



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

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO
NA ÁREA DE DOENÇAS PARASITÁRIAS DOS ANIMAIS**

**PESQUISA DE kDNA DE *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)
EM BULBO E HASTE PILOSA DE PACIENTES CANINOS**

CAMENAS VIEIRA BARATA

NOSSA SENHORA DA GLÓRIA - SE

2023

CAMENAS VIEIRA BARATA

Trabalho de Conclusão do Estágio Supervisionado Obrigatório na área Doenças Parasitárias dos Animais

Pesquisa de kDNA de *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em bulbo e haste pilosa de pacientes caninos

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) e relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) do Departamento de Medicina Veterinária do Sertão (DMVS) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) - Campus Sertão, como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

NOSSA SENHORA DA GLÓRIA - SE

2023

CAMENAS VIEIRA BARATA

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO
NA ÁREA DE DOENÇAS PARASITÁRIAS DOS ANIMAIS**

**PESQUISA DE kDNA DE *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)
EM BULBO E HASTE PILOSA DE PACIENTES CANINOS**

Aprovada em ____/____/____

Nota:_____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Victor Fernando Santana Lima

Departamento de Medicina Veterinária do Sertão – UFS - Campus do Sertão
(Orientador)

Profa. Dra. Geyanna Dolores Lopes Nunes

Departamento de Medicina Veterinária do Sertão – UFS - Campus do Sertão o

Profa. Dra. Glenda Lídice de Oliveira Cortez Marinho

Departamento de Medicina Veterinária do Sertão – UFS - Campus do Sertão

Nossa Senhora da Glória – SE

2023

IDENTIFICAÇÃO

Discente: Camenas Vieira Barata

Matrícula: 201900121844

Orientador: Prof. Dr. Victor Fernando Santana Lima

LOCAL DO ESTÁGIO:

1- Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP/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

- Titulação/Área: Médico Veterinário, Pós- Doutor, Professor Titular

- Período: 12/06/2023 a 06/10/2023, com 8 horas diárias, totalizando carga horária de 664 horas.

COMISSÃO DE ESTÁGIO DO CURSO:

Profª Dra. Glenda Lídice de Oliveira Cortez Marinho

Profª Dra. Paula Regina Barros de Lima

Profª Dra. Roseane Nunes de Santana Campos

Profª Dra. Kalina Maria Medeiros Gomes Simplicio

Dedico este trabalho a meu pai José (*in memoriam*) e minha mãe Suzy por todo o cuidado, amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida, por estarem sempre comigo, me iluminando, abençoando e guiando durante toda a minha vida.

A minha mãe Suzy, pois, esteve presente me auxiliando e sonhando os meus sonhos durante a árdua trajetória da faculdade. Agradeço por todo apoio e por ser sempre minha conselheira, todos os seus ensinamentos foram essenciais para minha formação. Também agradeço a minha irmã Mainá por todo carinho.

Agradeço ao meu pai José (*in memoriam*) que sempre foi um dos meus exemplos para alcançar meus objetivos. Agradeço a sua preocupação e cuidado ao longo de toda a minha vida. Saudades eternas, pai.

Ao meu namorado, amigo e companheiro de vida Matheus, por todo o carinho, cuidado e amizade. Agradeço por ter me auxiliado nas atividades diárias da universidade, e sempre ser meu colo amigo. Agradeço por todos os momentos que você esteve comigo e assim diminuindo o fardo do cotidiano.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Victor Fernando que é um exemplo como médico veterinário e como pessoa. Agradeço por todas as oportunidades que o senhor me deu e por sua amizade.

Ao meu supervisor de estágio o Prof. Dr. Leucio Alves, sou grata por esse encontro e por todos os ensinamentos que adquiri na minha passagem pela UFRPE.

As amigadas que fiz durante o Estágio Obrigatório Supervisionado, principalmente a Samara, que foi amiga e professora durante todo o meu estágio. A Carina que separou seu tempo para me ensinar com paciência e cuidado.

Agradeço a todos que fazem parte do LDP da UFRPE, em especial a Lara, Laura, Leticia, Myllena e Wanessa, obrigada pelas conversas e boas risadas.

Aos professores da Universidade Federal de Sergipe - campus Sertão, em especial a Clarice, Thiago e André Pessoa, que além de ótimos profissionais são pessoas com um grande coração. Serei sempre grata por ter tido o privilégio de ser aluna de vocês.

Aos amigos que fiz durante a graduação, em especial a Lorena que esteve presente nos altos e baixos do dia a dia da faculdade. Obrigada por ter sido amiga e ouvinte em momentos difíceis. Agradeço também a Allan, por nossas conversas sempre leves e por nossa amizade.

Agradeço a Dory, minha filha de quatro patas, por ser minha companheira desde o início da graduação, me proporcionando alegria todos os dias.

A todos os animais que fizeram parte da pesquisa

Por fim, agradeço a todos aqueles que, porventura, eu tenha omitido.

*"O tempo é teu capital; tens de o saber utilizar.
Perder tempo é estragar a vida." (Franz Kafka)*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: Porcentagem

@: Marca Registrada

μL: Microlitro

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EPI 's: Equipamentos de Proteção Individual

ESO: Estágio Obrigatório Supervisionado

IgG: Imunoglobulina G

kDNA: DNA do cinetoplasto

LCan: Leishmaniose Canina

PAAF: Punção Aspirativa por Agulha Fina

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

SRD: Sem Raça Definida

TCC: Trabalho de Conclusão de Curso

Th1: T helper 1

Th2: T helper 2

TR DPP: Teste rápido - Dual Path Platform - Leishmaniose Visceral Canina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fachada e área externa do Hospital Veterinário Escola da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HOVET/UFRPE).....	2
Figura 2. Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP).....	3
Figura 3. Áreas internas do LDP/UFRPE.....	4
Figura 4. Ácaros e piolhos de animais domésticos avaliados no LDP/UFRPE período de 12/06 a 06/10 de 2023.....	5
Figura 5. Hemoparasitos identificados no LDP/UFRPE durante o período de 12/06 a 06/10 de 2023.....	7
Figura 6. Parasitos gastrointestinais identificados em amostras fecais no LDP/UFRPE, entre 12/06 e 06/10 de 2023.....	8
Figura 7. Técnica de coprocultura realizada no LDP/UFRPE visando a obtenção de larvas de nematódeos gastrintestinais em ruminantes.....	9
Figura 8. Alterações clínicas observadas em cães atendidos no ambulatório de leishmanioses do LDP/UFRPE durante o período de 12/06 a 06/10 de 2023.	11
Figura 9. Ciclo biológico dos protozoários do gênero <i>Leishmania</i> sp.....	15
Figura 10. Diagnóstico molecular e parasitológico de cães portadores da leishmaniose.....	25

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Frequência de parasitos gastrointestinais diagnosticados pelo método FLOTAC® no LDP/UFRPE durante o período de 12/06 a 06/10 de 2023.....8
- Tabela 2.** Taxa de positividade de técnicas aplicadas a triagem e diagnóstico de cães atendidos no serviço ambulatorial especializado em leishmaniose do HOVET/UFRPE durante o período de 12/06 a 06/10 de 2023.....10
- Tabela 3.** Número de animais com manifestações clínicas categorizadas por sistema orgânico, oriundos do serviço ambulatorial especializado em leishmaniose do HOVET/UFRPE no período de 12/06 a 06/10 de 2023.....10

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO	2
2.1. LABORATÓRIO DE DOENÇAS PARASITÁRIAS.....	2
2.1.1. Descrição do estágio	2
2.1.3. Descrição das atividades desenvolvidas	4
2.2 Casuística	5
2.2.1. Exames laboratoriais.....	5
2.2.2 Atendimento ambulatorial	9
2.3 Outras atividades desenvolvidas	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Introdução	13
3.2 Leishmanioses.....	14
3.3. Leishmaniose em cães.....	17
3.4 Parasitismo de <i>Leishmania</i> sp. em pelo	18
4. OBJETIVO	20
4.1 Geral.....	20
4.2 Específicos	20
5. METODOLOGIA.....	20
5.1 Aspectos éticos.....	20
5.2 Área de estudo.....	21
5.3 Delineamento experimental e participantes da pesquisa	21
5.4 População canina	21
5.5 Avaliação clínica.....	22
5.6 Coleta de amostras biológicas.....	22
5.6 Triagem de anticorpos pelo TR DPP® LVC – Bio-Manguinhos	23
5.7 Diagnóstico parasitológico.....	23
5.8. Diagnóstico molecular	23
5.8.1. Extração de DNA.....	23
5.8.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	24
5.8.3. Eletroforese	24
5.9. Análise dos dados	25
7. RESULTADO	25

8. DISCUSSÃO	27
9. CONCLUSÃO.....	29
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
11. REFERÊNCIAS	30

RESUMO

O presente trabalho tem como finalidade descrever as atividades desenvolvidas pela discente Camenas Vieira Barata ao longo do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), sendo este realizado na área de doenças parasitárias dos animais. As atividades foram efetuadas no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), na Universidade Federal Rural de Pernambuco localizado em Recife/PE. Sendo estas iniciadas no dia 12 de junho e finalizadas no dia 6 de outubro, totalizando a carga horária de 664 horas. A aluna ficou sob supervisão do Prof. Dr. Leucio Câmara Alves e orientação do Prof. Dr. Victor Fernando Santana Lima. Nesse ínterim, foi possível para a discente aprimorar e adquirir novos conhecimentos acerca do diagnóstico e tratamento das doenças parasitárias. Além de realizar um estudo, no qual foi detectado kDNA de *Leishmania infantum* através de técnicas moleculares aplicadas em bulbo e haste pilosa de cães infectados no estado de Pernambuco, sendo este utilizado como o tema para o Trabalho de Conclusão de Curso (TCC).

Palavras-chave: Diagnóstico, Leishmaniose, Parasitologia, Pelo.

1. INTRODUÇÃO

A Universidade Federal de Sergipe (UFS) possui o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) e o Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) como duas disciplinas cursadas no último ciclo da graduação de Medicina Veterinária. Nesse sentido, durante o estágio o aluno deverá cumprir a carga horária de pelo menos 630 horas supervisionado, por um profissional habilitado em sua área de interesse. Requerendo ao término, a elaboração de um relatório referente ao período de estágio como também, um trabalho científico acerca de um caso clínico e/ou pesquisa, que posteriormente será avaliado por uma banca avaliadora sob supervisão do orientador.

Dessa forma, o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) consiste em uma etapa imprescindível, pois, proporciona ao aluno uma oportunidade de vivenciar as atividades realizadas na rotina veterinária em sua área de interesse. Neste momento, o discente deverá aplicar e aprimorar os conhecimentos adquiridos durante a graduação e desenvolver seu lado profissional através da percepção das condutas de médicos veterinários durante a rotina.

Com isso, a área escolhida pela discente foi a área de doenças parasitárias dos animais e o local definido para cumprir este pré-requisito foi o Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife - PE. Por se tratar de uma área ampla, a qual proporciona a vigilância da saúde animal e humana. Desse modo, o ESO permitiu a discente, o aprofundamento dos conhecimentos teóricos e práticos em diversas técnicas laboratoriais para diagnóstico e estadiamento das doenças parasitárias, bem como, no tratamento especializado da leishmaniose canina.

Portanto, a seguir conta-se o relatório detalhado da estrutura e funcionamento do laboratório, como também, as atividades realizadas pela discente e sua casuística de atendimentos ambulatoriais e rotina laboratorial durante o período de ESO. Por fim, é apresentada a pesquisa simultaneamente desenvolvida, acerca do diagnóstico molecular de *Leishmania infantum* em bulbo e haste pilosa de pacientes caninos. Sendo esta, uma amostra biológica alternativa para o diagnóstico da Leishmaniose Canina (LCan), tendo em vista o estresse causado nos animais submetidos a diferentes tipos de coletas. Dessa forma, o pelo pode ser uma escolha por apresentar alta estabilidade e dispor de uma coleta simples e não invasiva servindo para trabalhos a campo.

2. RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

2.1. LABORATÓRIO DE DOENÇAS PARASITÁRIAS

2.1.1. Descrição do estágio

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), do Hospital Veterinário Escola (HOVET) (Figura 1), vinculado ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), situado na Rua Manoel de Medeiros, bairro Dois Irmãos, na cidade de Recife - PE. O qual foi conduzido no período de 12 de junho a 6 de outubro de 2023 das 08:00 às 12:00 e das 14:00 às 16:00 de segunda a sexta-feira, sob a supervisão do Médico Veterinário, pesquisador e professor titular Dr. Leucio Câmara Alves.

