O material é colocado em uma lâmina de microscopia e corado em método de Romanowsky e encaminhado para leitura em microscópio óptico.

No período do ESO foram analisadas 28 amostras com suspeita de ectoparasitos, dentre eles quatro amostras de felinos, 21 amostras de caninos e duas amostras de periquitos australianos. Das 28 amostras analisadas, 25% (7/28) foram positivas. Os ectoparasitas encontrados foram: *Demodex canis*, *Otodectes cynotis*, ambos em cães e *Knemidocoptes* sp. em periquito-australiano. (**Figura 6**) (**Gráfico 02**).

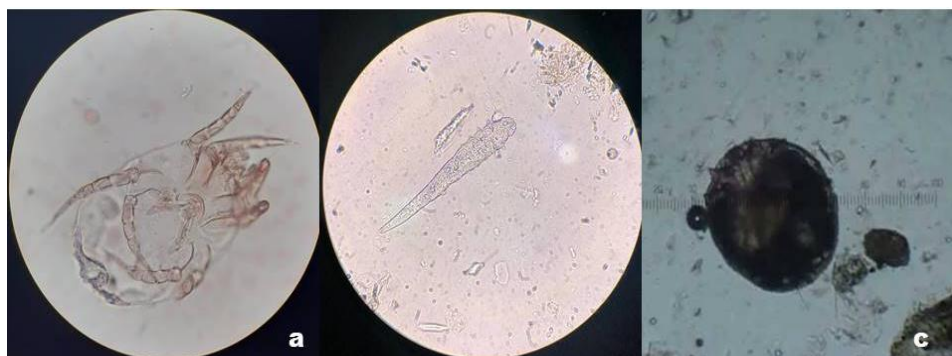


Figura6. (a) *Otodectes cynotis*; (b) *Demodex canis*; (c) *Knemidokptes* sp. Fonte: Arquivo pessoal (2019).

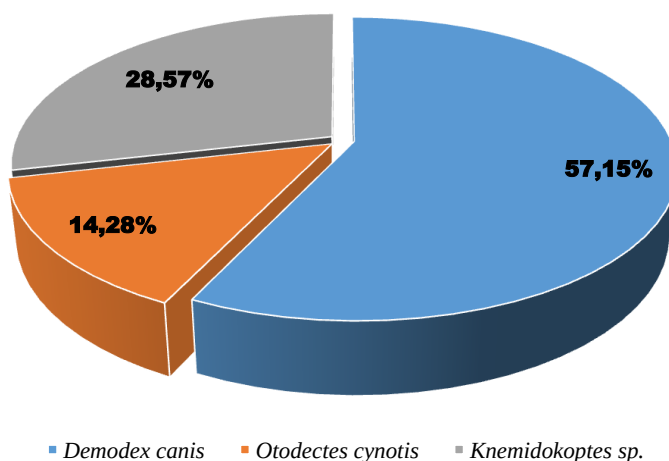


Gráfico 02. Distribuição dos ectoparasitos encontrados na rotina laboratorial do LDP.

2.1.2.5. Exame coproparasitológico

No período do ESO, foram analisados 56 amostras de fezes de diferentes espécies de animais domésticos, exóticos e silvestres, sendo: 36 cães (*Canis familiaris*), 04 gatos (*Feliscatus*), 10 mercol (*Rattusnorvegicus*), 01 bovino (*Bostaurus*), 01 equino (*equuscaballus*), 02 periquitos-australianos (*Melopsittacusundulatu*), 01 ovino (*Ovis aires*) e 01 caprino (*Capra hircus*) (**Gráfico 03**).

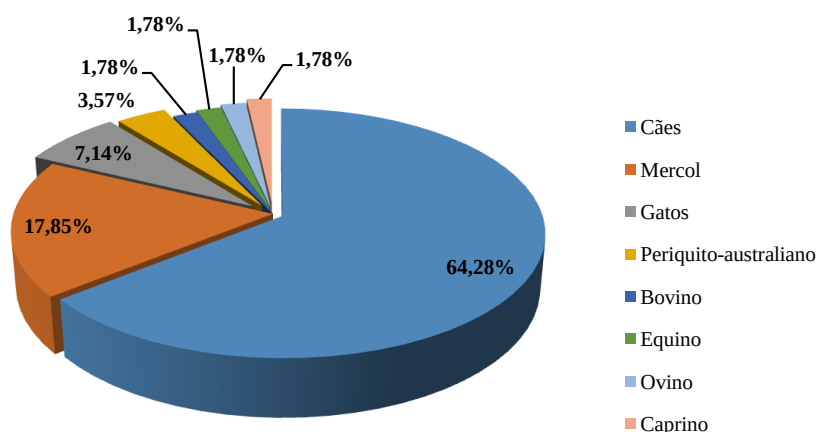


Gráfico 03. Proporção das espécies animais avaliadas coproparasitologicamente durante o período de estágio no LDP da UFRPE/Recife-PE.

2.1.2.6. FLOTAC®

Atécnica de FLOTAC® é a principal técnica utilizada no LDP. A técnica consiste em misturar 2g de fezes em 18 mL de água, homogeneizar a amostra até diluir e depois tamisar em peneira forrada com gaze. Deposita-se a solução em um tubo Falcon e centrifuga a 1500 rpm por 3 min. O sobrenadante é descartado e o que decantou é dividido em valores iguais em dois tubos Falcon, onde acrescenta-se 6 mL de solução hipersaturada de cloreto de sódio (NaCl) em um e no outro mais 6 mL de solução hipersaturada de sulfato de zinco (ZnSO₄). Homogeneiza-se com o auxílio da pipeta de Pasteur e preenche a câmara de FLOTAC® de maneira inclinada, evitando a formação de bolhas. Posteriormente, realiza-se uma nova centrifugação por 5 min. Após esta etapa rotacional a chave e realiza-se a leitura no microscópio (CRINGOLI et al., 2010).

Das 36 amostras de cães, 44,4% (16/36) foram positivos, sendo os parasitos gastrointestinais encontrados: *Ancylostoma* spp. 22,2% (8/36) e *Toxocara canis* 5,5% (2/36), *Cystoisospora* spp. 16,6% (6/36) (**Figura 07**); em gatos foram detectados *Toxocara cati*

66,6%(4/6), *Giardia* spp. 33,3% (2/6); e em pequenos ruminantes ovos da superfamília Trichostrongyloidea 100% (2/2) e oocistos de *Eimeria* spp. 100% (2/2). Já nas amostras de psitacídeos, foram detectados cistos de *Giardia* spp. 20% (1/5); e ovos de *Parascaris equorum* 100% (1/1) em fezes de um equino.

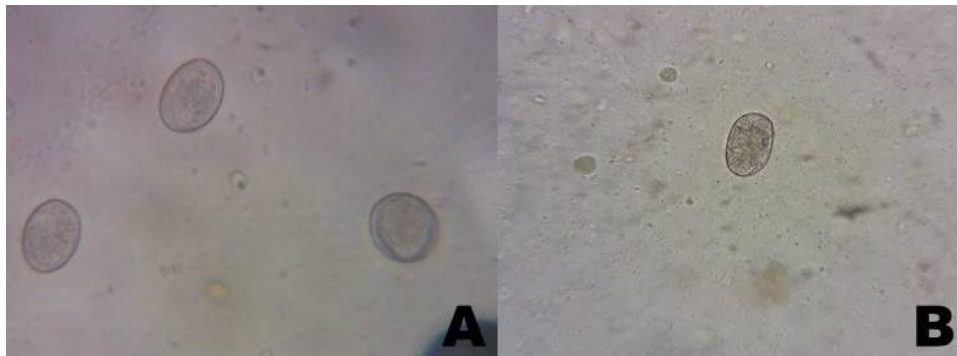


Figura 7. (A) oocisto de *Cystoisospora* spp.; (B) ovo de *Ancylostoma* spp. Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

2.1.2.7. MINI-FLOTAC

A técnica de Mini-FLOTAC® consiste na diluição de 2g de fezes em 18 mL de solução saturada e homogeneizada, e tamisada com o auxílio de uma peneira. A câmara de Mini-FLOTAC é vertida e então preenchida. Deixe repousar por 10 min, desloque e retire a chave da câmara. Em seguida, realize a leitura em microscópio óptico.