O LDP (Figura 2) é um setor de excelência na detecção de enfermidades parasitárias que acometem os animais. Atua como referência no diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular a partir de técnicas convencionais até as mais modernas na atualidade. O qual também se destaca, pela formação especializada através do programa residência em medicina veterinária, com enfoque nas doenças parasitárias. Além de dispor de produção científica de impacto na área de interesse e redes de apoio nacional e internacional em colaboração nas mais diversas pesquisas em parasitologia, justificando a escolha para a realização do ESO.



Figura 1. Fachada e área externa do Hospital Veterinário Escola da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HOVET/UFRPE). (Fonte: Acervo pessoal, 2023).

No LDP são vinculados 35 pesquisadores, entre eles professores, técnicos, mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos e estagiários. A rotina do setor é dividida em atendimento ambulatorial, sendo este especializado em leishmaniose e dirofilariose. Como também, rotina laboratorial, sendo o LDP responsável pelo diagnóstico de doenças parasitárias dos animais atendidos pelo HOVET da UFRPE.



Figura 2. Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP). (Fonte: Acervo pessoal, 2023).

O setor dispõe de várias instalações, sendo três salas dos professores, sala de estudo e reuniões, banheiro masculino e feminino, copa, sala de diagnóstico sorológico, dois almoxarifados, sala de diagnóstico parasitológico de hemoparasitos, sala de biologia molecular, sala de microscopia óptica, sala de microscopia de imunofluorescência, sala de diagnóstico parasitológico de endoparasitos, ectoparasitos e insetário (Figura 3).

O atendimento ambulatorial de cães infectados com *Leishmania* sp., são programados para quarta, quinta e sexta pela manhã e todos os animais são cadastrados em planilhas do Microsoft Excel® e fichas individuais. Os animais recebem o primeiro atendimento sendo realizado as coletas e processamento. Após a confirmação da doença, é iniciado o protocolo de tratamento e então são acompanhados nos dias 0, 30, 60, 90, 180 e 360.



Figura 3. Áreas internas do LDP/UFRPE. **A)** Sala de diagnóstico de hemoparasitoses; **B)** Sala de identificação de endoparasitos e ectoparasitos; **C)** Sala de microscopia de imunofluorescência; **D)** insetário; **E)** e **F)** Sala diagnóstico molecular. (Fonte: Acervo pessoal, 2023).

Em contrapartida, as atividades laboratoriais iniciam com o recebimento do material biológico (sangue, fezes, ectoparasitos, entre outras) para pesquisa de parasitos juntamente com fichas, as quais apresentam as informações necessárias para liberação dos laudos (identificação do animal, número de registro, exame solicitado, médico veterinário responsável, tutor). Em seguida, as amostras são processadas e o resultado é encaminhado para o veterinário requisitante em aproximadamente 24 horas.

2.1.3. Descrição das atividades desenvolvidas

Durante o período de ESO foi possível acompanhar o atendimento clínico e estadiamento de cães com leishmaniose, coleta de amostras biológicas e a aplicação de técnicas de diagnóstico laboratorial em doenças parasitárias (p.ex.: Parasitológico, sorológico e molecular). Bem como, a participação em aulas teóricas e práticas da disciplina de Doenças Parasitárias do curso de Medicina Veterinária da UFRPE, organização de eventos na área de interesse e de material científico.

2.2 Casuística

2.2.1. Exames laboratoriais

Durante o período do estágio, foram analisadas um total de 681 amostras biológicas, compreendendo os meses de junho (n=135/681; 19,82%), julho (n=217/681; 31,86%), agosto (n=205/681; 30,10%), setembro (n=110/681; 16,15%) e outubro (n=14/681; 2,06%). Sendo as amostras: sangue (n=219/681; 32,16%), pele e anexos cutâneos (n=133/681; 19,53%) (Figura 4), fezes (n=117/681; 17,18%), soro (n=98/681; 14,39%), medula óssea (n=55/681; 8,08%), linfonodo (n=55/681; 8,08%), conteúdo digestório (Ex.: Bile e etc.) (n=2/681; 0,29%) e ectoparasitos (Ex.: Carrapatos) (n=2/681; 0,29%).

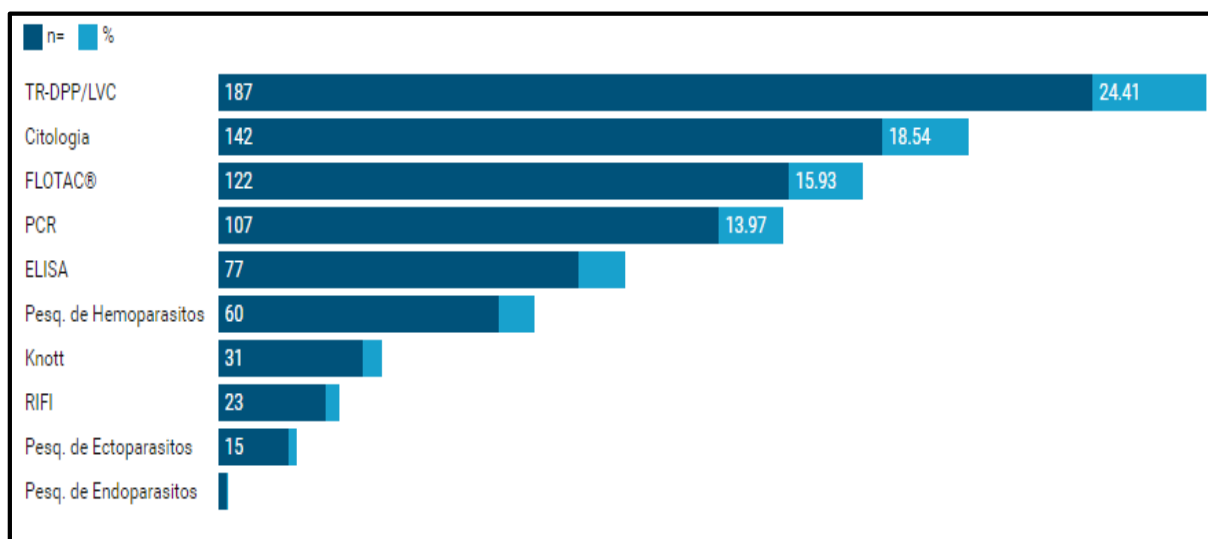


Figura 4. Ácaros e piolhos de animais domésticos avaliados no LDP/UFRPE período de 12/06 a 06/10 de 2023. **A)** *Lynxaccarus radovskyi* diagnosticado em felino; **B)** *Demodex canis*, diagnosticado em cão; **C)** e **D)** *Menopon gallinae* macho e fêmea respectivamente diagnosticado em galinha (Fonte: Acervo pessoal, 2023).

As amostras biológicas foram provenientes de 438 pacientes, dos quais 51,37% eram fêmeas (n=225) e 48,63% machos (n=213). Sendo estes distribuídos entre nove espécies distintas, tendo maior frequência os cães (n=388/438; 88,58%), seguido pelos equinos (n=15/438; 3,42%), ovinos (n=13/438; 2,97%), caprinos (n=9/438; 2,05%) e felinos (n=9/438; 2,05%). Por fim, os bovinos, bubalinos, aves e suínos com uma taxa individual de 0,23% (n=1).

Aproximadamente 766 exames foram realizados como representado no gráfico 1, os quais consistiram em TR-DPP/LVC (n=187/766; 24,41%), citologia (n=142/766; 18,54%), FLOTAC (n=122/766; 15,93%), PCR (n=107/766; 13,97%), ELISA (n=77/766; 10,05%), pesquisa de hemoparasitos (n=60/766; 7,83%), Knott (n=31/766; 4,05%), RIFI (n=23/766; 3,00%), pesquisa de ectoparasitos (n=15/766; 1,96%), identificação de endoparasitos (n=2/766; 0,26%).

Gráfico 1. Distribuição de exames realizados no LDP/UFRPE entre o período de 12/06 a 06/10 de 2023. (Fonte: Acervo pessoal, 2023).



Das 60 solicitações de pesquisas de hemoparasitos recebidas, um total de 15,00% das amostras foram positivas para espécies de bactérias intracelulares, protozoários e nematóides sanguíneos (Figura 5). Os quais consistiram em *Hepatozoon* sp. (5,00%; n=3/60), *Anaplasma platys* (5,00%; n=3/60), *Ehrlichia* sp. (3,33%; n=3/60), microfilária (1,67%; n=1/60) e *Trypanosoma* sp. (1,67%; n=1/60).

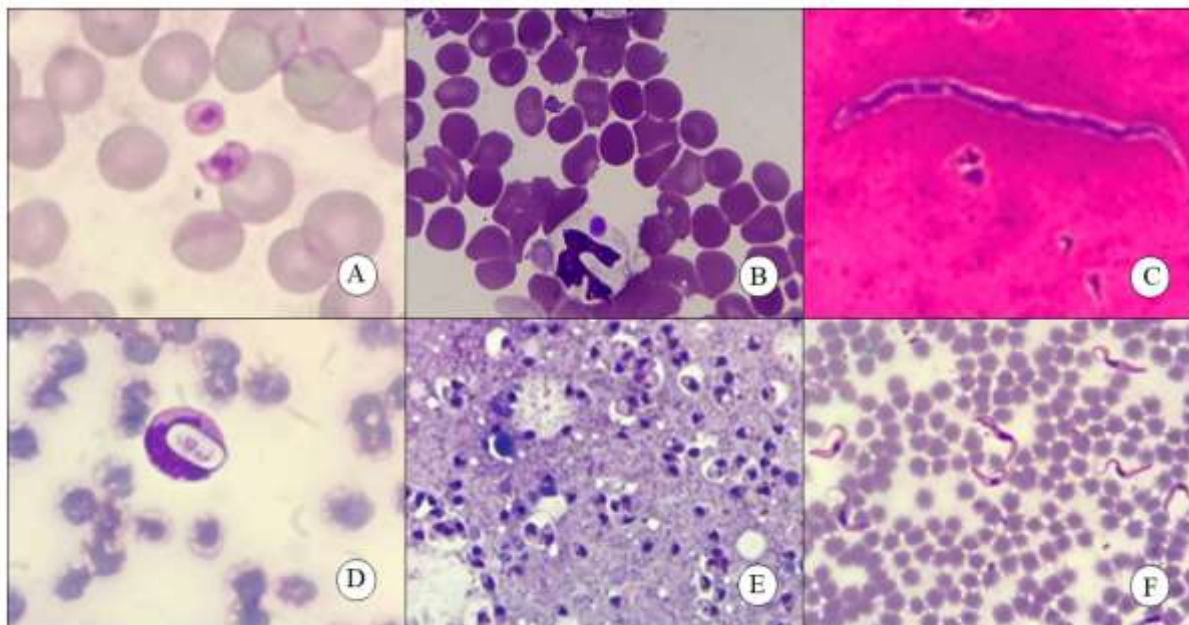


Figura 5. Hemoparasitos identificados no LDP/UFRPE durante o período de 12/06 a 06/10 de 2023. **A)** *Anaplasma Platys* em trombócito canino; **B)** Mórula de *Ehrlichia* sp. em neutrófilo de cão; **C)** Microfilária detectada pela técnica de Knott; **D)** Gametócito de *Hepatozoon* sp. em linfócito canino; **E)** Forma amastigota de *Leishmania* sp. Observada em linfonodo canino; e **F)** *Trypanosoma* sp. detectado em cão. (Fonte: Acervo pessoal, 2023).

Um total de 83 parasitos gastrointestinais foram identificados no exame parasitológico de fezes (Tabela 1), sendo o *Ancylostoma* sp. (n=27; 32,53%) o agente parasitário mais frequente, acometendo cães (n=25/27; 92,59%) e gatos (n=2/27; 7,41%). Por outro lado, a ocorrência de *Toxocara* sp. (n=4; 4,82%), *Trichuris* sp. (n=1; 1,20%) e *Cystoisospora* sp. (n=1; 1,20%) foi detectada unicamente na espécie canina (n=6). Nos animais de produção foram detectados ovos do gênero *Strongyloides* sp. (n=19; 22,89%) e da Superfamília Strongyloidea (n=17; 20,48%) entre os animais de produção, como ovinos (n=11; 42,31%), caprinos (n=8; 30,77%), equinos (n=6; 23,08%) e bovinos (n=1; 3,85%).

Tabela 1. Frequência de parasitos gastrointestinais diagnosticados pelo método FLOTAC® no LDP/UFRPE durante o período de 12/06 a 06/10 de 2023.

Parasito	(FA/n)	(FR/%)	Hospedeiro
<i>Ancylostoma</i> sp.	27	32,53	Cães e gatos
<i>Strongyloides</i> sp.	19	22,89	Caprinos, ovinos e equinos
Superfamília Strongyloidea	17	20,48	Caprinos, ovinos e bovinos
<i>Eimeria</i> sp.	14	16,87	Caprinos e ovinos
<i>Toxocara</i> sp.	4	4,82	Cão
<i>Trichuris</i> sp.	1	1,20	Ovino
<i>Cystoisospora</i> sp.	1	1,20	Cão
Total	83	100	

Quanto a pesquisa de parasitos gastrointestinais, todos os ensaios realizados no LDP foram executados por meio da técnica de FLOTAC®, a qual permite a identificação de ovos, larvas, oocistos e cistos em amostras fecais (Figura 6) (CRINGOLI *et al.*, 2010). Sendo alcançada uma taxa de detecção de 81,93% helmintos e 18,07% protozoários.

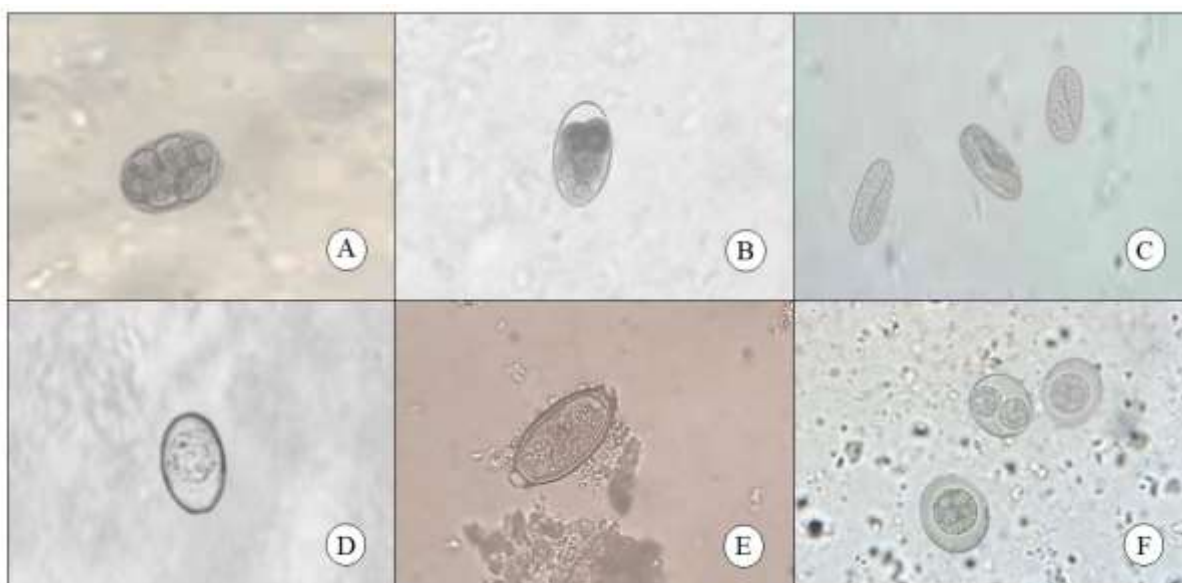


Figura 6. Parasitos gastrointestinais identificados em amostras fecais no LDP/UFRPE, entre 12/06 e 06/10 de 2023. **A)** *Ancylostoma* sp. diagnosticado em cão; **B)** Ovo da Superfamília Strongyloidea observado em bovino; **C)** *Strongyloides* sp. detectado em equino; **D)** *Eimeria* sp. verificado em caprino; **E)** *Trichuris* sp. achado em ovino; e **F)** *Cystoisospora* sp. detectado em paciente canino. (Fonte: Acervo pessoal, 2023).

Nesse sentido, para determinar as espécies de nematódeos encontrados através da técnica de OPG, comumente realizava-se a coprocultura dos materiais fecais de acordo com a solicitação feita para o laboratório. Entre as principais formas larvais observadas, destaca-se a ocorrência de *Oesophagostomum* sp., *Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus* sp. como demonstrado na Figura 7.



Figura 7. Técnica de coprocultura realizada no LDP/UFRPE visando a obtenção de larvas de nematódeos gastrintestinais em ruminantes. **A)** Preparo das amostras fecais; **B)** Cultivo em manutenção; **C)** Recuperação de larvas por hidrotropismo; **D)** Forma larval de *Oesophagostomum* sp.; **e)** *Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus* sp. (Seta vermelha) em estágio infectante L3. (Fonte: Acervo pessoal, 2023).

2.2.2 Atendimento ambulatorial

Durante o período de estágio, foram atendidos 94 animais no ambulatório especializado em leishmaniose, sendo estes advindos para o primeiro atendimento (n=64/94; 67,37%), retorno (n=23/94; 24,21%) e recoleta (n=6/94; 6,32%). Destes, 50,53% eram fêmeas (n=48/94) e 48,42% machos (n=46/94), tendo maior ocorrência da enfermidade entre cães Sem Raça Definida (SRD) (n=71/94; 75,53%).

Quanto aos exames realizados para triagem e diagnóstico da leishmaniose (Tabela 2), em 43,18% dos animais foram parasitologicamente positivos em (n=21/94; 22,34%) medula óssea (n=44), seguidos por linfonodo quando alterados (n=22/45; 48,89%) e pele quando haviam lesões (n=6/25; 24,00%). Enquanto na triagem pelo TR-DPP®/LVC um total de 45,74% (n=71) dos animais apresentaram anticorpos anti-*Leishmania infantum*.

Tabela 2. Taxa de positividade de técnicas aplicadas a triagem e diagnóstico de cães atendidos no serviço ambulatorial especializado em leishmaniose do HOVET/UFRPE durante o período de 12/06 a 06/10 de 2023.

Parasito	Positivo	Negativo	(FR/%)
TR-DPP®/LVC	43	28	60,56
Medula de óssea	19	25	43,18
Linfonodo	22	23	48,89
Pele	6	19	24
PCR	0	12	0
Total	90	107	

Quanto à classificação dos sinais clínicos identificados nos pacientes caninos diagnosticados com leishmaniose, (n=14; 14,74%) animais foram assintomáticos, (n=20; 21,05%) oligossintomáticos e (n=60; 63,16%) polissintomáticos. Tendo em vista os sistemas acometidos nos pacientes, o sistema tegumentar obteve maior ocorrência, abrangendo (52,07%) dos casos, seguido pelo sistema visual (18,18%), locomotor (14,05%), digestório (9,09%) e geniturinário (6,61%) (Tabela 3).

Tabela 3. Número de animais com manifestações clínicas categorizadas por sistema orgânico, oriundos do serviço ambulatorial especializado em leishmaniose do HOVET/UFRPE no período de 12/06 a 06/10 de 2023.

Classificação das afecções acompanhadas	Caninos
Sistema tegumentar	63
Sistema digestório	11
Sistema geniturinário	8
Sistema visual	22
Sistema locomotor	17
Total	121

Entre as principais alterações cutâneas, destacaram-se as dermatites do tipo ulcerativa (n=27; 28,42%), descamativa (n=18; 18,95%), pustular (n=5; 5,26%) e papular (n=3; 3,16%). Enquanto observou-se nos anexos cutâneos a presença de alopecia (n=13/94; 13,83%), onicogribose (n=34/94; 36,17%) e paroníquia (n=2/94; 2,13%). Também estando presentes afecções relevantes do sistema visual, como conjuntivite (n=18/94; 81,82%) e ceratoconjuntivite (n=4/94; 18,18%) (Figura 8).



Figura 8. Alterações clínicas observadas em cães atendidos no ambulatório de leishmanioses do LDP/UFRPE durante o período de 12/06 a 06/10 de 2023. **A)** Hiperqueratose em focinho; **B)** Dermatite ulcerativa em região escrotal; **C)** Alterações oculares em cão (alopecia periocular, secreção ocular, hifema); **D)** Caquexia; **E)** Alopecia em ponta de cauda; e **F)** Dermatite ulcerativa em mucosa oral. (Fonte: Arquivo pessoal, 2023).

2.3 Outras atividades desenvolvidas

Durante o período de estágio, tive a oportunidade de participar semanalmente de aulas teóricas e práticas ministradas pelo supervisor, que foram direcionadas para o estudo das doenças causadas por helmintos e protozoários em animais de produção e de companhia. Além disso, também adquiri experiência prática na identificação de endoparasitos e ectoparasitos em animais domésticos através das principais técnicas diagnósticas utilizadas em parasitologia. Por fim, fiz parte da comissão organizadora de um evento sobre leishmaniose.

No âmbito da pós-graduação, acompanhei seminários de pesquisa, cujo objetivo era preparar e apoiar o desenvolvimento das pesquisas conduzidas por mestrandos e doutorandos.

**PESQUISA DE kDNA DE *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)
EM BULBO E HASTE PILOSA DE PACIENTES CANINOS**

[Trabalho de conclusão de curso]

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Introdução

As leishmanioses, também conhecidas como calazar, são doenças parasitárias de ampla distribuição mundial, causadas por protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* sp. (PAL *et al.*, 2022). No mundo estas afecções cursam com espectro clínico grave, acometendo milhões de pessoas em mais de 98 países (SILVA, 2021). Estando na atualidade entre as enfermidades tropicais negligenciadas mais prevalentes e de importância em saúde pública (SANTANA *et al.*, 2021).

Uma vez que são consideradas patologias de epidemiologia complexa, as leishmanioses ocupam uma variedade de sistemas ecológicos, expressando em sua predominância, a ocorrência em regiões tropicais e subtropicais (SEBASTIÁN-PÉREZ *et al.*, 2022). Dessa forma, é apontado como um problema fortemente presente em países em desenvolvimento, do qual resulta em cerca de 20.000 a 40.000 mortes anuais e 1 bilhão de pessoas em exposição em áreas endêmicas (ARULEBA *et al.*, 2020; SILVA; STEBUT, 2021).

Nas Américas as leishmanioses são consideradas afecções presentes em diferentes países, com destaque para o Brasil, o qual concentra 90% dos casos humanos (DONATO *et al.*, 2020). No local, a ocorrência da enfermidade é atribuída a pelo menos dois subgêneros, entre eles subgênero *Leishmania*: *Leishmania* ((*L.*) *infantum* e *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*) e ao *Viannia*: (*Leishmania* (*V.*) *guyanensis*, *Leishmania* (*V.*) *lainsoni*, *Leishmania* (*V.*) *shawi*, *Leishmania* (*V.*) *naiffi*, *Leishmania* (*V.*) *lindenbergi* e *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*) (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SILVA, 2008).

Quanto transmissão das leishmanioses, estas ocorrem através de insetos flebotomíneos fêmeas (Ordem: Díptera; Subordem: Nematocera; Família Psychodidae; subfamília: Phlebotominae) (VATANDOOST *et al.*, 2018). A nível global, aproximadamente 1000 espécies foram descritas, (SHIMABUKURO *et al.*, 2017; KILLICK-KENDRICK, 1990). Ademais, os gêneros *Lutzomyia* sp., *Phlebotomus* sp. e *Sergentomyia* sp. são os mais estudados com participação em sua epidemiologia (CECÍLIO *et al.*, 2022).

O ciclo biológico do parasito do gênero *Leishmania* sp. possui o cão como principal reservatório, o qual pode apresentar diferentes manifestações clínicas outros hospedeiros (SILVA *et al.*, 2017). Dessa forma, quando parasitados a leishmaniose pode ser clinicamente

classificada em: Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Mucocutânea (MCL) e Leishmaniose Cutânea Difusa (DCL) (NYLÉN; EIDSMO, 2012; SCORZA, 2017)

No Brasil, o diagnóstico da LCan é realizado através de testes sorológicos e parasitológicos, ambos, com níveis variados de sensibilidade (SOLANO-GALLEGU, 2011). Entretanto, as técnicas moleculares também são uma opção viável alcançando ótimos resultados, uma vez que, possuem 100% de especificidade, o que tem impulsionado seu aprimoramento nos dias atuais (DUARTE *et al.*, 2006; (GALLUZZI *et al.*, 2018; MENÊSES, 2019; MARCELINO *et al.*, 2020).

Uma vez que, os métodos convencionais as vezes requerem procedimentos complexos para obtenção de amostras, estudos utilizando abordagens não invasivas estão sendo realizados para identificação de pacientes com essa enfermidade (MIRZAEI *et al.*, 2018). Dessa forma, o presente trabalho utilizou a PCR qualitativa para a pesquisa de kDNA de *Leishmania infantum* em bulbo e haste pilosa de pacientes caninos

3.2 Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários da família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* sp. (BANETH; SOLANO-GALLEGU, 2022). Atualmente, 31 espécies são reconhecidas por parasitar mamíferos, e 20 por parasitar humanos (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Essas infecções podem se manifestar por meio de diferentes padrões clínicos, que variam desde a forma: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea, difusa e visceral (SAMPAIO *et al.*, 2021; SAFAVI *et al.*, 2021; COWAN *et al.*, 2023).