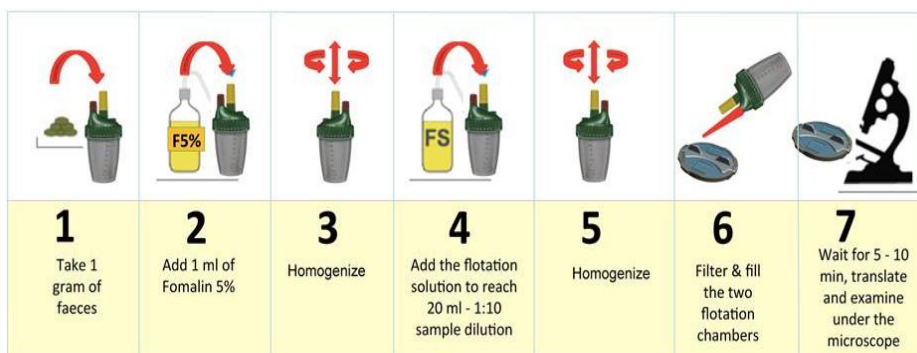


Figura 8. Técnica de Mini – FLOTAC. Fonte: Cringoli et al. (2015).

Dentre os parasitos detectados por meio desta técnica, destacam-se em cães ovos de *Ancylostoma* spp. 66,6% (4/6), oocistos de *Cystoisospora* spp. 50% (3/6); e em caprinos e

ovinos oocistos de *Eimeria* spp. 100% (2/2) e ovos da superfamília Trichostrongyloidea 100% (2/2).

2.1.2.8. TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania*

O exame sorológico utilizado no LDP para pesquisa de anticorpos ANTI-*Leishmania* é o kit TR DPP® Bio-Manguinhos. O DPP é realizado através da amostra de sangue, soro ou plasma no poço indicado na placa do teste juntamente com duas gotas da solução tampão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), promovendo a ligação do antígeno com os anticorpos. Após 5 minutos, são adicionadas quatro gotas da solução tampão no segundo poço, ligando os conjugados aos anticorpos, caso estejam presentes, corando a linha teste e posteriormente a linha controle, validando assim o teste.

Dentre os 298 testes imunocromatográfico realizados durante a rotina do estagio, 25,8% (77/298) foram positivos, enquanto 74,8% (221/298) foram negativos.

2.1.2.9. PESQUISA DE AMASTIGOTAS DE *Leishmania* spp.

A pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. é realizada a partir amostras de medula óssea, esternal ou ilíaca, obtida através de punção aspirativa, citologia de linfonodo, submandibular, ou raspado de pele, lesionada ou integra. É confeccionada uma lâmina através de “squash”. Esta lâmina é secada naturalmente e em seguida fixada e corada pelo método de Romanowsky e levada à leitura em microscópio óptico em busca de amastigotas de *Leishmania* spp. (Figura 09).

Durante o período de 1 de Julho a 1 de Novembro, foram realizados 76 punções de medula óssea esternal, 08 punções de medula óssea ilíaca, 65 aspirado de linfonodo e 43 raspados de pele, totalizando 192 amostras. (Tabela 2)

Tabela 2. Tipos de amostras e número de pesquisas realizadas.

AMOSTRA	Nº DE COLETAS
Punção de medula óssea esternal	76 (39,58%)
Punção de linfonodo	65 (33,85%)
Raspado de pele	43 (22,40%)
Punção de medula ilíaca	8 (4,17%)
Total	192 (100%)

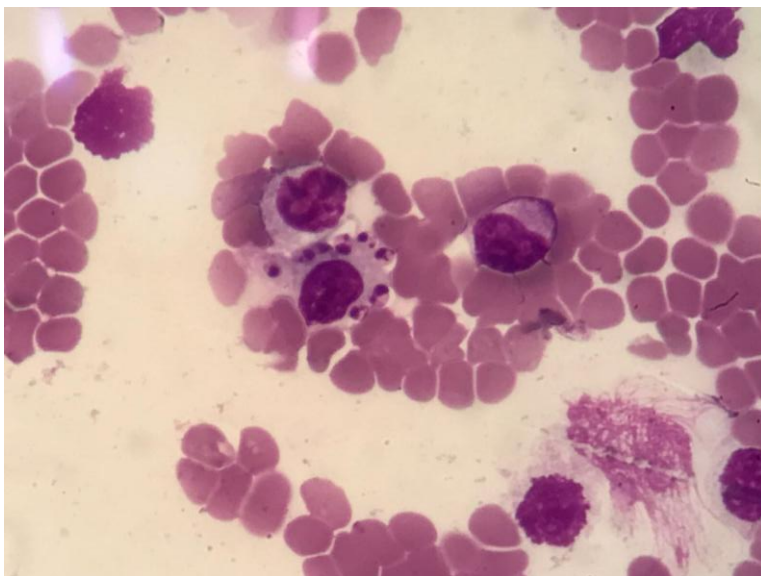


Figura 9. Visualização de amastigotas de *Leishmania* spp. dentro de macrófago. Fonte: Arquivo pessoal(2019).

2.1.3. CASUÍSTICA DA ROTINA AMBULATORIAL EM DOENÇAS PARASITÁRIAS

No período de estágio, foram atendidos no LDP, 72 cães com suspeita de leishmaniose e 7 cães com suspeita de dirofilariose (**Gráfico 04**).

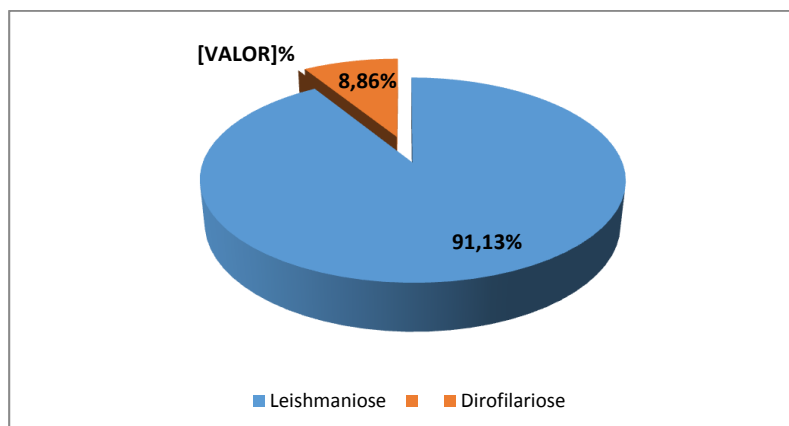


Gráfico 04. Distribuição do número de animais atendidos no Ambulatório de Doenças Parasitárias, de acordo com a suspeita clínica.

Os cães com suspeita de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) são submetidos a coleta de sangue e punção de medula óssea. Contudo, quando o animal apresenta linfadenomegalia e lesões cutâneas são realizadas a punção de linfonodo, citologia esfoliativa da pele, e outros testes quando necessário. Além da solicitação de hemograma e bioquímica sérica.

Dos 72 cães com suspeita de leishmaniose, 24% (17/72) eram assintomáticos. No entanto, 76% (55/72) dos animais apresentavam alterações clínicas, sendo as principais alterações identificadas: alterações dermatológicas (84%), linfadenomegalia (87%), onicogribose (73%) e alterações oculares (64%).

Os resultados hematológicos dos cães positivos para *Leishmania* spp. demonstraram alterações sanguíneas em 76% (55/72) dos animais. Anemia normocítica normocrômica, anemia normocítica hipocrômica, trombocitopenia, hiperproteinemia foram identificados em 54% (30/55), 46% (25/55), 84% (46/55), 92% (50/55) dos pacientes, respectivamente.

Alterações nos padrões bioquímicas foram identificadas em 33% (16/55), sendo níveis elevados de ureia em 24% (4/16), níveis elevados de creatinina em 37% (6/16), e azotemia em 21% (3/16) dos animais.

Dos sete cães com suspeita clínica de dirofilariose, 60% (4/7) foram positivos no método de Knott. Destes, 100% (4/4) eram machos, e todos os animais apresentavam histórico de tosse, dificuldade respiratória, fadiga e moravam perto do litoral.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose de caráter crônico, com acometimento sistêmico, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e comumente transmitida pelo flebótomo *Lutzomyia longipalpis* durante o repasto sanguíneo, sendo o cão considerado o principal reservatório do ciclo urbano da doença. (GONTIJO, 2004)

A *Leishmania infantum* é um protozoário flagelado do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), da família Trypanosomatidae (DOFLEIN, 1901; WOODCOCK, 1906.) e da ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963; VICKERMAN, 1976). A ordem Kinetoplastidas são caracterizadas por possuírem uma única mitocôndria, denominada cinetoplasto.