A transmissão da leishmaniose ocorre principalmente através da forma vetorial, por meio da fêmea do inseto flebotomíneo (QUINNELL; COURTENAY, 2009). Estes dípteros estão contidos na subfamília Phlebotominae, a qual é classificada em seis gêneros: *Phlebotomus* sp., *Sergentomyia* sp. e *Chinius* sp. do Velho Mundo, e *Lutzomyia* sp., *Brumptomyia* sp. e *Warileya* sp. do Novo Mundo (MAROLI, *et al.*, 2013; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Embora o ciclo epidemiológico da leishmaniose tenha sido mais amplamente estudado em seres humanos e cães, cerca de 70 espécies de animais já foram documentadas como hospedeiros dos parasitos do gênero *Leishmania* sp.. Entre essas espécies, destacam-se os lagomorfos, roedores, xenartros, felinos, marsupiais e bovinos (TSAKMAKIDIS *et al.*, 2017; LAINSON *et al.*, PEREIRA; MAIA 2021; VIOTI *et al.*, 2019).

O ciclo de transmissão do protozoário *Leishmania* sp. inicia quando a fêmea dos vetores flebotomíneos realizam o repasto sanguíneo inoculando na pele do animal a promastigota metacíclica (Figura 9) (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Posteriormente macrófagos e neutrófilos são recrutados para o local da picada, bem como, as células de langerhans e fibroblastos (PETERS, 2008; JOHN; HUNTER, 2008). Assim, o parasito se fixa a célula hospedeira através do seu flagelo, o qual possui moléculas (GLPs e gp63) que se ligam a receptores dos macrófagos (CR1 e CR3), realizando a internalização do parasito (RUSSELL; WILHELM, 1986; TURCO; DESCOTEAUX, 1992).

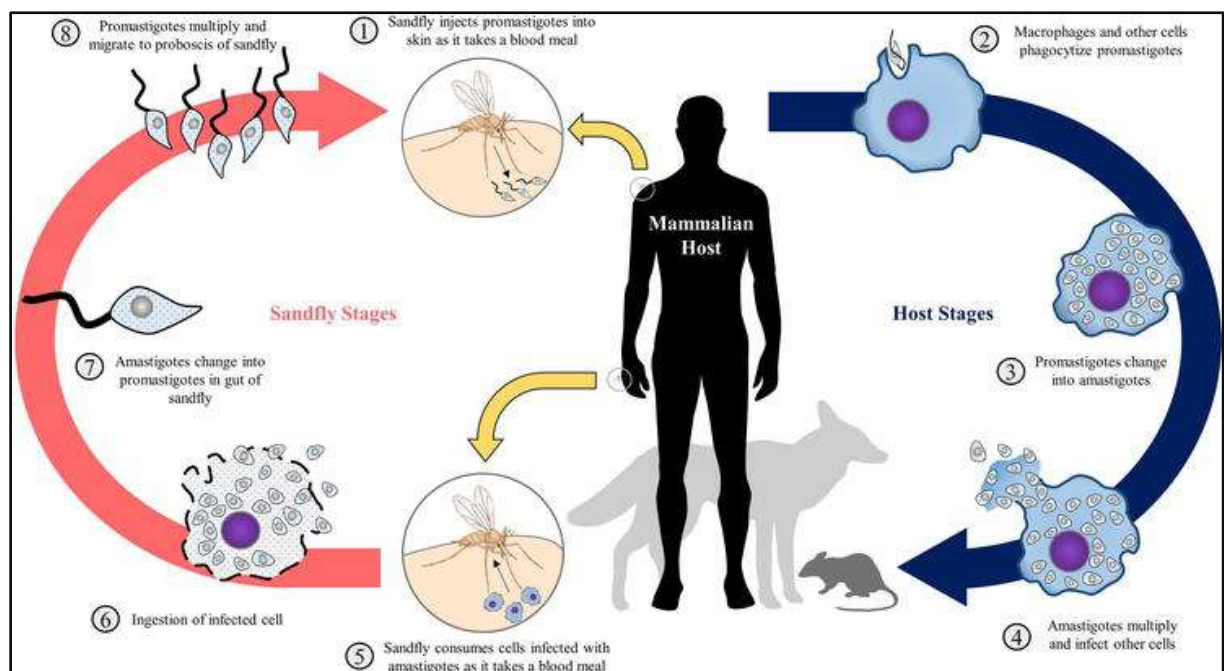


Figura 9. Ciclo biológico dos protozoários do gênero *Leishmania* sp. (Fonte: Sheikh, *et al.*, 2020).

Os parasitos do gênero *Leishmania* sp. então são fagocitados por macrófagos, onde se fixam dentro dos vacúolos parasitóforos (STUART *et al.*, 2008; YOUNG; KIMA, 2019). Os macrófagos se movem da pele para os linfonodos locais com as amastigotas, onde então ocorre a disseminação para medula óssea, baço e outros órgãos infectando novas células (ZHANG *et al.*, 2022).

Tendo em vista a carga parasitária presente na pele do cão, ocorre a infecção de um novo flebotomíneo após repasto sanguíneo no cão infectado (ARUMUGAM *et al.*, 2022). Os macrófagos contendo as amastigotas *Leishmania* sp. no trato digestivo médio do flebotomíneo, como consequência da alteração do pH e temperatura, se transformam em promastigotas procíclicas e se multiplicam (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Após esta etapa, ainda se diferenciam em outras duas formas, sendo elas: promastigotas nectomonadas longas, promastigotas nectomonadas curtas ou leptomonas (WALTERS, 1993; ROGERS *et al.*, 2002; COUTINHO-ABREU *et al.*, 2020). Por fim, se locomovem para a válvula estomodeal e realizam nova divisão, se transformando em promastigotas metacíclicas infecciosas para ocorrer a transmissão para outro animal (FREITAS *et al.*, 2012).

Após a infecção, os sinais clínicos podem variar de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro, estado clínico e a virulência do agente (MACHADO *et al.*, 2019; YASMIN *et al.*, 2022). Cães podem apresentar dois tipos de respostas ao agente, sendo ela celular ou humoral, com efeito, permanecem assintomáticos ou apresentam alterações clínicas (SAHA *et al.*, 2022). Assim, a forma em que a doença se apresenta é definida a partir dos tipos celulares envolvidos a partir do aumento da célula T CD4⁺ e suas citocinas (SCOTT; NOVAIS, 2016).

No qual, a resposta TH1 (T helper 1) é responsável pela produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ , que estimula a ativação de macrófagos, os quais destroem o parasito (SHAHI, 2013). Por outro lado, a resposta TH2 (T helper 2) impulsiona a produção de IL-4 e IL-10, inibindo a ação de macrófagos e produzindo anticorpos anti-*Leishmania* sp. (AJDARY *et al.*, 200; ROLÃO *et al.*, 2007). Nesse sentido, a deposição de imunocomplexos em tecidos ocasiona as manifestações clínicas observadas (CACHEIRO-LLAGUNO *et al.*, 2016; CONDE *et al.*, 2022).

3.3. Leishmaniose em cães

Apesar da enfermidade já ter sido descrita em diversas espécies domésticas e silvestres, os cães (*Canis familiaris*) são os principais reservatórios e sentinelas da leishmaniose em áreas urbanas (HASSAN *et al.*, 2009). Visto que apresentam alta suscetibilidade ao patógeno, precedendo os casos humanos, além de possuir intenso parasitismo cutâneo acarretando a disseminação do parasito (BORGES *et al.*, 2022; LOPES *et al.*, 2020). Dessa forma, estudos relacionados ao papel do cão no ciclo epidemiológico da doença são fundamentais, tendo em vista que é considerada uma enfermidade potencialmente fatal (LEWIS *et al.*, 2020).

A principal forma de transmissão da LCan é vetorial, ocorrendo através do repasto sanguíneo realizado por flebótomos da família Phlebotominae (PINTO *et al.*, 2022). Os sinais cardinais da leishmaniose são anemia, esplenomegalia e febre (PEACHEY *et al.*, 1994). As principais manifestações clínicas são alterações dermatológicas (alopecia, dermatites, onicogribose, paroníquia, hiperpigmentação de pele), alterações oculares (uveíte, conjuntivite, opacidade de córnea, episclerite) emaciação, linfadenomegalia e por fim, em casos mais graves o óbito (NICOLATO *et al.*, 2013; OLIVERIA, 2021).

O diagnóstico clínico possui problemas, visto que as manifestações clínicas relacionadas à leishmaniose são diversas, tendo cães tanto assintomáticos quanto cães apresentando acometimento de vários órgãos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). Dessa forma, é utilizado mais de uma técnica para obter um diagnóstico preciso, então em cães é possível realizar testes sorológicos, moleculares e parasitológicos (THAKUR *et al.*, 2020)

A LCan se manifesta por um amplo espectro clínico, com efeito, o tratamento é repleto de desafios (KARUNAWEEERA; FERREIRA, 2018). Dessa forma, muitos protocolos são utilizados para diminuir os sinais clínicos e a carga parasitária. A Miltefosina (hexadecilfosfocolina) é a droga preconizada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil, amplamente estudada por sua ação leishmanicida, pois, altera a biossíntese das glicoproteínas e glicolipídeos da membrana do parasito (SUNDAR; OLLIARO, 2007; CROFT *et al.*, 1987).

Além disso, outros fármacos como alopurinol, marbofloxacin e imunomoduladores também estão sendo utilizados com bons resultados (PINEDA *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2020; COLAÇO *et al.*, 2023;). Por fim, uma vez que a doença não possui cura e sim diminuição da carga parasitária e dos sinais clínicos, os medicamentos são administrados até o

fim da vida do paciente. Sendo atrelado a isso formas de prevenção através do uso de coleiras repelentes como a Scalibor®/MSD-Animal Health, Seresto®/Bayer Saúde Animal e Front Max®, que evitam o contato do hospedeiro com o vetor (RIBEIRO et al., 2018).

Tendo em vista a complexidade da cadeia epidemiológica e consequentemente das dificuldades relacionadas à contenção da leishmaniose (GEORGIADOU *et al.*, 2015). A confirmação da doença deve estar sempre atrelada ao acompanhamento da resposta ao tratamento, portanto é necessário encontrar preditores confiáveis para realizar a cura clínica e diminuir as chances de disseminação (MAIA; CAMPINO, 2018).

3.4 Parasitismo de *Leishmania* sp. em pelo

As infecções por protozoários do gênero *Leishmania* sp. compreendem uma série de enfermidades zoonóticas denominadas de leishmanioses, cuja transmissão ocorre por meio de insetos da família Phlebotominae (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). Nos últimos tempos, casos da leishmaniose tem sido cada vez mais descritos nos centros urbanos, caracterizando um processo de urbanização da enfermidade, no qual o cão (*Canis familiaris*) desempenha o papel central como principal reservatório nesses locais (CHAGAS *et al.*, 2021; CAVALCANTE *et al.*, 2022). Devido à complexidade clínica da enfermidade, na atualidade tem-se buscado o aprimoramento das metodologias de diagnóstico, com enfoque na utilização de amostras biológicas menos invasivas (MAIA *et al.*, 2020).

Uma vez que o ciclo de transmissão do parasito *Leishmania* sp. inicia através da sua inoculação na pele do cão após a ingestão de sangue (ARUMUGAM *et al.*, 2022; SAINI *et al.*, 2022), o sistema tegumentar torna-se um local de estudo ideal para leishmaniose em decorrência da alta carga parasitária e atividade celular na derme diante do processo inflamatório da doença (SCORZA *et al.*, 2017). Com isso, a doença em cronicidade desenvolve manifestações dermatológicas no local da picada do flebotomíneo, descritas como os locais com maior concentração de parasitos (SILVA *et al.*, 2016).

O sistema tegumentar é composto pela pele, juntamente com as estruturas anexas: unhas, pelos e glândulas (sudoríparas, mamárias e sebáceas), que desempenham o papel de primeira linha de defesa do corpo (NGUYEN; SOULIKA, 2019; PORCELLATO *et al.*, 2022). Dentre as funções realizadas por este sistema, o acúmulo de tóxicos ambientais, excreção de

substâncias e regulação de reações imunológicas, estão diretamente ligadas ao ciclo de vida do parasito *Leishmania* sp. (WENZEL *et al.*, 1996; GRATACÓS-CUBARSÍ *et al.*, 2007, PASSELLI *et al.*, 2021). Tendo em consideração os estudos anteriormente realizados, o acúmulo do parasito nesses locais influencia na taxa de infectividade, o bulbo por sua vez permite identificar a carga parasitária sem ocasionar estresse (QUINNELL; COURTENAY, 2009; COURTENAY *et al.*, 2014).

De acordo com Mehregan (1968) o organismo possui mecanismos para expelir substâncias desconhecidas. A eliminação transepitelial da forma amastigota de *Leishmania* spp. através das camadas epidérmicas pode ocorrer de maneira passiva através do fluxo de queratinização que ocorre com as células epidérmicas ou de uma forma ativa (AZADEH; ABDULLA, 1995) (KARRAM *et al.*, 2012). Sendo já descrita a eliminação de medicamentos e outros parasitos em pelo de animais por meio da detecção através da PCR (STOUT *et al.*, 2000; GRATACÓS-CUBARSÍ *et al.*, 2006; PATRA *et al.*, 2007).

Além disso, os Compostos Orgânicos Voláteis (COV's) que determinam a comunicação entre o hospedeiro e o vetor da leishmaniose, influenciam na transmissão do parasito (STANIEK; HAMILTON, 2021). De acordo com Scorza *et al.*, (2021) os animais parasitados apresentando manifestações clínicas, possuem aleloquímicos que conferem ao hospedeiro maior atratividade para o flebotomíneo. Com efeito, é possível afirmar que os animais que possuem maior carga parasitária em derme onde está situado o folículo capilar tem maior taxa de infectividade do que o animal assintomático (COSTA-VAL *et al.*, 2007; MICHALSKY *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2011). Dessa forma, uma vez que as alterações em pelos e pele representam a taxa de infectividade do cão, é nítida a importância de estudá-lo.

O diagnóstico sorológico preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, é realizado através do teste imunocromatográfico utilizando o Teste Rápido DPP (Dual Path Platform, Biomanguinhos®), como triagem dos animais. Além disso, o ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima (ELISA® Kit EIE LVC - Biomanguinhos) como confirmatório (SOLANO-GALLEGO, 2011; BRASIL, 2014). Entretanto, sabe-se que o nível de anticorpos varia muito lentamente de acordo com o estágio da doença, assim, a integração de métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares culminam em um diagnóstico mais preciso. (ASSIS *et al.*, 2010; CORPAS-LÓPEZ *et al.*, 2016).

Com base nisso, as técnicas moleculares no diagnóstico da leishmaniose estão sendo cada vez mais utilizadas, devido à sua alta capacidade de fornecer resultados extremamente sensíveis e específicos (GALLUZZI *et al.*, 2018). Sendo o seu uso já relatado com diversos tipos de amostras biológicas, desde urina, cerúmen, pele, sangue e secreção conjuntival (JUNGUDOMJAROEN *et al.*, 2015).

Em função disso a empregabilidade de amostras não invasivas como urina, swab oral conjuntival e vulvar são capazes de substituir as coletas invasivas e assim monitorar o estágio clínico do paciente com leishmaniose, de modo que o estresse pode ser reduzido (BEZERRA *et al.*, 2019). Nesse sentido, amostras de pelo de cães tem sido avaliadas tanto para o diagnóstico qualitativo, quanto o quantitativo utilizando a PCR (GONÇALVES *et al.*, 2016). Assim, o pelame possui vantagens por se tratar de uma amostra não invasiva e com boa estabilidade em diversas condições ambientais, mantendo a sua integridade (MUÑOZ-MADRID *et al.*, 2013).

4. OBJETIVO

4.1 Geral

Pesquisar kDNA de *Leishmania infantum* em bulbo e haste pilosa de pacientes caninos

4.2 Específicos

- Realizar a seleção de cães parasitologicamente positivos para *Leishmania* sp.;
- Identificar as alterações clínicas em pacientes caninos com leishmaniose;
- Realizar o diagnóstico de *Leishmania infantum* utilizando diferentes partes do pelo e do corpo.
- Propor um protocolo menos invasivo para obtenção de amostras e diagnóstico da leishmaniose em cães.

5. METODOLOGIA

5.1 Aspectos éticos

As atividades desenvolvidas no presente estudo foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo de número 8764010520 da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Sendo todos os procedimentos ocorridos mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos tutores ou responsáveis.

5.2 Área de estudo

A presente investigação teve origem no Hospital Veterinário (HOVET) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), situado na cidade de Recife, no estado de Pernambuco, região nordeste do Brasil. Pernambuco é uma das 27 unidades federativas do país e compartilha suas fronteiras com cinco estados vizinhos: Paraíba e Ceará ao norte, Piauí a oeste, e Alagoas e Bahia ao sul, sendo banhado ao leste pelo oceano atlântico (SOBEL et al., 2009).

Historicamente o território pernambucano é reconhecido como uma área endêmica significativa para leishmaniose, apresentando uma média anual de incidência de 1,28 casos a cada 100 mil habitantes e municípios com alto risco de transmissão (RIBEIRO et al., 2021; MACHADO, 2023). O local se destaca por sua ampla cobertura de biomas, que inclui florestas atlântica de encostas, terras baixas, restinga, manguezal e semidecídua, além de savana tropical estacional semiárida (MENEZES, 2019). De acordo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2023), o estado possui uma população de 9.058.155 (92,37hab/km²) de pessoas, com um rendimento mensal per capita de R\$1.010 e índice de desenvolvimento humano de 0,719.

Para atender à necessidade crescente, a unidade médica de ensino e atendimento veterinário da UFRPE, realiza atendimento clínico especializado para a leishmaniose canina à comunidade proveniente da capital e do interior do estado de Pernambuco. Sendo esse serviço disponibilizado mediante o agendamento e encaminhamento de animais previamente avaliados por profissionais médicos veterinários, com o objetivo de realizar o diagnóstico confirmatório, tratamento e estadiamento da enfermidade nos animais, contribuindo assim para a prevenção dos seres humanos.

5.3 Delineamento experimental e participantes da pesquisa

Esse estudo é de caráter transversal, com a finalidade de avaliar o pelo como uma amostra não invasiva para detecção de kDNA de *Leishmania infantum* em pacientes caninos.

5.4 População canina

Foram selecionados aleatoriamente 15 cães de sexo, raças e idades distintas, provenientes do serviço ambulatorial especializado em leishmaniose do HOVET/UFRPE. O critério de inclusão estabelecido consistiu em animais de regiões endêmicas do estado de Pernambuco, parasitologicamente positivos em medula óssea e linfonodo para *Leishmania* sp. em exames de rotina.

5.5 Avaliação clínica

Na ocasião em que deram entrada para atendimento inicial (D0), todos os animais foram avaliados clinicamente obedecendo as seguintes etapas: anamnese e histórico clínico; exame clínico e físico geral; avaliação da pele e anexos cutâneos; avaliação dos órgãos linfoides; e avaliação oftálmica. Durante a avaliação os pacientes foram categorizados com base nas apresentações clínicas observadas. Sendo estes, considerados sintomáticos quando uma ou mais manifestações clínicas comuns da leishmaniose estavam presentes e assintomáticos quando Nenhum Achado Digno de Nota (NDN) foi constatado.

As informações clínicas pertinentes foram devidamente registradas em uma ficha clínica padronizada, e as lesões identificadas foram documentadas através de fotografias.

5.6 Coleta de amostras biológicas

Todos os animais foram submetidos a punção venosa cefálica e/ou jugular, mediante a utilização de seringa descartável, acoplada com agulha hipodérmica de 25mm X 0,7mm ou 25mm X 0,6mm, conforme a necessidade. Sendo parte do sangue obtido transferido para tubos sem anticoagulante, tencionando a retirada do soro, para a detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum*.

Os pacientes também foram submetidos a coleta por epilação para obtenção de bulbo piloso e com auxílio de tesoura para haste pilosa, no qual cerca de 20 a 50 fios foram removidos de áreas íntegras do dorso e cabeça. Além disso, sempre que houvesse lesões em qualquer parte do corpo dos cães, pelos das áreas circundantes às lesões também foram coletados. Nesse momento, todos os materiais obtidos foram acondicionados em tubos cônicos estéreis (Eppendorf®) previamente identificados e mantidos sob congelamento a -40°C, até a extração de DNA.

Por outro lado, fragmentos de pele e borda lesionada foram coletados por meio da escarificação com lâmina de bisturi (N.º 10) para análise citológica, quando presentes alterações

cutâneas (dermatite esfoliativa e/ou ulcerativa) nos pacientes avaliados. Além disso, realizou-se a biópsia de medula óssea e a Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) em linfonodos alterado (Ex.: aumento de tamanho) de todos os indivíduos. Estes materiais foram destinados a confirmação da LCan a partir da observação direta de formas amastigotas de *Leishmania* sp..

5.6 Triagem de anticorpos pelo TR DPP® LVC – Bio-Manguinhos

Para a detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum*, empregou-se o Teste Imunocromatográfico DPP (Dual Path Platform, Biomanguinhos®), cujos antígenos são constituídos pelas proteínas recombinantes rK26 e rK39 (MACHADO *et al.*, 2020).

O procedimento consistiu na adição de 5 µL de soro sanguíneo ao poço 01 (amostra + tampão), seguido pela aplicação de duas gotas de tampão no mesmo poço. Após o desaparecimento das duas linhas azuis, correspondentes ao Controle (C) e ao teste (T), efetuou-se a adição de quatro gotas de tampão ao poço 02, com um intervalo de espera de 10 a 15 minutos para a leitura dos resultados. Sendo consideradas reagentes as amostras em que ambas as linhas, identificadas como (T) e (C), se mostraram presentes.

5.7 Diagnóstico parasitológico

Após a coleta foram confeccionados em lâmina de vidro estiraços das amostras obtidas através da escarificação de pele, PAAF de linfonodo e/ou biópsia de medula óssea. Ao término todos os materiais foram fixados e após a secagem, finalmente realizou-se a coloração do tipo Romanovsky (Panótico rápido, LB, Brasil) no LDP da UFRPE. Em seguida, o material foi avaliado por meio de microscopia de luz com imersão sob aumento de 1000x. A observação de uma única forma amastigota do protozoário *Leishmania* sp. em qualquer uma das lâminas foi considerado positivo.

5.8. Diagnóstico molecular

5.8.1. Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada mediante a utilização do The ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System, atendendo todas as especificações do fabricante. Nesta etapa, boas práticas de laboratório foram adotadas, sendo estéreis todos os materiais utilizados para evitar contaminação, bem como, a utilização de EPI's.

Para isso, uma média entre 20-50 pelos por animal foram utilizados, conforme preconiza o protocolo padronizado descrito por Gonçalves et al. (2016) e Belincho-Lorenzo et al. (2019). Na ocasião, o material foi introduzido em tubo cônico (Eppendorf®) estéril e agitado em vórtex por 10 segundos com 20µl de Proteinase K e 200µl de tampão de lise celular (CDL) e em seguida, incubado a 56°C em banho seco por 30 minutos.

Após a incubação, adicionou-se 250µl de tampão de ligação (BBA) junto ao material lisado, levando-se novamente para agitação em vórtex por 10 segundos. Em seguida, o material foi centrifugado por um minuto e então transferido para uma coluna com microfiltro (Relia Prep™ Binding Columns) em um tubo de coleta devidamente identificado, repetindo-se ao término a centrifugação sob as mesmas condições.

Posteriormente a coluna contendo o microfiltro foi colocada em outro tubo de coleta, e então 500µl de Colum Wash Solution (CWS) foram adicionados e o material é centrifugado por 3 minutos. A etapa de lavagem com CWS é realizada mais duas vezes, até completar três lavagens. Por fim, adicionou-se 150µl de Nuclease Free Water na coluna e submeteu-se a centrifugação por um minuto. Ao término, o DNA obtido foi armazenado em tubos estéreis em congelamento até sua utilização.

5.8.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os primers empregados na pesquisa foram o MC1 (5' -GTT AGC CGA TGG TCT TG-3') e o MC2 (5'-CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG-3'), projetados para amplificar um Fragmento de 447 pares de base dos minicírculos de kDNA pertencentes ao complexo *Leishmania sp. infantum/donovani*, conforme descrito por Cortes (2004).

As PCR's foram realizadas com um total de 17,5 µL, composto por 6 µL de DNA, 1 µL de cada primer, 2,75µL de H₂O e 6,75 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). A reação foi realizada em um termociclador automático com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de amplificação (95°C/15s, 60°C/1 min).

5.8.3. Eletroforese

Os produtos de amplificados foram submetidos à análise por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% com tampão tris-EDTA-acetato (TAE) 50X, empregando o corante BlueGreen® e um marcador de peso molecular (100pb DNA ladder - GibcoBRL-Life Technologies, MD, EUA) Em seguida, os géis foram visibilizados e avaliados utilizando um

transiluminador ultravioleta conectado a um computador com software EOS utility® (Canon, USA) para a documentação digital das imagens.