A *Leishmania* é um parasita digenético completando o seu ciclo biológico em dois hospedeiros, um mamífero vertebrado no qual desenvolve-se a forma intracelular e com flagelo interno, chamada amastigota e um díptero flebotomíneo que aloja a forma flagelada extracelular infectante, denominada promastigota (SCHLEIN, 1993). As promastigotas apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 10 µm e flagelo livre, enquanto as amastigotas apresentam corpo ovoide, medindo entre 2,1 e 3,2 µm e flagelo interno (PÊSSOA & MARTINS, 1982).

Atualmente, existem mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* distribuídas mundialmente, sendo reconhecidos dois grandes grupos de *Leishmanias*: o grupo que causa a leishmaniose tegumentar (leishmaniose cutânea e mucocutânea) e, o grupo que causa a leishmaniose visceral. O grupo da leishmaniose tegumentar é composto por sete espécies, entre as principais estão a *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensi* e *Leishmania braziliensis*. Enquanto que o grupo da leishmaniose visceral é composto pelas leishmanias pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, que compreende a *Leishmania donovani*, a *Leishmania chagasi* e a *Leishmania infantum*, sendo esta última causadora da leishmaniose visceral canina no Brasil (MICHALICK & GENARO, 2005).

A leishmaniose visceral é uma doença vetorial e com ampla distribuição geográfica. Atualmente, a LV é endêmica em mais de 88 países, sendo Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão responsável por 95% dos casos (OMS, 2017). Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo a cada ano, principalmente na África, Américas e algumas regiões do Sudeste Asiático, acometendo sobretudo pessoas com baixo nível socioeconômico (OMS, 2017).

No Brasil, a LV está presente em cerca de 21 estados brasileiros, em especial na região Nordeste. Durante o período de 2010 a 2014 foram registrados 17 mil casos novos de LV, sendo que 70 % dos casos ocorrem em Aracaju (Sergipe), Araguaína (Tocantins), Bauru (São Paulo), Belo Horizonte (Minas Gerais), Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Fortaleza

(Ceará), Montes Claros (Minas Gerais), São Luís (Maranhão) e Teresina (Piauí). (OMS, 2017)

A leishmaniose visceral canina costuma preceder a leishmaniose visceral humana. Além disso, devido ao grande número de cães infectados, ao intenso parasitismo cutâneo e o maior contato com humanos, o cão é considerado principal fonte de infecção para os vetores no ciclo urbano (REGUERA et al., 2016). No entanto, assim como o homem, é apenas um hospedeiro acidental do parasito (SILVEIRA et al, 1997).

A LVC representa um grave problema de saúde pública. A leishmaniose visceral canina apresenta cerca de 90% dos casos em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. Na América, 95% dos casos ocorrem no Brasil, atingindo as cinco regiões brasileiras e 21 estados, sendo a região nordeste responsável por aproximadamente 50% dos casos do país (OPS/OMS, 2016).

3.2 Ciclo biológico da *Leishmania*

A *Leishmania* é um parasito heterogenético, ou seja, o agente passa por transformações no organismo do vetor (DANTAS TORRES, 2006), flebotomíneo, que apresenta a forma promastigota no seu intestino e glândulas salivares, e um hospedeiro definitivo, que apresenta a forma amastigota (KASPER et al., 2017).

O ciclo inicia-se com a inoculação de formas amastigotas metacíclica durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomo infectado em um indivíduo sadio. Ao atingirem a circulação sanguínea, as formas promastigota são fagocitadas por células do Sistema Reticulo endotelial (SRE), e diferenciam-se em formas amastigotas, multiplicando-se por divisão binária. Os macrófagos, repletos de amastigotas, rompem-se ocasionando a liberação de novas amastigotas que serão fagocitadas por novos macrófagos (PALTRINIERI et al., 2010).

A infecção do flebotomíneo ocorre quando a fêmea faz o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado ingerindo as amastigotas de *Leishmania* spp. existentes no interior dos macrófagos. No interior do flebotomo, as amastigotas se reproduzem por divisão binária, transformam-se em promastigota (BRASIL, 2014), reiniciando assim o ciclo.

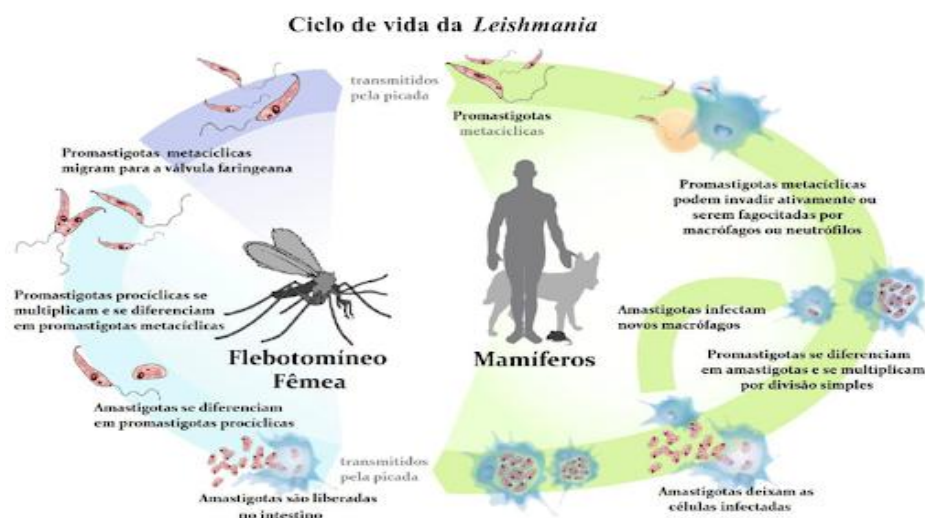


Figura 10. Ciclo biológico da *Leishmania* sp. Fonte: Vetsmart

[RN1] Comentário: É essa fonte mesmo?

No ciclo urbano, o cão é considerado o principal reservatório da enfermidade, e podem desenvolver os sinais da doença. Todavia, no Brasil, duas espécies canídeos tem sido relatada como reservatórios do ciclo silvestre: a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), cachorro-domato (*Cercopithecus thomasi*) e nos gambás da espécie *Didelphis albiventris*. Além destes, equídeos e roedores também têm sido descritos como reservatórios. Eventualmente, pesquisas mostram evidências de que o gato pode se comportar como reservatório da leishmaniose visceral, uma vez que tem a capacidade de transmitir o protozoário ao vetor (AFONSO et al., 2017; BRASIL, 2006).

3.3 Patogenia e sinais clínicos da LVC

Após a inoculação das formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, ocorre inicialmente uma resposta inflamatória local na pele do hospedeiro, onde ocorre a fagocitose da *Leishmania* pelas células do Sistema Reticulo endotelial, principalmente macrófagos, dando origem a uma cadeia de eventos (REIS et al., 2006).

Durante a fase ativa da leishmaniose, o parasito se multiplica no interior das células do sistema Reticulo endotelial, estas atuam como células apresentadoras de antígeno, estimulando a ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (MACHADO, 2014).

A resposta do tipo Th1 ou resposta celular é considerado uma resposta pró-inflamatória, onde ocorre a produção de Interleucinas-2 e -12 (IL-2 e IL-12), Interferon gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF), que tem sido associada ao controle da infecção por ativação dos macrófagos e destruição parasitária através da imunidade celular mediada e

citotoxicidade (AMEEN,2010). Enquanto que a resposta Th2 ou resposta humoral está associado a produção de citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , que favorecem a multiplicação dos parasitos, inibindo a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados por IFN- γ (GOMES-SILVA et al. 2007), citocinas estas capazes de inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e sua consequente produção de IFN- γ e TNF (BARATTA-MASINI et al., 2007).

Os cães podem ser classificados com base na sintomatologia clínica em duas apresentações distintas: sintomáticos e assintomáticos (MARTINS et al.,2015). Os animais sintomáticos podem apresentar alterações clínicas distintas, geralmente progredindo para a morte. Já os animais assintomáticos não apresentam sintomatologia clínica, porém são capazes de transmitir o parasito, tornando difícil o estabelecimento de medidas de controle da doença (REIS et al., 2010; SEVÁ et al., 2016).

Dentre os sinais clínicos mais comuns da LV podemos citar as dermatopatias (dermatites ulcerativa, nodular, papular e esfoliativa), alopecia, onicogribose, anorexia, linfadenomegalia, alterações articulares e alterações oftálmicas, tais como conjuntivite e uveíte (MARTINS et al., 2015; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014; SOLANO-GALLEGO et al., 2017; PALTRINIERI et al., 2016).

3.4 Diagnóstico da LVC

O diagnóstico da LVC ainda apresenta dificuldades devido à falta de especificidade dos sinais clínicos e presença de animais assintomáticos. Sendo assim, torna-se necessário a utilização de diagnóstico laboratorial, a exemplo de exames sorológicos (imunofluorescência indireta - quantitativa, ELISA - quantitativo e testes rápidos – qualitativos. Parasitológicos (citologia, cultura, imuno-histoquímica) e moleculares (PCR convencional e RT-PCR). (MIRÓ et al., 2017; MAIA e CAMPINO, 2012).

Segundo o Brasileish (2019), o diagnóstico da leishmaniose visceral canina pode ser realizado através do diagnóstico sorológico, parasitológico e molecular. (**Tabela 3**)

Tabela 3. Método diagnóstico da leishmaniose visceral canina segundo Brasileish (2019)

MÉTODO	TÉCNICAS
Diagnóstico sorológico	Reação imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), testes imunocromatográficos
Diagnóstico parasitológico	Citologia, histologia, cultura
Diagnóstico molecular	PCR (convencional ou quantitativa)

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi utilizado a partir da década de 60 (GENARO, 2000), apresentando sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximadamente de 80% para amostras de soro. A principal limitação da técnica é a ocorrência de reações cruzadas, reduzindo a especificidade do teste. (GONTIJO; MELO, 2004). Em cães, o resultado considerado reagente é aquele em que o título é igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:60 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. O animal é considerado soropositivo quando apresenta valores da densidade ótica igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte (*Cut-Off*).

Távora et al. (2007), realizou um estudo de validação comparativo entre as técnicas de ELISA e RIFI, tendo como valores de concordância de 97,6%, classificada como forte.

O diagnóstico parasitológico é considerado o teste-ouro e se baseia na identificação do parasito obtido através de material biológico de punção de medula óssea, linfonodo ou escarificação de pele. A especificidade do método é de aproximadamente 100%, e a sensibilidade depende do grau de parasitemia e tipo de material biológico, estando em torno de 80%.

3.5 Tratamentoda LVC

No Brasil, o tratamento da LVC foi autorizado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), no ano de 2016, a partir de uma norma técnica, junto com a comercialização do Milteforan® (VIRBAC) para o tratamento da LVC (BRASIL, 2016). Esta droga interfere no metabolismo de ácidos graxos e esteróis da membrana plasmática da amastigotas, interrompendo as vias de sinalização e induzindo a morte do parasito pelo mecanismo de apoptose (RAKOTOMANGA et al., 2007; REGUERA et al., 2016; ULIANA et al., 2016). Apesar do tratamento da LVC diminuir a carga parasitária e provocar remissão dos sinais clínicos, ainda não foi capaz de alcançar cura parasitológica, sendo assim não recomendado pelo Ministério da Saúde brasileiro, mantendo assim o ciclo de transmissão (BRASIL, 2016).

À vista disso, o tratamento da LVC tem como objetivo a remissão dos sinais clínicos e redução da capacidade de transmissão dos animais (CIARLINI et al., 2010; TRIGO et al., 2010; TRAVI, et al., 2018), e tem sido baseado na utilização de alopurinol, miltefosina, marbofloxacin e imunomoduladores (SOLANO-GALEGO et al., 2009; NASCIMENTO, 2019).

O alopurinol é um inibidor de síntese de purinas, inibindo a captação de purinas de células de mamíferos, através do bloqueio da enzima HGPT do parasita, exercendo efeito inibitório no crescimento do parasita (BERMAN, 1997; KAMAU et al., 2001; LLORENTE et al., 2000). A dose recomendada é de 10 a 20 mg/kg, BID, VO (RIBEIRO; MICHALICK, 2001).

O alopurinol é muitas vezes utilizado associada a domperidona, sendo esse um imunomodulador. A domperidona é um antagonista dos receptores dopamina D2 com ação pro-cinética gástrica e antiemética. O efeito antidopaminérgico estimula a liberação de serotonina que, por consequência, induz a produção de prolactina, tendo esta uma função extra lactação, como também apresenta participação importante na resposta imunitária celular do tipo Th1, promovendo a liberação de IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α , assim como a ativação de macrófagos (OLIVA et al., 2010; NOLI & SARIDOMICHELAKIS, 2014). A dose recomendada é de 0,5mg/kg, SID, durante 4 semanas (GÓMEZ-OCCHOA et al., 2009; REGUERA et al., 2016).

A marbofloxacina é um fluoroquinolona sintética que apresenta atividade leishmanicida direta e indiretamente pela produção de TNF- α e NO (NOLI & SARIDOMICHELAKIS, 2014). Segundo NASCIMENTO (2019), a associação de marbofloxacina e alopurinol promoveu uma maior remissão dos sinais clínicos, melhora dos perfis hematológicos e bioquímicos e aumento do valor da albumina.

A miltefosina é um fosfolípídeo com estrutura semelhante aos compostos metabolizados pela *Leishmania*. A miltefosina atua através da inibição da síntese da membrana celular do parasito e por interrupção das vias de sinalização. A dose recomendada é 2mg/kg, SID, VO durante 28 dias. Segundo FISCHER et al., 2001, o fármaco pode afetar o sistema gastrointestinal, causando vômitos e diarreia, além de aumentar os níveis séricos de ureia e creatinina. Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostraram a eficácia deste fármaco para o tratamento de infecções por *L. donovani* (CROFT et al., 1996; LE FICHOUX et al., 1998).

3.6 Controle e prevenção da LVC

De acordo com Programa Brasileiro de Controle da Leishmaniose Visceral, a estratégia de controle desta enfermidade se baseia em três medidas: identificação e tratamento de casos humanos; controle de reservatórios domésticos; e controle vetorial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Segundo RIBEIRO (2007), a restrição do contato do vetor infectado com o cão é o princípio básico para a prevenção da LVC. O uso de coleira impregnadas com deltametrina 4% tem sido considerado uma alternativa no controle da LVC (SILVA et al., 2017), assim

como o uso de inseticidas de aplicação tópica a base de permetrina (MOLINA et al., 2001; REITHINGER et al., 2001; MOLINA et al., 2012). Os cuidados de limpeza do ambiente, como retirada de matéria orgânica, aplicação de inseticidas ambientais a base de deltametrina e cipermetrina, podem auxiliar no controle do vetor, uso de plantas repelentes de insetos, como a citronela. Outra medida adicional é a vacinação, indicada como forma de prevenção para animais não reagentes. Contudo, o uso da vacina não substitui o uso de inseticidas tópicos. (LEITE et al., 2018)

3.7. Vitamina D e sua relação com a LV em cães

A vitamina D, calcitriol, é um hormônio esteroide e apresenta importante papel no metabolismo ósseo, principalmente na absorção de cálcio (DREZNER, 2013). É constituída por duas formas: a vitamina D₂, também conhecida como ergocalciferol, obtida através de fontes vegetais e a vitamina D₃ ou colecalciferol, obtida a partir de exposição da pele à radiação ultravioleta B presente na luz solar e pela ingestão de alimentos de origem animal, tais como peixe e suplementos orais (KENNEL, 2010).

Segundo HAZEWINCKEL & TRYFONIDOU (2002), níveis de vitamina D menores que 20-25 ng/ml sugerem deficiência de vitamina D em relação ao desenvolvimento ósseo adequado.

A vitamina D na progressão da leishmaniose pode estar ligada ao seu papel imunomoduladora. A vitamina D promove a inibição de IFN- γ por monócitos e macrófagos, assim como a inibição de IL-12, IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos T (RUIZ-IRASTORZA, 2008). A supressão dessas citocinas promove uma redução da atividade leishmanicida dos macrófagos, impulsionando uma resposta celular predominantemente humoral, induzindo o aparecimento da sintomatologia da doença. (CARNEIRO-DE-FREITAS et al., 2013; COSTA-PEREIRA et al 2015; DUARTE et al., 2016).