5.9. Análise dos dados

Para a análise estatística, todos os dados foram tabulados e organizados em planilhas do Microsoft Excel® 2019. As frequências relativas e absolutas, foram calculadas utilizando-se o InStat (*GraphPad Software, Inc.*, 2000) com nível de significância $p < 0,05$.

7. RESULTADO

No presente estudo foram avaliados 15 animais parasitologicamente positivos em medula óssea (73,33%; $n=11/15$), linfonodo (86,67%; $n=13/15$) e pele (20,00%; $n=3/15$), sendo estes cães machos (66,67%; $n=10/15$) e fêmeas (33,33%; $n=5/15$), classificados clinicamente como polissintomáticos. Nesses indivíduos os sistemas orgânicos mais acometidos foram o tegumentar (93,33%; $n=14/15$), seguido por linfático (86,67%; $n=13/15$) e circulatório (40,00%; $n=6/15$), e em menor frequência musculoesquelético (33,33%; $n=5/15$), visual (33,33%; $n=5/15$) e gastrointestinal (26,67%; $n=4/15$).

Em contrapartida, detectamos a presença do DNA de *L. infantum* em amostras de pelo de 33,33% (5/15) dos cães avaliados. Constatando-se em pelos de áreas de pele íntegra, positividade única de 80% ($n=4/5$) em amostras oriundas da cabeça, e de 40% ($n=2/5$) para pelos procedentes de lesão, neste caso, em região dorsal (20%; $n=1$) e cervical (20%; $n=1$).

Quanto ao segmento analisado, houve somente a amplificação de fragmentos de DNA de *L. infantum* nas amostras de bulbo piloso perfazendo um total de 100% ($n=5/5$) (Figura 10A). Nesses pacientes, foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* sp. em amostras de linfonodo (100%; $n=5$) (Figura 10B) e medula óssea (80%; $n=4$), com uma média de 05 ± 01 parasitos por campo analisado. Enquanto, anticorpos anti-*Leishmania infantum* foram identificados na triagem de 80% dos animais ($n=4$).

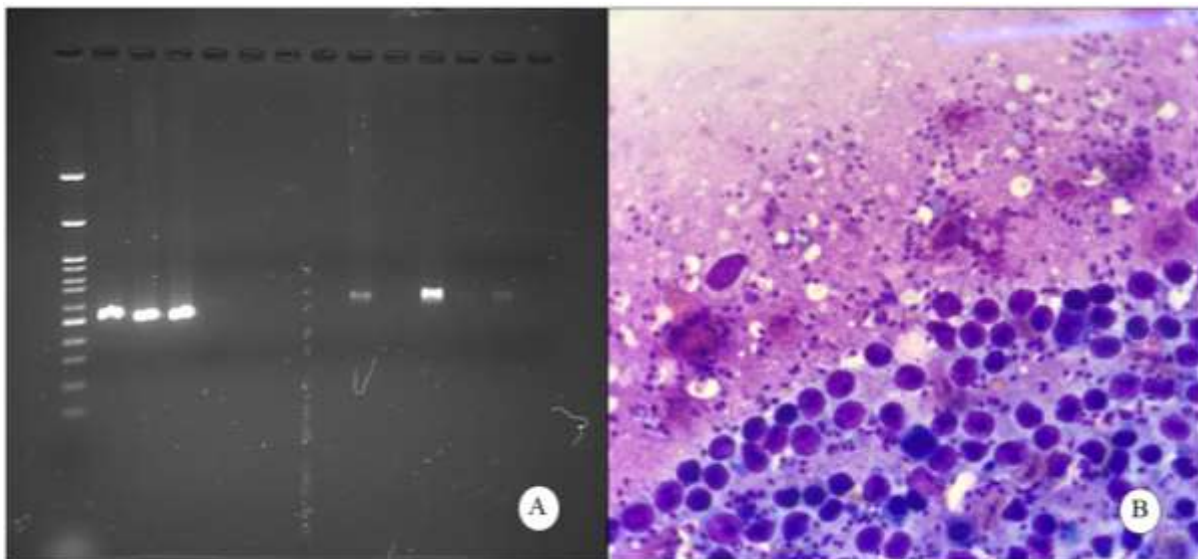


Figura 10. Diagnóstico molecular e parasitológico de cães portadores da leishmaniose. **A)** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos da reação em cadeia da polimerase evidenciando a amplificação de kDNA do protozoário *Leishmania infantum* em bulbo piloso de cães; e **B)** Citologia de aspirado de linfonodo canino com formas livres de amastigotas de *Leishmania* sp.. (Fonte: Acervo pessoal, 2023).

Ao exame clínico constatou-se que, 100% (n=5) desses cães eram polissintomáticos, divididos entre machos (60%; n=3) e fêmeas (40%; n=2). Destes, 80% (n=4) correspondiam a pacientes caninos Sem Raça Definida (SRD), enquanto 20% (n=1) eram da raça Husky Siberiano, ambos com uma média de idade de 1,4 anos e 17kg ao primeiro atendimento.

Estando entre os sistemas orgânicos mais acometidos, se destacou o tegumentar (100%; n=5) e linfático (100%; n=5) seguidos pelo circulatório (60,00%; n=3), musculoesquelético (40,00%; n=2), visual (40,00%; n=2) e gastrointestinal (40,00%; n=2). Das alterações clínicas tegumentares observadas, onicogribose (60,00%; n=3), alopecia (20,00%; n=1) e paroníquia (20,00%; n=1) apareceu entre os sinais clínicos mais comuns. Além dos diferentes tipos de dermatites, como em padrão esfoliativo (40,00%; n=2) e ulcerativo (40,00%; n=2).

No sistema circulatório, os animais apresentaram hipocromia de mucosas (60,00%; n=3) e epistaxe (20,00%; n=1). Enquanto poliartrite (40,00%; n=2) foi a única disfunção presentes no sistema musculoesquelético. Por outro lado, a nível de sistema visual secreção ocular (40,00%; n=2), conjuntivite (20,00%; n=1) e opacidade de córnea (20,00%; n=1) apareceram com maior frequência. Ao mesmo tempo que, êmese (20,00%; n=1) e diarreia (20,00%; n=1) foram os principais problemas gastrointestinais e linfadenomegalia (100%; n=5) a única alteração presente em sistema linfático, nos animais diagnosticados molecularmente.

8. DISCUSSÃO

Neste estudo, propomos a adoção de uma abordagem menos invasiva para o diagnóstico da leishmaniose, através da utilização da haste e bulbo piloso de cães. Entre os animais avaliados (n=15), o kDNA de *L. infantum* em amostras de pelo foi detectado em 33,33% (n=5) dos cães. Sendo este, um achado molecular já relatado por Muñoz-Madrid *et al.* (2016) em canídeos silvestres do norte e oeste da Espanha e por Belinchón-Lorenzo *et al.* (2019) em cães provenientes do estado de São Paulo (Brasil). Além disso, também foi descrito por Gonçalves *et al.* (2016) ao conduzirem estudos com pacientes caninos do estado da Bahia (Brasil), os quais associaram sua presença devido à habilidade do pelo em acumular substâncias, conforme evidenciado nesta investigação.

Embora esse mecanismo ainda não seja totalmente compreendido, Sereno *et al.* (2020) sugere a ocorrência de um processo de eliminação transdérmica, no qual se tem a inserção direta do kDNA de *L. infantum* entre os queratinócitos da pele e do pelo no local de inoculação do agente parasitário. De acordo com Karram *et al.* (2022), determinadas substâncias são capazes de serem eliminadas, quer seja de maneira passiva, quando se mantém presa entre as células epiteliais e é transportado para cima com o fluxo de queratinização ou ativa, com evolução pela epiderme através de compostos que induz o movimento de queratinócitos em maturação. O que para Sevilha-Santos *et al.* (2019) é considerado parte de uma resposta protetora do organismo.

No que diz respeito às áreas examinadas, a positividade para *L. infantum* foi observada em amostras de DNA de pelagem oriundas tanto de regiões com pele intacta (80%; n=4/5) quanto de áreas lesionadas (40%; n=2/5). Sendo esses, achados já descritos em estudos anteriores (GONÇALVES *et al.* 2016; BELINCHÓN-LORENZO *et al.* 2019). Quanto à localização, constatamos uma maior frequência de DNA em pelos provenientes da cabeça (40%), em relação a região dorsal (20%) e cervical (20%). Para Velez *et al.* (2012) as áreas da cabeça são prontamente alcançadas pelos flebotomíneos devido à sua menor cobertura de pelos. Cortes *et al.* (2012) e Marzochi *et al.* (2021) explicam que a ausência ou redução da pelagem proporciona uma maior superfície corporal, aumentando assim o potencial de transmissão da leishmaniose. Sendo concordante com os nossos resultados, uma vez que, o parasitismo cutâneo é mantido no local de alimentação, quer seja em pele íntegra ou lesionada (BONGIORNO *et al.*, 2019; ARUMUGAM *et al.*, 2022).

Com relação ao segmento do pelo avaliado, somente amostras de bulbo piloso (100%; n=5/5) amplificaram fragmentos de kDNA de *L. infantum*. Uma vez que, o parasito *Leishmania* sp. pode estar presente na corrente sanguínea e o bulbo piloso apresenta fluxo sanguíneo proveniente dos vasos na papila dérmica subjacente (BASSERT, 2010; KUMOSANI *et al.*, 2022). De fato, pacientes com leishmaniose cutânea podem apresentar amastigotas de *Leishmania* sp. dentro dos folículos pilosos (KARRAM *et al.* 2022). Além disso, em cães, Solano-Gallego *et al.* (2004) já observou uma carga parasitária significativamente elevada nas proximidades dos folículos pilosos, a qual também relacionou à sua disseminação hematogênica e tropismo pela pele.

Aqui demonstramos que a presença de kDNA de *L. infantum* em pelo está diretamente associada ao acometimento de linfonodos (100%; n=5) e medula óssea (80%; n=4). Uma relação também observada por Corpas-López *et al.* (2016), que em seu estudo com cães em tratamento para a leishmaniose, vinculou a carga parasitária capilar à presença do parasito nesses locais. Apesar de 20% (n=1) dos animais não terem demonstrado presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum*, eles continham kDNA de *L. infantum* no pelo. De acordo com Jesus *et al.* (2021), é importante notar que os níveis de anticorpos podem variar amplamente em diferentes estágios da doença, e a progressão da enfermidade depende da natureza da resposta imunológica que os cães infectados desenvolvem (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016).

Essa particularidade pode contribuir para a compreensão da presença de kDNA de *L. infantum* somente na pelagem de cães considerados clinicamente polissintomáticos (100%; n=5/5). Se por um lado, os animais que desenvolvem uma alta imunidade específica mediada por células T podem ser capazes de controlar o parasito e apresentar uma manifestação menos grave da doença (RAMOS *et al.*, 2023). Do outro, a resposta humoral intensa é uma das principais causas da patogênese da enfermidade e pode levar à morte, uma vez que, intensidade das manifestações clínicas está diretamente relacionada à carga parasitária (CHAGAS *et al.*, 2021; MORALES-YUSTE *et al.*, 2022).

Quanto ao perfil dos cães avaliados molecularmente em nosso estudo, estes consistiram em machos, adultos (1,4 anos), SRD. O que se assemelham às principais características da LCan entre animais afetados (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SPADA *et al.*, 2020; TAMPONI *et al.*, 2021). A leishmaniose é uma doença multissistêmica, que pode se manifestar de diferentes formas, desde alterações na pele, onicogribose, aumento dos gânglios linfáticos e lesões resultantes da deposição de imunocomplexos, como artrite, problemas oculares, entre outros, conforme foi

evidenciado nesta pesquisa (OLIVEIRA *et al.*, 2019; SALANT *et al.*, 2021; CACHEIRO-LLAGUNO *et al.*, 2021).

Dessa forma, por envolver um complexo diagnóstico devido a amplitude das manifestações clínicas (GARCÍA-CASTRO *et al.*, 2022). A utilização de amostras de pelo na identificação molecular de cães com leishmaniose, inclui uma série de benefícios, em relação a determinados métodos tradicionais, pois, além de não ser uma amostra invasiva, dispensando o uso de anestesia, pode ser aplicada em estudos a campo, por meio de uma coleta e soltura rápida (BELINCHÓN-LORENZO *et al.*, 2013; CORPAS-LÓPEZ *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2017; KOTNIK *et al.*, 2021). Albergando também boa estabilidade molecular, mesmo quando exposto a condições adversas do ambiente (MUÑOZ-MADRID *et al.*, 2013).