3.7.1 Síntese cutânea e metabolismo da vitamina D

Nos mamíferos, a principal fonte de vitamina D é representada pela forma endógena produzida pelo tecido cutâneo quando o indivíduo é exposto a radiação ultravioleta. Uma outra fonte alternativa é a dieta. No entanto, cães e gatos apresentam a síntese endógena ineficiente, devido ao aumento da atividade da enzima 7-diidrocolesterol-redutase, que converte 7-DHC em colesterol, dependendo, portanto, da ingestão adequada de vitamina D (MAIA & MAEDA & MARÇON, 2007).

A vitamina D endógena é produzida nas camadas profundas da pele (estratos espinhosos e basais), através da conversão do 7-deidrocolesterol (7-DHC) pela radiação ultravioleta (GRANNER, 1998; KOCHULIPAI, 2008). Enquanto a vitamina D dietética é absorvida no intestino delgado. A vitamina D é, então transportada ao fígado pelo sistema linfático (ISLABÃO, 1987) ou via sanguínea (GRANNER, 1998). No fígado, a vitamina D sofre hidroxilação pela enzima hepática calciferol-25-hidroxilase ou vitamina D3-25-hidroxilase, sendo transformada em 25-hidroxivitamina D ou 25(OH) D. A 25 (OH) D, acoplada a *Vitamin D Binding Protein* (DBP), a proteína ligadora de vitamina D, é transportada para os rins, onde é hidroxilada pela enzima 1 α -hidroxilase, transformando em 1 α , 25-diidroxivitamina D ou 1,25 (OH) D (Calcitriol), ou na sua forma inativa 24, 25-diidroxicoesterol pela enzima 24, 25- hidroxilase (CASTRO, 2011).

3.7.2 Mecanismo de ação da Vitamina D

A vitamina D após entrar nas células-alvo liga-se ao receptor VDR (vitamin D receptor), essa interação hormônio-receptor provoca uma série de alterações e interações de forma a regular a expressão génica. Além disso, apresenta uma ação não genômica através das vias de sinalização celular que promovem o influxo de cálcio, favorecendo a diferenciação celular.(URRUTIA- PEREIRA & SOLÉ, 2015).

A principal função da vitamina D é a regulação homeostática óssea, juntamente com o hormônio paratireoideano (PTH). Isso se dá através da diferenciação dos enterócitos e absorção intestinal de cálcio, que ocorre através da calbindina (proteína carreadora de cálcio intracelular), e do aumento da permeabilidade da membrana ao cálcio (CASTRO, 2011).

No metabolismo ósseo, o calcitriol interage com o VDR nos osteoblastos, promovendo a expressão do receptor ativador de ligação do fator nuclear K β (NF κ B)-RANKL, que por interação com outras proteínas estimula a diferenciação e maturação de monócitos em osteoclastos, que dissolvem a matriz óssea e mobilizam cálcio e outros minerais para a corrente sanguínea. (LICHTENSTEIN et al., 2013; WIMALAWANSA, 2012; URRUTIA- PEREIRA & SOLÉ, 2015).

A nível renal, a vitamina D promove um aumento da reabsorção do cálcio nos túbulos renais através de uma ação direta sobre o canal epitelial de cálcio (LICHTENSTEIN et al., 2013; WIMALAWANSA, 2012; URRUTIA- PEREIRA & SOLÉ, 2015). Verifica-se também uma diminuição da reabsorção tubular de fosfato, sendo consequência secundária provocada pela inibição da secreção da PTH ocorrida devido a presença de hipercalcêmica

resultante da administração de vitamina D (LICHTENSTEIN et al., 2013; WIMALAWANSA, 2012; URRUTIA- PEREIRA & SOLÉ, 2015).

A importância da vitamina D como hormônio relacionado já está devidamente elucidado. Contudo, estudos recentes têm demonstrado que a vitamina D desempenha papéis importantes em outras funções biológicas, como proliferação e diferenciação celular, além de imunomodulação (LICHTENSTEIN ET AL., 2013; WIMALAWANSA, 2012). O VDR está presente na maioria das células imunológicas como monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, células dendríticas, células natural killer (NK) (NAGPAL; NA; RATHNACHALAM, 2005). Além da diminuição da produção de Interleucinas-2 (IL-2), interferon- γ (INF- γ) e do fator de necrose tumoral (TNF). De acordo com esses achados recentes, a vitamina D pode estar associada a doenças infecciosas como a leishmaniose (DINIZ et al., 2012; LOH et al., 2012; GAL-MOSCOVICI & SPRAGUE, 2007).

Dentre as principais funções da vitamina D no sistema imunológico podemos destacar regulação da diferenciação e ativação de linfócitos CD4 (CANTORNA & MAHON, 2004; SZODORAY et al., 2008; CUTOLO & OTSA, 2008), aumento do número e função dos linfócitos T reguladores (Treg) (SZODORAY et al., 2008), diminuição da produção das citocinas interferon- γ , IL-2 e TNF- α , a partir de células Th1 e estímulo da função celular Th2 helper (CANTORNA & MAHON, 2004; ARNSON et al., 2007; SZODORAY et al., 2008; CUTOLO, 2009).

4. NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* (NICOLLE, 1908)

4.1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença crônica, com acometimento sistêmico, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida pelo inseto vetor *Lutzomyia longipalpis* (NOVO, 2011).

Cães infectados com *L. infantum* podem apresentar diferentes quadros clínicos variando de aparentemente normal até animais com sinais característicos, que incluem alterações dermatológicas, onicogribose, linfadenomegalia, emagrecimento progressivo, hepatoesplenomegalia, letargia, oftalmopatias, entre outros (FEITOSA, 2000; SALZO, 2008; BANETH et al., 2008). Por outro lado, apesar da associação de sinais clínicos relacionados a alterações hematológicas e bioquímicas (TORRECICLA, 2015), e a resposta imune Th1 pró-inflamatória ter sido demonstradas (FREITAS, 2010), pouco tem sido reportado sobre o papel da vitamina D nas LVC.

A vitamina D ou calcitriol é um hormônio esteroide que tem uma importante função na regulação dos níveis de cálcio e fosforo, homeostase (CASTRO, 2011), além da sua função na imunomodulação da resposta pró-inflamatória (MULLIN & DOBS, 2007; SELTING et al., 2014; SHARP et al., 2015).

Nos últimos anos, com a demonstração da existência de receptores da vitamina D em várias células, novas ações da vitamina D foram descobertas, ampliando suas funções.

Neste sentido, evidências sugerem a participação da vitamina D na resposta dos cães a infecção por *L. infantum* (RODRIGUEZ-CORTES, 2017). Tendo em vista importância da imunomodulação mediada pela vitamina D e a ausência de estudos na LVC, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis séricos deste macroelemento em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 15 cães domiciliados, sintomáticos, de ambos os sexos, de raças variadas e idade entre um e 10 anos, com diagnóstico positivo para leishmaniose, através da biopsia de medula óssea e teste imunocromatográfico (TR-DPP®), provenientes do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foi realizado o exame clínico dos mesmos. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) sob de número 23082.014015/208-25.

Após o exame clínico dos animais, amostras de sangue foram coletadas por meio de venopunção cefálica, jugular ou safena lateral, acondicionadas em microtubos plásticos sem EDTA para obtenção de soro e posterior avaliação da concentração sérica da vitamina D.

As amostras de soro foram testadas usando o método de quimiluminescência no analisador imunodiagnóstico UniCelDxI 800 (BeckmanCoulter) e o kit de ensaio Access 25 (OH) Vitamin D total (BeckmanCoulter) para Sistemas de Imunoensaio Access 2 para obter os níveis séricos de 25-hidroxi vitamina D. Os valores de referência foram os descritos por HAZEWINKEL & TRYFONIDOU (2002). Com base nos níveis séricos de 25OHD, adotou-se os termos: deficiência (valores inferiores a 25 ng/mL); insuficiência (níveis entre 25 e 100 ng/mL), valores normais (níveis superiores a 100 ng/mL). Todos os dados foram analisados utilizando o software InStat (GraphPad Software, Inc., 2000), calculando-se frequência absoluta (n/N) e relativa (%). O Teste de Qui-quadrado (X²) será utilizado para verificar se há significância das alterações clínicas observadas nos animais.