9. CONCLUSÃO

A utilização de amostras de bulbo piloso mostrou ser uma escolha eficaz para a detecção molecular kDNA de *L. infantum*. Sendo uma alternativa rápida, simples para realização da coleta e não invasiva proposta para identificar o parasitismo por *Leishmania* sp. em hospedeiros infectados.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio supervisionado obrigatório caracteriza uma etapa crucial no aprimoramento das competências profissionais ao concluir a graduação. Nesse contexto, a experiência proporcionou ao aluno uma visão de técnicas de diagnósticos diversas, além de aprimorar conhecimentos acerca da anamnese e coleta de amostras biológicas. Assim, foi possível desenvolver habilidades inerentes ao médico veterinário como raciocínio clínico, tomada de decisões e responsabilidade. Além disso, foi importante observar a conduta e valores éticos e morais do médico veterinário, pois para se tornar um bom profissional é imperativo ser uma boa pessoa.

11. REFERÊNCIAS

- AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; ESLAMI, M. B.; KEMP, K.; KHARAZMI, A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 4, p. 1760–1764, abr. 2000.
- AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, mar. 2016.
- ARULEBA, R. T.; CARTER, K. C.; BROMBACHER, F.; HURDAYAL, R. Can We Harness Immune Responses to Improve Drug Treatment in **Leishmaniasis?Microorganisms**, 2020.
- ARUMUGAM, S.; SCORZA, B. M.; PETERSEN, C. Visceral Leishmaniasis and the Skin: **Dermal Parasite Transmission to Sand FliesPathogens**, 2022.
- AZADEH, B.; ABDULLA, F. Transepithelial elimination in cutaneous leishmaniasis. **Acta Dermato-venereológica** , v. 75, n. 2, pág. 159-159, 1995.
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGU, L. Leishmaniasis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 52, n. 6, p. 1359–1375, 2022.
- BELINCHÓN-LORENZO, S.; MUÑOZ-MADRID, R; GRANO, F. G.; INIESTA, V.; FERNÁNDEZ-COTRINA, J. et al. Application of qPCR method to hair and cerumen samples for the diagnosis of canine leishmaniosis in Araçatuba, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 15, n. January, p. 100267, 2019.
- BEZERRA, G. S. N.; BARBOSA, W. L. J.; SILVA, E. D. DA; LEAL, N. C.; MEDEIROS, Z. M. DE. Urine as a promising sample for Leishmania DNA extraction in the diagnosis of visceral leishmaniasis - a review. **The Brazilian journal of infectious diseases** : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases, v. 23, n. 2, p. 111–120, 2019.
- BONGIORNO, G.; MUCCIO, T. DI; BIANCHI, R.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. Laboratory transmission of an Asian strain of Leishmania tropica by the bite of the southern European sand fly Phlebotomus perniciosus. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 6, p. 417–421, 2019.
- BORGES, M. S.; NIERO, L. B.; ROSA, L. D. S. DA; CITADINI-ZANETTE, V.; ELIAS, G. A.; AMARAL, P. DE A. Factors associated with the expansion of leishmaniasis in urban areas: a systematic and bibliometric review (1959-2021). **Journal of public health research**, v. 11, n. 3, p. 22799036221115776, jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica**. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2014. CAVALCANTE, W. V.; FARIAS, N. R.; PIMENTEL, M. M. L.; LEANDRO, A. K. C.; MATOS, R. A. T. et al. Uso Da Miltefosina No Tratamento Clínico De Cães Com Leishmaniose Visceral: Revisão De Literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 25, n. 2conv, p. 1–8, 2022.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 305, 2022.

CHAGAS, U. M. R.; AVELAR, D. M.; MARCELINO, A. P.; PAZ, G. F. et al. orrelações entre carga parasitária tecidual e sinais clínicos comuns em cães naturalmente infectados por Leishmania infantum. **Parasitologia veterinária**, v. 291, p. 1-8, 2021

COLAÇO, M.; ROQUITO, T.; COSTA, J. P.; CRUZ, M. T.; BORGES, O. The Effect of Curcumin-Loaded Glucan Nanoparticles on Immune Cells: Size as a Critical Quality Attribute. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, fev. 2023.

CONDE, L.; MACIEL, G.; ASSIS, G. M. DE; FREIRE-DE-LIMA, L.; NICO, D.; VALE, A.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT, A. Humoral response in Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 1063291, 2022.

CONDE, L.; MACIEL, G.; ASSIS, G. M. DE; FREIRE-DE-LIMA, L.; NICO, D.; VALE, A.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT, A. Humoral response in Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 1063291, 2022.

CORPAS-LÓPEZ, V.; MERINO-ESPINOSA, G.; ACEDO-SÁNCHEZ, C.; DÍAZ-SÁEZ, V.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. et al. Hair parasite load as a new biomarker for monitoring treatment response in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 20–25, 2016

CORTES, S. et al. PCR como ferramenta rápida e sensível no diagnóstico de leishmaniose humana e canina utilizando primers cinetoplastídicos específicos para Leishmania donovani sl. **Transações da Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, pág. 12-17, 2004.

CORTES, S.; VAZ, Y.; NEVES, R.; MAIA, C.; CARDOSO, L.; CAMPINO, L. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2, p. 189–196, 2012.

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M. S. M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and Lutzomyia

(Lutzomyia) longipalpis infectivity. **Veterinary journal** (London, England : 1997), v. 174, n. 3, p. 636–643, nov. 2007.

COUTINHO-ABREU, I. V.; SERAFIM, T. D.; MENESES, C.; KAMHAWI, S.; OLIVEIRA, F.; VALENZUELA, J. G. Distinct gene expression patterns in vector-residing Leishmania infantum identify parasite stage-enriched markers. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 3, p. e0008014, mar. 2020.

COWAN, R.; VARADARAJAN, S.; WEI, A.; SALIM, T.; DALLAPIAZZA, M. Microbial perils of the tropics: A case of cutaneous leishmaniasis in an immigrant from **South America**. **IDCases**, v. 31, p. e01669, 2023.

CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; PENDERGAST, W.; CHAN, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against Leishmania donovani. **Biochemical pharmacology**, v. 36, n. 16, p. 2633–2636, ago. 1987.

DONATO, L. E.; FREITAS, L. R. S. DE; DUARTE, E. C.; ROMERO, G. A. S. Visceral leishmaniasis lethality in Brazil: an exploratory analysis of associated demographic and socioeconomic factors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20200007, 2020.

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

DUARTE, A. M. V.; ANDRADE, H. M. DE; JAMIL, S.; PAULO, V. DE; PEIXOTO, C.; MARA, T.; DABÉS, P. Assessment of chemiluminescence and PCR effectiveness in relation to conventional serological tests for the diagnosis of Chagas' disease Avaliação da eficiência da quimiluminescência e PCR em relação aos testes sorológicos convencionais para o diagnóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 385–387, 2006.

FREITAS, V. C.; PARREIRAS, K. P.; DUARTE, A. P. M.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P. Development of Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in its natural sandfly vector Lutzomyia longipalpis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 4, p. 606–612, abr. 2012.

GALLUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A.; MENOTTA, M.; MAGNANI, M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, maio 2018.

GARCÍA-CASTRO, A.; EGUI, A.; THOMAS, M. C.; LÓPEZ, M. C. Humoral and Cellular Immune Response in Asymptomatic Dogs with Visceral Leishmaniasis: A Review. **Vaccines**, v. 10, n. 6, jun. 2022.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of translational internal medicine**, v. 3, n. 2, p. 43–50, 2015.

GONÇALVES, R. S.; FRANKE, C. R.; MAGALHÃES-JUNIOR, J. T.; SOUZA, B. M. P. S.; SOLCÀ, M. S. et al. Association between *Leishmania infantum* DNA in the hair of dogs and their infectiousness to *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology**, v. 232, p. 43–47, 2016.

GRATACÓS-CUBARSÍ, M.; GARCÍA-REGUEIRO, J.-A.; CASTELLARI, M. Assessment of enrofloxacin and ciprofloxacin accumulation in pig and calf hair by HPLC and fluorimetric detection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 387, n. 6, p. 1991–1998, mar. 2007

HASSAN, M. M.; OSMAN, O. F.; EL-RABA'A, F. M. A.; SCHALLIG, H. D. F. H.; ELNAIEM, D.-E. A. Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. 26, 2009.

JESUS, M. S.; CRUZ, J. V. A.; COELHO, L. B.; BORJA, L. S.; SILVA, E. D. et al. Early detection and persistent positivity of anti-*Leishmania* antibodies using a recombinant protein-based ELISA in naturally infected dogs in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 398, 2021.

JOHN, B.; HUNTER, C. A. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? **Science** (New York, N.Y.), v. 321, n. 5891, p. 917–918, ago. 2008.

JUNGUDOMJAROEN, S.; PHUMEE, A.; CHUSRI, S.; KRAIVICHIAN, K.; JARIYAPAN, N.; PAYUNGORN, S.; SIRIYASATIEN, P. Detection of *Leishmania martiniquensis* DNA in various clinical samples by quantitative PCR. **Tropical biomedicine**, v. 32, n. 4, p. 736–744, dez. 2015.

KARRAM, S.; LOYA, A.; HAMAM, H.; HABIB, R. H.; KHALIFEH, I. Transepidermal elimination in cutaneous leishmaniasis: A multiregional study. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 39, n. 4, p. 406–412, 2012.

KARUNaweera, N. D.; FERREIRA, M. U. Leishmaniasis: current challenges and prospects for elimination with special focus on the South Asian region. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 425–429, abr. 2018.

KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1–24, 1 jan. 1990.

KUMOSANI, T. A.; AL-BOGAMI, T. J.; BARBOUR, E. K.; ALSHEHRI, S. H.; YAGHMOOR, S. S.; ALSHAREEF, N. A. et al. Leishmaniasis prevalence, awareness and control in Saudi Arabia. **African health sciences**, v. 22, n. 3, p. 640–647, 2022.

LAINSON, R.; BRAGA, R. R.; SOUZA, A. A. DE; PÔVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A.; SILVEIRA, F. T. Leishmania (Viannia) shawi sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 64, n. 3, p. 200–207, 1989.

LEWIS, M. D.; PAUN, A.; ROMANO, A.; LANGSTON, H.; LANGNER, C. A.; MOORE, I. N. et al. Fatal progression of experimental visceral leishmaniasis is associated with intestinal parasitism and secondary infection by commensal bacteria, and is delayed by antibiotic prophylaxis. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 4, p. e1008456, abr. 2020.

LOPES, E. G.; SEVÁ, A. P.; FERREIRA, F.; NUNES, C. M.; KEID, L. B. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and infection**, v. 145, n. 12, p. 2436–2444, 2017.

MACHADO, A. S.; RAMOS, F.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; SANTOS, T. T. O.; LUDOLF, F. et al. A Leishmania infantum hypothetical protein evaluated as a recombinant protein and specific B-cell epitope for the serodiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 203, p. 105318, 2020

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 9–16, 2019

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspectsa. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 9–16, 2019.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Biomarkers Associated With Leishmania infantum Exposure, Infection, and Disease in Dogs. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 302, 2018.

MAIA, C.; CRISTÓVÃO, J.; PEREIRA, A.; KOSTALOVA, T.; LESTINOVA, T.; SUMOVA, P.; VOLF, P.; CAMPINO, L. Monitoring Leishmania infection and exposure to Phlebotomus perniciosus using minimal and non-invasive canine samples. **Parasites & vectors**, v. 13, n. 1, p. 119, abr. 2020.

MARCELINO, A. P.; FILHO, J. A.S.; E BASTOS, C. V.; RIBEIRO, S. R.; MEDEIROS, F. A. C. et al. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Acta tropica**, v. 207, p. 105495, jul. 2020.

MAROLI, M.; FELICIANGLI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, 1 jun. 2013.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A. O.; MIRANDA, L. F. C. et al. Anthropogenic Dispersal of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the Americas: A Plausible Hypothesis. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 2, n. September, p. 1–9, 2021.

MENEZES, K. R. Guia ilustrado de triatomíneos do Estado de Pernambuco. 2019. Dissertação (Mestrado em Entomologia em Saúde Pública) - **Faculdade de Saúde Pública**, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

MICHALSKY, E. M; ROCHA, M. F; LIMA, A. C. M. R; FRANÇA-SILVA, J. C; PIRES, M, Q. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary parasitology**, v. 147, n. 1–2, p. 67–76, jun. 2007.

MIRZAEI, A.; AHMADIPOUR, F.; CANNET, A.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; PERRIN, P.; DORKELD, F.; SERENO, D.; AKHOUNDI, M. Immunodetection and molecular determination of visceral and cutaneous *Leishmania* infection using patients' urine. Infection, genetics and evolution : **journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 63, p. 257–268, set. 2018.

MOLINA, R.; JIMÉNEZ, M. I.; CRUZ, I.; IRISO, A.; MARTÍN-MARTÍN, I.; SEVILLANO, O.; MELERO, S.; BERNAL, J. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. **Veterinary parasitology**, v. 190, n. 1–2, p. 268–271, nov. 2012.