4.3. RESULTADOS

Dos animais avaliados 100% (15/15) apresentavam sinais clínicos sugestivos da infecção por *L. infantum*, (Tabela 1). Dentre os cães positivos, os principais sinais clínicos encontrados foram onicogribose (100%), linfadenomegalia (86,6%), alopecia (86,6%), dermatite descamativa (86,6%), dermatite ulcerativa (46,6%), alterações articulares (20%), dermatite pústular (13,3%)

Tabela 1. Principais sinais clínicos observados nos cães que participaram desse estudo.

Sinal clínico	%	(n/N)
Onicogribose	100%	15/15
Linfadenomegalia	86,6%	13/15
Alopecia	86,6%	13/15
Dermatite descamativa	80%	12/15
Conjuntivite	33,3%	5/15
Dermatite ulcerativa	46,6%	7/15
Dermatite pustular	13,3%	2/15
Paroniquia	13,3%	2/15
Uveíte	13,3%	2/15
Epistaxe	6,6%	1/15

Com relação aos níveis séricos de Vitamina D, a média foi de $7,4 \pm 1$ ng/mL, sendo que 100% dos pacientes tinham valores iguais ou inferiores a 25 ng/mL, incluindo três pacientes (20%) com valores menores a 3 ng/mL (**Tabela 2**).

Tabela2. Níveis séricos de 25 (OH) D nos cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

ANIMAL	NÍVEIS SÉRICOS DE 25(OH) D
01	15,2 ng/mL
02	13,7 ng/mL
03	13,4 ng/mL
04	9,2 ng/mL
05	6,8 ng/mL
06	6,4 ng/mL
07	6,1 ng/mL
08	5,5 ng/mL
09	4,5 ng/mL
10	4,4 ng/mL
11	4,0 ng/mL
12	4,0 ng/mL
13	<3,0 ng/mL
14	<3,0 ng/mL
15	<3,0 ng/mL

Média	7,4 ng/mL
-------	-----------

4.4 DISCUSSÃO

Os cães infectados por *Leishmania infantum* podem apresentar um ou mais sinais clínicos característicos da LVC. As principais manifestações clinicam como a onicogribose, linfadenomegalia e dermatopatias foram encontrados em outros estudos na mesma região (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; LIMA et al., 2004; BRITO et al., 2004; LANGONI et al., 2005; LINHARES et al., 2005; KRAUSPENHAR et al., 2007).

A onicogribose foi o principal sinal clínico observado entre os animais estudados, sendo considerado um sinal patognomônico para LVC por CIARAMELLA et al. (1997). BERTOLO (2017) mencionou que a onicogribose pode não está associada apenas a presença do parasito, como também pela presença de infiltrado inflamatório, que pode estar contribuindo com a onicogribose através da liberação de mediadores inflamatórios no local. A onicogribose observada nos animais avaliados foram coerentes com os resultados obtidos por FIGUEIREDO et al. (2014). Outro sinal clínico comumente observados nos animais estudados foram dermatopatias, a exemplo da alopecia e as dermatites. Este achado se assimila com os encontrados por MOREIRA et al. (2016), onde 70% dos animais avaliados apresentavam dermatopatias associadas a LVC.

Neste estudo, mostramos que os níveis de vitamina D em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* foram mais baixos do que os valores de referência. Os baixos níveis de vitamina D podem ser atribuídos a inúmeros fatores, como por exemplo, alterações hepáticas, alterações renais e alterações gastrointestinais (VIDAL et al., 2009; TORRES et al., 2013).

No fígado, a hepatomegalia é uma manifestação clínica comum na LVC e é causada pela intensa reação inflamatória granulomatosa crônica após a visceralização da *Leishmania* pelas vias linfáticas e sanguíneas (TAFURI, 2011). Tais alterações podem provocar insuficiência hepática e consequentemente a redução da hidroxilação da vitamina D pela enzima hepática calciferol-25-hidroxilase.

Nos rins, as alterações renais na leishmaniose estão associadas a presença de proteína, degeneração tubular multifocal leve, nefrite intersticial mononuclear em graus variados, glomerulonefrite membranosa e periglomerular (COSTA et al., 2003). Devido a insuficiência renal, há uma diminuição da hidroxilação da 25-hidroxivitamina D pelas enzimas renais 1,α-hidroxilase e 24,25-hidroxilase.

No trato gastrointestinal, a presença de amastigotas de *Leishmania* está associada a uma reação inflamatória (TOPLU E AYDOGAN, 2011; PINTO et al., 2011; FERRER et al.,

1991; SILVA *et al.*, 2002; ADAMAMA-MORAITOU *et al.*, 2007. GONZÁLEZ *et al.* (1986) descreveram as alterações patológicas ocorridas na própria lâmina intestinal e submucosa do cólon, causadas pelo parasita associados à infiltração de macrófagos nas células inflamatórias. Estas alterações podem levar a diminuição da absorção intestinal, podendo levar consequentemente a uma baixa na absorção de vitamina D.

Além disso, a hipovitaminose D observada na leishmaniose visceral canina pode ser devido a um excesso de consumo de vitamina D durante o processo inflamatório resultante de uma rápida conversão de 25 (OH) D na forma bioativa 1,25-dihidroxitamina D por citocinas inflamatórias (AUTIER *et al.*, 2014).

Estudos anteriores identificaram uma associação entre a hipovitaminose D e a presença de doenças infecciosas e processos inflamatórios (AUTIER *et al.*, 2014; SILVA & SCHNEIDER, 2016). RODRIGUEZ-CORTEZ *et al.* (2017), relatou que animais sintomáticos infectados com *Leishmania infantum* apresentaram níveis séricos de vitamina D menores do que os animais assintomáticos e do que os animais não infectados. Além disso, mostrou que os baixos níveis de vitamina D estavam correlacionados com a alta carga parasitária, e dessa forma os animais poderiam desenvolver a forma sintomática da doença.

HELMING *et al.* (2005), demonstrou que a 1 α , 25 (OH)₂ D₃ pode atuar como um potente supressor da ativação de macrófagos induzido por interferon- γ . Utilizando macrófagos, demonstrou a existência de um forte sinergismo da expressão do VDR na ativação de IFN- γ juntamente com presença de 1 α , 25 (OH)₂ D₃

Recentemente, pesquisas avaliando o papel da vitamina D na resistência a infecção por *Leishmania sp.* em modelos murinos tem demonstrado resultados conflitantes. Para examinar a relação entre a vitamina D e a *Leishmania sp.*, estudos recentes investigaram se a deficiência de vitamina D pode influenciar na suscetibilidade da leishmaniose.

WHITCOMB *et al.* (2011), avaliaram o papel da vitamina D na imunidade à infecção experimental por leishmaniose em camundongos deficientes em receptores de vitamina D (VDRKO). Foi observado que camundongos VDRKO reduziram o desenvolvimento de lesões induzidas por *Leishmania* em comparação com camundongos do grupo controle. Esse estudo indica que a deficiência de vitamina D leva a um aumento da resistência a *Leishmania*, mas apenas em um hospedeiro predisposto a respostas imunes do tipo Th1.

BEZERRA *et al.* (2019), avaliaram a influência da vitamina D na dieta na infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos. Foi observado que camundongos VDRKO mostraram um desenvolvimento de lesão mais controlado em comparação aos camundongos do grupo controle. Os resultados obtidos na pesquisa indicam que a diminuição de vitamina D contribui com a suscetibilidade à leishmaniose cutânea murina e que a

população de células Th1 pode estar relacionada à resistência de camundongos VDRKO à infecção por *L. (L.) amazonensis*.

EHRCHEN (2007), verificou que a deficiência de VDR contribui para o aumento da resistência à infecção por *Leishmania* sp.. O resultado foi associado ao fato de a vitamina D inibir a ação leishmanicida dos macrófagos ativado pelo IFN- γ , devido à diminuição na produção de Óxido Nítrico (NO).

RAMOS-MARTÍNEZ et al. (2015), relatou que camundongos BALB/c tratados com vitamina D, do início da infecção até 12 semanas após a infecção, reduziram significativamente o tamanho das lesões, sugerindo assim um papel terapêutico no tratamento de infecções por *Leishmania* sp.

4.5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a vitamina D pode estar relacionada com a leishmaniose visceral canina, pois todos os animais sintomáticos apresentaram baixos níveis séricos de vitamina D. Assim mais estudos sobre a influência da vitamina D na infecção por *Leishmania infantum* são necessários para compreender a participação desta na resposta imune da leishmaniose em cães.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio supervisionado obrigatório foi fundamental para a nova fase que está por vir na minha vida, onde tive a oportunidade de conhecer uma instituição renomada, onde pude conhecer novos profissionais e atuar em conjunto com eles.

Com a escolha do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRPE tive a chance de aprofundar os meus conhecimentos adquiridos durante a graduação, podendo correlacionar os aprendizados teóricos e práticos.

Além de aprender novos métodos de diagnósticos para várias doenças parasitárias, tive também a possibilidade de desenvolver senso crítico para cada situação. Por fim o estágio supervisionado foi uma experiência muito relevante tanto na minha formação profissional quanto pessoal, tornando-me mais preparado para enfrentar o mercado de trabalho, que está cada vez mais exigente e competitivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMAMA-MORAITOU, K.K.; RALLIS, T.S.; KOYTINAS, A.F. et al. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.76, p.53-57, 2007.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clinical and experimental dermatology*, Sunnyvale, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

ARNSON Y, AMITAL H, SHOENFELD Y. Vitamin D and autoimmunity: new etiological and therapeutic considerations. *Ann RheumDis*, 66:1137-42. June/2007.

AUTIER, P., BONIOL, M., PIZOT, C. e MULLIE, P. Estado da vitamina D e problemas de saúde: uma revisão sistemática. *The Lancet Diabetes Endocrinol*, 2 (1), p. 76–89. Jan/2014.

BARATTA-MASINI A., TEIXEIRA-CARVALHO A., MALAQUIAS L. C., MAYRINK W., MARTINS FILHO O. A., OLIVEIRA R. C. Mixed cytokine immunity revealed early type-2 and late type-1 profiles during active cutaneous leishmaniasis and predominance of type-1 pattern in naturally resistant individuals. *Front Biosci*, 12; 839-49. 2007.

BERMAN, J.D. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. **Clinical Infectious Diseases**, 24(4), p. 684–703. 1997.

BERTOLO, P. H. L. **Relação entre as lesões histológicas e a carga parasitária da região ungueal de cães naturalmente infectados com Leishmania infantum**. 2017. 39 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

BRITO, F. L. C. et al. Uveitis associated to the infection by Leishmania chagasi in dog from Olinda city, Pernambuco, Brazil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 925-929. 2004.

CANTORNA, M. T.; MAHON, B. D. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. **Exp Bio Med (Maywood)**, 229(11):1136-42. 2004.

CARNEIRO-DE-FREITAS, J. C. et al. Leishmanioses: uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.7, n.3, p.193-204, 2013.

CASTRO, L. C. G. de. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arq. Bras. Endocrinol Metab.**, São Paulo, v. 55, n. 8, p. 566-575. Nov./2011.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONI, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

CIARLINI, P.C.; VALADARES, T.C.; IKEDA-GRACIA, F.A.; MARCONDES, M.; LIMA, V.M.F.L. Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 359-375. 2010.

COSTA-PEREIRA, C.; MOREIRA, M. L.; SOARES, R. P. et al. One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. **BMC Vet Res**, 11, 92. 2015.

CROFT, S.L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anti-cancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Antimicrob. Chemother.**, v. 38, p.1041-1047, 1996.

CUTOLO, M. Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases. **Rheumatology**, v. 48, Ed. 3, p.210-2.Mar./2009.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 537-541. Jun./2006.

DEEB, K. K.; TRUMP, D. L.; JOHNSON, C. S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, vol. 7, p.684-700. Sep./2007.

DUARTE, M. C. et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 49, n. 4, p. 398-407, 2016.

DURANTE, B. Hemoparasitose em animais de companhia. **Jornal D'Aqui**. 2012. Disponível em: <http://www.jornaldaqui.com.br/materia_impressao.php?id_artigo=5457>. Acesso em: 01.Fev.2020.

EHRCHEN, J.; HELMING, L.; VARGA, G.; PASCHE, B.; LOSER, K., GUNZER, M., et al. Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*. **FASEB J.** 21(12); 3208–18. 2007.

FERRER, L.; JUANOLA, B.; RAMOS, J.A.; RAMIS, A. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. **Vet. Pathol.**, v.28, p.342-343, 1991.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In. **Canine leishmaniasis: an Update. Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum**; 1999 jan 28-31; Barcelona. Wiesbadaen: Hoeschst Roussel Vet; 1999. p. 6-10.

FIGUEIREDO, M. J. F. M. de et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciênc. anim. bras.**, Goiania, v. 15, n. 1, p. 102-106, Jan./Mar. 2014.

FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190, p. 85-87, 2001.

GAL-MOSCOVICI, A.; SPRAGUE, S. M. Role of vitamin D deficiency in chronic kidney disease. **Journal of Bone and Mineral Research**, Vol. 22, Sup. 2, 2007.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral**. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O. et al. Parasitologia humana. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 2000. p.56-72.

GÓMEZ-OCHOA, P., CASTILLO, J. A., GASCÓN, M., ZARATE, J. J., ALVAREZ, F., & COUTO, C. G. Uso da domperidona no tratamento da leishmaniose visceral canina: um ensaio clínico. **The Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 2, p.259-263. 2009.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista brasileira de epidemiologia, São Paulo, v.7, n.3., p.338-349 Set./2004.

GRANNER, D. K.; MURRAY, R. K.; MAYES, P.A. & RODWELL, V.W. **Hormônios que regulam o metabolismo do cálcio**, p.539-546. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. & RODWELL V. W. (Eds), Harper: Bioquímica: um livro Médico Lange. 8ª ed. Atheneu, São Paulo. 1998.

HAZEWINKEL, H. A.; TRYFONIDOU, M. Vitamin D3 metabolism in dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, n. 1-2, p. 23–33, nov. 2002.

HELMING, L.; BÖSE, J.; EHRCHE, J.; SCHIEBE, S.; FRAHM, T.; GEFFERS, R.; PROBST-KEPPER, M.; BALLING, R.; LENGELING, A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation. **Blood**, v. 106, n. 13, p.4351-4358. 2005.

ISLABÃO, N. Vitaminas: seu **metabolismo no homem e nos animais domésticos**. São Paulo: Livraria Nobel, 1978. 201p.

KAMAU, S.W; NUNEZ, R; GRIMM, F. Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (*Chloralin*) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. **BMC Pharmacol.**, v 1, p. 1-10, 2001.

KENNEL, K.; DRAKE, M.; HURLEY, D. Vitamin D Deficiency in adults: when to test and how to treat. **Mayo Clinic Proc.**,v.85, n.8, p.752-8. 2010.

KOCHUPILLAI, N. The physiology of vitamin D: Current concepts. **Indian J. Med. Res.**,v.127, p.256-262.2008.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A.A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, 2007.

LANGONI, H.; LUCHEIS, S.B.; SILVA, R.C.; CASTRO, A.P.B.; PAES, A.C. American visceral leishmaniasis: a case report. **The Journal of Venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 11, p. 361-372, 2005.

LE FICHOUX, Y.; ROUSSEAU, D.; FERRUA, B.; RUETTE, S.; LELIEVRE, A.; GROUSSON, D.; KUBAR, J. Short- and long- term efficacy of hexadecylphosphocoline against established *Leishmania infantum* infection in Balb/c mice. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, p. 654-658, 1998.

LICHTENSTEIN, A. et al. Vitamina D: ações extraósseas e uso racional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 495-506. 2013.

LINHARES, G.F.C.; CHAVES, N.S.T.; DUARTE, S.C.; FERNANDES, P.R.; AMARAL, A.V.C.; SOUZA, M.A. Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, p. 69-72, 2005.

LLORENTE, S., GIMENO, L., NAVARRO, M. J., MORENO, S. E.; RODRIGUEZ-GIRON, M. Terapia da leishmaniose visceral em recipientes renal de transplantes intolerantes a antimoniais pentas valentes. **Transplantation**,v. 70, n. 5, p.800-801. 2000.