MONTOYA, A.; QUADROS, L. P.; MATEO, M.; HERNÁNDEZ, L.; GÁLVEZ, R. et al. Journal of zoo and wildlife medicine : **official publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, v. 47, n. 2, p. 586–593, jun. 2016.

MUÑOZ-MADRID, R.; BELINCHÓN-LORENZO, S.; INIESTA, V.; FERNÁNDEZ-COTRINA, J.; PAREJO, J. C. et al. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. **Acta tropica**, v. 128, n. 3, p. 706–709, dez. 2013.

NASCIMENTO, L. F. M.; MIRANDA, D. F. H.; MOURA, L. D.; PINHO, F. A.; WERNECK, G. L. et al. Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in L. infantum-infected dogs. **Vaccine**, X, v. 4, p. 100048, abr. 2020.

NGUYEN, A. V; SOULIKA, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, abr. 2019.

NICOLATO, R. DE C. et al. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally Leishmania infantum-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e82947, 2013.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 34, n. 12, p. 551–561, dez. 2012.

OLIVEIRA, M. R.; NETO, M. B. O.; BEZERRA, T. L.; SILVA, W. S. I. DA; PAZ, W. S. DA; SANTOS, I. G. DOS; BEZERRA-SANTOS, M.; LIMA, V. F. S. Canine leishmaniasis in an endemic region, Northeastern Brazil: a comparative study with four groups of animals. **Parasitology Research**, v. 120, n. 11, p. 3915–3923, 2021.

PAL, M.; EJETA, I.; GIRMA, A.; DAVE, K.; DAVE, P. Etiology, Clinical Spectrum, Epidemiology, Diagnosis, Public Health Significance and Control of Leishmaniasis: A Comprehensive Review. **Acta Scientific Microbiology**, n. May, p. 110–121, 2022.

PASSELLI, K.; BILLION, O.; TACCHINI-COTTIER, F. The Impact of Neutrophil Recruitment to the Skin on the Pathology Induced by Leishmania Infection. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 649348, 2021.

PATRA, R. C.; SWARUP, D.; NARESH, R.; KUMAR, P.; NANDI, D.; SHEKHAR, P.; ROY, S.; ALI, S. L. Tail hair as an indicator of environmental exposure of cows to lead and cadmium in different industrial areas. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 66, n. 1, p. 127–131, jan. 2007.

PEACHEY, A. M.; IRVINE, G. H.; WHITE, H. Visceral leishmaniasis: an unusual cervical presentation. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 32, n. 5, p. 325–327, 1994

PEACHEY, A. M.; IRVINE, G. H.; WHITE, H. Visceral leishmaniasis: an unusual cervical presentation. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 32, n. 5, p. 325–327, 1994.

PEREIRA, A.; MAIA, C. Leishmania infection in cats and feline leishmaniosis: An updated review with a proposal of a diagnosis algorithm and prevention guidelines. *Current research in parasitology & vector-borne diseases*, v. 1, p. 100035, 2021.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* (New York, N.Y.), v. 321, n. 5891, p. 970–974, ago. 2008.

PINEDA, C.; AGUILERA-TEJERO, E.; MORALES, M. C.; BELINCHON-LORENZO, S.; GOMEZ-NIETO, L. C. et al. Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. *PloS one*, v. 12, n. 10, p. e0185981, 2017.

PINTOC. S.; ALVESV. R.; SANTOSW. S.; GARCEZL. M. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) vetores de Leishmania spp., em área endêmica para a leishmaniose tegumentar no nordeste do Pará, Brasil. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 15, n. 10, p. e11038, 3 out. 2022.

PORCELLATO, I.; MORGANTI, G.; ANTOGNONI, M. T.; WALCZAK, K. M.; ARCANGELI, S. et al. Comparison of immunohistochemical and qPCR methods from granulomatous dermatitis lesions for detection of leishmania in dogs living in endemic areas: a preliminary study. *Parasites & vectors*, v. 15, n. 1, p. 104, mar. 2022.

QUINNELL, R.J., COURTENAY, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915-1934.

Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915-1934.

RAMOS, R. A. N.; GIANNELLI, A.; FASQUELLE, F.; SCUOTTO, A.; BETBEDER, D. Effective immuno-therapeutic treatment of Canine Leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 17, n. 5, p. e0011360, maio 2023.

RIBEIRO, C. J. N. et al. Space-time risk cluster of visceral leishmaniasis in Brazilian endemic region with high social vulnerability: An ecological time series study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 1, p. e0009006, 2021.

RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; SILVA, M. E. DA; SANTOS, C. C. P. DOS; FRÉZARD, F. J. G.; SILVA, S. M. DA. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed research international*, v. 2018, p. 3296893, 2018. RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; SILVA, M. E. DA; SANTOS, C. C. P. DOS; FRÉZARD, F. J. G.; SILVA, S. M. DA. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed research international*, v. 2018, p. 3296893, 2018.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. Pt 5, p. 495–507, maio 2002.

ROLÃO, N.; CORTES, S.; GOMES-PEREIRA, S.; CAMPINO, L. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Experimental parasitology**, v. 115, n. 3, p. 270–276, mar. 2007.

RUSSELL, D. G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 136, n. 7, p. 2613–2620, abr. 1986.

SAHA, A.; ROY, S.; UKIL, A. Cytokines and Signaling Networks Regulating Disease Outcomes in Leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 90, n. 8, p. e0024822, ago. 2022.

SAINI, I.; JOSHI, J.; KAUR, S. Unwelcome prevalence of leishmaniasis with several other infectious diseases. **International Immunopharmacology**, v. 110, p. 109059, 2022.

SAMPAIO, R. N. R.; FERREIRA, M. F.; MARTINS, S. S.; MOTTA, J. DE O. C. DA. Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 5, p. 602–604, 2021.

SANTANA, R. S.; SOUZA, K. B.; LUSSARI, F.; FONSECA, E. S.; ANDRADE, C. O.; MEIDAS, M. M. K. et al. Cases and distribution of visceral leishmaniasis in western São Paulo: A neglected disease in this region of Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009411, 15 jun. 2021.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, jun. 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

SEBASTIÁN-PÉREZ, V.; MARTÍNEZ DE ITURRATE, P.; NÁCHER-VÁZQUEZ, M.; NÓVOA, L.; PÉREZ, C.; CAMPILLO, N. E.; GIL, C.; RIVAS, L. Naphthoquinone as a New Chemical Scaffold for Leishmanicidal Inhibitors of *Leishmania* GSK-3. **Biomedicines**, 2022.

SERENO, D.; AKHOUNDI, M.; SAYEHMURI, K.; MIRZAEI, A.; HOLZMULLER, P.; LEJON, V.; WALECKX, E. Noninvasive biological samples to detect and diagnose infections due to trypanosomatidae parasites: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, 2020.

SEVILHA-SANTOS, L.; SANTOS JÚNIOR, A. C. M.; MEDEIROS-SILVA, V.; BERGMANN, J. O.; SILVA, E. F. Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 2, p. 242–247, 2019.

SHAHI, M.; MOHAJERY, M.; SHAMSIAN, S. A. A.; NAHREVANIAN, H.; YAZDANPANAH, S. M. J. Comparison of Th1 and Th2 responses in non-healing and healing patients with cutaneous leishmaniasis. **Reports of biochemistry & molecular biology**, v. 1, n. 2, p. 43–48, abr. 2013.

SHIMABUKURO, P. H. F.; ANDRADE, A. J. DE; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, n. 660, p. 67–106, 2017.

SILVA, A. F. C.. Uma história das leishmanioses em perspectiva global A history of the leishmaniasis from a global perspective. p. 1088–1091, 2021.

SILVA, F. M. DE F.; SANTOS, E. M. DE S.; TORRES, S. M.; YAMASAK, E. M.; RAMOS, R. A. N.; ALVES, L. C. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, v. 25, n. 1, p. 127–130, 2016.

SILVA, K. R. DA; MENDONÇA, V. R. R. DE; SILVA, K. M.; NASCIMENTO, L. F. M. DO; MENDES-SOUSA, A. F.; PINHO, F. A. DE; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. M. P.; CRUZ, M. DO S. P. E. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 53–63, jan. 2017.

SILVA, R. F.; STEBUT, E. VON. Unraveling the Role of Immune Checkpoints in Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

SOARES, M. R. A.; MENDONÇA, I. L. DE; BONFIM, J. M. DO; RODRIGUES, J. A.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta tropica**, v. 117, n. 1, p. 6–9, jan. 2011.

SOBEL, T. F.; MUNIZ, A. L. P.; COSTA, E. DE F. Divisão regional do desenvolvimento humano em Pernambuco: uma aplicação da análise de cluster. **Revista Teoria e Evidência Econômica**, v. 15, n. 33 SE-, 1 ago. 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; FILIPPO, L. DI; ORDEIX, L.; PLANELLAS, M.; ROURA, X. et al. Early reduction of *Leishmania infantum*-specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 235, maio 2016.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

SPADA, J. C. P.; SILVA, D. T.; ALVES, M. L.; CÁRDENAS, N. C.; INLAMEA, O. F. et al. Risk factors associated with *Leishmania* exposure among dogs in a rural area of Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20200059–e20200059, 2020.

STANIEK, M. E.; HAMILTON, J. G. C. Odour of domestic dogs infected with *Leishmania infantum* is attractive to female but not male sand flies: Evidence for parasite manipulation. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 3, p. e1009354, mar. 2021.

STOUT, P. R.; CLAFFEY, D. J.; RUTH, J. A. Incorporation and retention of radiolabeled S-(+)- and R(-)-methamphetamine and S(+)- and R(-)-N-(n-butyl)-amphetamine in mouse hair after systemic administration. Drug metabolism and disposition: the **biological fate of chemicals**, v. 28, n. 3, p. 286–291, mar. 2000.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, R. E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, abr. 2008.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 3, n. 5, p. 733–740, out. 2007.

TAMPONI, C.; SCARPA, F.; CARTA, S.; KNOLL, S.; SANNA, D. et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Leishmania infantum* in dogs in Sardinia (Italy), an endemic island for leishmaniasis. **Parasitology research**, v. 120, n. 1, p. 289–300, jan. 2021.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*, v. 44, n. 2, p. 253–272, jun. 2020.

TSAKMAKIDIS, I.; ANGELOPOULOU, K.; DOVAS, C. I.; DOKIANAKIS, E.; TAMVAKIS, A.; SYMEONIDOU, I.; ANTONIOU, M.; DIAKOU, A. Leishmania infection in rodents in Greece. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 22, n. 12, p. 1523–1532, dez. 2017.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of Leishmania parasites. **Annual review of microbiology**, v. 46, p. 65–94, 1992.

VATANDOOST, H.; NEJATI, J.; SAGHAFIPOUR, A.; ZAHRAEI-RAMAZANI, A. Geographic and ecological features of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) as leishmaniasis in Central Iran. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*, v. 42, n. 1, p. 43–49, mar. 2018.

VIOTI, G.; LEONEL, J. A. F.; LEMES, K. M.; PEREIRA, V. F.; FERREIRA, H. L.; KEID, L. B.; MADUREIRA, E. H.; SOARES, R. M.; BENASSI, J. C.; OLIVEIRA, T. M. F. DE S. Molecular detection of Leishmania spp. in cattle from Brazil by means of PCR using internal transcribed spacer 1. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 28, n. 2, p. 303–305, jun. 2019.

VIOTI, G.; LEONEL, J. A. F.; LEMES, K. M.; PEREIRA, V. F.; FERREIRA, H. L.; KEID, L. B.; MADUREIRA, E. H.; SOARES, R. M.; BENASSI, J. C.; OLIVEIRA, T. M. F. DE S. Molecular detection of Leishmania spp. in cattle from Brazil by means of PCR using internal transcribed spacer 1. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, v. 28, n. 2, p. 303–305, jun. 2019.

WALTERS, L. L. Leishmania differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 40, n. 2, p. 196–206, 1993.

YASMIN, H.; ADHIKARY, A.; AL-AHDAL, M.; ROY, S.; KISHORE, U. Host–Pathogen Interaction in Leishmaniasis: Immune Response and Vaccination Strategies. **Immuno**, v. 2, p. 218–254, 9 mar. 2022.

YOUNG, J.; KIMA, P. E. The Leishmania Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite–Host Interface. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 92, n. 3, p. 511–521, set. 2019.

ZHANG, X.; LIU, Y.; ZHANG, M.; WANG, Z.; FENG, X.; YANG, L.; WANG, Y.; LIU, J.; ZHAO, D. Case report: Diagnosis of visceral leishmaniasis using metagenomic next-generation sequencing and bone marrow smear. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, 2022.