LOH, Z. Y.; YAP, C. W.; VATHSALA, A.; HOW, P. Clinical and demographic predictors for vitamin D deficiency in multiethnic patients with chronic kidney disease. **ClinKidney J.**, v. 5, n. 4, p.303–308. Aug./2012.

MACHADO, M. M. **Análise de diferentes cepas de Leishmania (Leishmania) amazonensis e Leishmania (Viannia) braziliensis quanto a infectividade/virulência e perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos murinos infectados.** 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2014.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, v.158, p.274-287, 2008.

MAIA, M.; MAEDA, S. S.; MARÇON, C. Correlação entre fotoproteção e concentrações de 25 hidroxí-vitamina D e paratormônio. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, vol.82 no.3, Maio/Jun 2007.

MARTINS, N.S. et al. Alterações da matriz extracelular esplênica em cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) infantum chagasi. **Ciência Animal Brasileira**. v.16, n.1, p.103-115, jan./mar. 2015.

MIRÓ, G.; PETERSEN, C.; CARDOSO, L.; BOURDEAU, P.; BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L.; OLIVA, G. Novas áreas de prevenção e controle da leishmaniose canina. **Trends in Parasitology**, v.33, n.9, p.718-730. 2017.

MOLINA, R.; ESPINOSA-GONGÓRA, C., GÁLVEZ, R. et al. Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against Phlebotomus perniciosus. **Vet Parasitol**, v.187, n.3-4, p. 529-533, 2012.

MOLINA, R.; LOHSE, J.M.; NIETO, J. Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (Phlebotomus perniciosus) in dogs. **VetTherv**. v.2, p.261–267. 2001.

MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M. et al. Alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas em hamster (*Mesocricetus auratus*) infectadas experimentalmente com Leishmania infantum por diferentes vias de inoculação. **Parasitas e vetores**, vol. 9, nº181. 2016.

NAGPAL, S.; NA, S.; RATHNACHALAM R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. **Endocrine Reviews**, v.26, n.5, p. 662-87. 2005.

NASCIMENTO, J. O. **Avaliação clínico-laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* submetidos a terapia com marbofloxacin associada ao alopurinol.** 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

NOLI, C. & SARIDOMICHELAKIS, M. N. Atualização sobre o diagnóstico e tratamento da leishmaniose canina causada por *Leishmania infantum* (*sin. L. chagasi*). **The Veterinary Journal**, v.202,n.3, p.425-435. 2014.

OLIVA, G.; ROURA, X.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; CASTAGNARO, M.; GRADONI, L.; LUBAS, G. et al. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.236, p.1192-1198.2010.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **J AmVetMedAssoc**, v.236, n.11, p.1184-91. 2010.

PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. **Parasitologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

PINTO, A.J.; FIGUEIREDO, M.M.; SILVA, F.L. et al. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Acta Vet. Scand.**, v.53, p.67, 2011.

RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, n. 51, p. 1425–1430, 2007.

Ramos-Martínez E, Gutierrez-Kobeh L, Villaseñor-Cardoso MI. The role of vitamin D in the control of *Leishmania* infection. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015;93(5):369-376. doi:10.1139/cjpp-2014-0372

REGUERA, R. M. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 227, p. 98–114, 2016.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; GUERRA, L. L.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological

markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.** v.146, p.303–311. 2006c.

REIS, S. R.; FRANCO, A. M. R.; A Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Amazonas, Brasil. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Canina. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária** – Brasília/DF, Ano XVI, nº 50, 2010.

REITHINGER, R.; TEODORO, U.; DAVIES, C.R. Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. **EmergInfectDis.** v.7, n.5, 872 – 876, 2001.

RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S. M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. **Revista Nosso Clínico**, n.4, p.10-20, 2001.

RIBEIRO, V.M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n.71, p.66-76. 2007.

RODRIGUEZ-CORTES, A.; MARTORI, C.; MARTINEZ-FLOREZ, A.; CLOP, A.; AMILLS, M.; KUBEJKO, J.; LLULL, J.; NADAL, J.; ALBEROLA, J. Canine Leishmaniasis Progression Associated with Vitamin D Deficiency. **Scientific Reports.** v.7, n. 3346. 2017.

ROSS, M. R.; F. R. S.; F. R. C. S.; C. B. Further notes on Leishman's bodies. **The British Medical Journal**, v.2; n.2239, p.1401. 1903.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, v.2, n.2237, p.1261-1262. Nov./1903.

RUIZ-IRASTORZA, G.; EGURBIDE, M. V.; OLIVARES, N.; MARTINEZ-BERRIOTXOA, A.; AGUIRRE, C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. **Rheumatology**, v. 47, p.920-3. 2008.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* e flebotomíneos: interações no ciclo de vida e transmissão. **Parasitology Today**, v.9, n.7, p.255–258. Julho/1993.

SEVÁ, A.P.; OVALLOS, F. G.; AMAKU, M.; CARRILLO, E.; MORENO, J. et. al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLOS ONE.**, v.11, n.7. 2016.

SILVA, F.L.; TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.; TAFURI, W.L. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi: A case report, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, 2002.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n.1,p.20-31. 2007.

SILVA, J. D.et al. Visceral leishmaniasis in dogs from rural settlements. **Pesq. Vet. Bras.** [online], vol.37, n.11, p.1292-1298. 2017. ISSN 0100-736X.

SILVA, P. Z.; SCHNEIDER, R. H. The role of vitamin D in muscle strength among the elderly. **Acta Fisiátrica**. v.23, n.2, p.96-101. 2016.

SILVEIRA, F.T. et.al. **Leishmaniose Visceral Americana – Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**.Belém:Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, p.632-642, 1997.

SOLANO-GALLEG0, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **VeterinaryParasitology**, v.165, p.1-18, 2009.

SOLANO-GALLEG0, L.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; PETERSEN, C.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Desafios diagnósticos na era das vacinas caninas contra Leishmania infantum. **Trends in Parasitology**, v.33, n.9,p.706-717. 2017.

SZODORAY, P.; NAKKEN, B.; GAAL, J.; JONSSON, R.; SZEGEDI, A.; ZOLD, E. et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. **Scand J Immunol**,v.68, n.3, p.261-9. 2008.

Tafuri WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkablehistopatologicalpictureofone case reportedfromBrazil. **VetParasitol** 2001; 96: 203-212.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitol. Res.**, v.109, p.1051-1057, 2011.

TÁVORA, M. P. F. et al. Estudo de validação comparativo entre técnicas ELISA e RIFI para diagnosticar Leishmania sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, n.40, p.482-483. 2007.

TORRECILHA, R. B. P. **Associações entre as cargas parasitárias com o estresse oxidativo e alterações clínico-laboratoriais na leishmaniose visceral canina**. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2015.

TORRES, F. D.; FIGUEIREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **RevBrasParasitol**, v.13, n.4, p.151-154. 2004

TORRES, M. M. et al. Associação da carga parasitária renal com achados laboratoriais em cães com leishmaniose visceral. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 5, p. 894-896. 2013. ISSN 0103-8478.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Leishmaniose visceral canina: diagnóstico e manejo do reservatório que vive entre nós. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.12,n.1, p.1-13. 2018.

TRIGO, J. et al. Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccineLeish-111f+MPLSE. **Vaccine, Amsterdam**, n. 28, v. 19, p. 3333–3340, 2010.

ULIANA, S. R. B. et al. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*CambridgeUniversity, London,**Parasitology**, v.145, n.4, p.464-480. 2016.

URRUTIA- PEREIRA, M.; SOLÉ, D. Deficiência de vitamina D na gravidez e o seu impacto sobre o feto, o recém- nascido e na infância. **Revista Paulista de Pediatria**[online], vol.33, n.1, pp.104-113. 2015. ISSN 0103-0582.

VIDAL, I. F. et al. Níveis séricos da gama-glutamyltransferase em cães com e sem infecção natural por Leishmania (Leishmania) chagasi. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 749-751, June/2009.

WHITCOMB, J. P. et al. O papel da vitamina D. e do receptor da vitamina D na imunidade à infecção por Leishmania major.**Journal of Parasitology Research**, Vol. 2012, p.1-11. 2011.

WIMALAWANSA, S. Vitamin D in the New Millennium. **CurrentOsteoporosisReports**, 10 (1): 4-15.March/2012.