

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**TAIANE ACUNHA ESCOBAR**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO CLÍNICA, BIOQUÍMICA E  
HEMATOLÓGICA EM EQUINOS E CANINOS COM LEISHMANIOSE**

**Uruguaiana  
2019**

**TAIANE ACUNHA ESCOBAR**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO CLÍNICA, BIOQUÍMICA E  
HEMATOLÓGICA EM EQUINOS E CANINOS COM LEISHMANIOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanusa Manfredini

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Irina Lübeck

**Uruguaiana**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

E74i Escobar, Taiane Acunha  
Identificação molecular e avaliação clínica, bioquímica e  
hematológica em equinos e caninos com leishmaniose / Taiane  
Acunha Escobar.  
104 p.  
  
Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO  
EM CIÊNCIA ANIMAL, 2019.  
"Orientação: Vanusa Manfredini".  
  
1. leishmaniose visceral canina. 2. leishmaniose equina. 3.  
doenças parasitárias. 4. métodos de diagnóstico. 5. PCR. I.  
Título.

TAIANE ACUNHA ESCOBAR

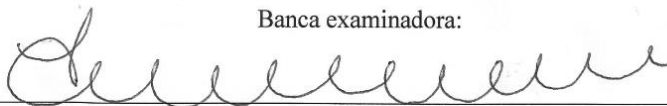
**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO CLÍNICA, BIOQUÍMICA E  
HEMATOLÓGICA EM EQUINOS E CANINOS COM LEISHMANIOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.

Área de Concentração: Bioprospecção molecular

Tese defendida e aprovada em: 31 de outubro de 2019.

Banca examinadora:



Prof.ª Dr.ª Irina Lubeck

Co-orientadora - Programa de Pós Graduação em Bioquímica – UNIPAMPA



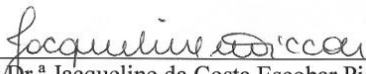
Prof.ª Dr.ª Simone Pinton

Programa de Pós Graduação em Bioquímica – UNIPAMPA



Prof. Dr. Mário Celso Sperotto Brum

Programa de Pós Graduação em Ciência Animal – UNIPAMPA



Prof.ª Dr.ª Jacqueline da Costa Escobar Piccoli

Programa de Pós Graduação em Bioquímica – UNIPAMPA



Prof. Dr. Charley Christian Staats

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Nilson e Maria Aparecida, que sempre  
batalharam para que eu tivesse uma  
educação de qualidade e não mediram  
esforços para me apoiar.

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela vida, através da minha fé, consegui me manter tranquila, forte e esperançosa nos momentos mais difíceis ao longo da caminhada.

Agradeço infinitamente aos meus pais por todas as oportunidades de formação pessoal e acadêmica que me proporcionaram, e por todos os momentos em que me apoiaram, e me conduziram na construção do caráter e educação, sem os quais jamais alcançaria este título. Aos meus irmãos Renan e Taise, cunhados Stefany e Edir e meu primo Madson que muitas vezes compartilharam as minhas angústias e os momentos difíceis, sempre estiveram presentes oferecendo apoio em gestos e palavras e na torcida para que esse sonho se concretizasse.

Ao meu amado marido Mário Finardi, por ser um dos maiores apoiadores desta caminhada junto com minha família, por me incentivar, acreditar e entender quando por diversas vezes estive ausente.

À professora Vanusa Manfredini, orientadora deste trabalho, pela oportunidade e também a todos os colegas do Grupo Gestox.

As minhas duas co-orientadoras, professoras Irina Lübeck e Claudia Acosta Duarte, pelo apoio incondicional, e principalmente por confiarem e acreditarem em mim, por toda ajuda nas coletas e nas análises laboratoriais.

À equipe do “Projeto Carroceiro”, por todo apoio e suporte durante a realização das coletas, sem os quais seria impossível desenvolver o experimento, em especial à Geórgia Góss, Bruno Romero, Marcelo Porciúncula, Carla Leite, Loreane Rosa.

Agradeço aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica que auxiliaram em meu crescimento técnico e intelectual ao longo desses anos.

À equipe do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal do Pampa, onde o experimento foi desenvolvido em grande parte, que de uma forma ou de outra me auxiliaram durante os dias em que passamos juntos. Aos estagiários que passaram ao longo do experimento, em especial Fábio Píffero, Leonardo Trentim, Fernanda Bastian, Arieli Goularte, técnica do laboratório Karina Braccini e professor Fabrício Mozzaquatro. Em especial, agradeço imensamente às minhas fiéis escudeiras, Gabriela Dowich, Leticia Cantele e Thália Pacheco por toda a dedicação, eficiência, companheirismo, auxílio incansável mesmo nos finais de semanas e nas férias, estavam sempre dispostas a me ajudar.

Agradeço imensamente à amiga e colega Luiza Zuravski, que por todo tempo de doutorado me apoiou incondicionalmente oferecendo palavras de conforto nas horas mais difíceis, e sem contar o conhecimento técnico que me transmitiu durante os experimentos, assim como os conselhos, paciência e principalmente a amizade sincera.

Também não poderia deixar de agradecer ao professor Michel Mansur Machado, que juntamente com a amiga Luiza, foi responsável por valiosas trocas de informações técnicas, pela disponibilizando as dependências do Laboratório de Imunologia e Toxicologia Clínica para a condução de alguns experimentos.

À todos os proprietários dos animais, por disponibilizarem seu tempo e atenção e aceitarem nossa intervenção proporcionando a realização do estudo.

À equipe da Coordenação Acadêmica, em especial às servidoras Eloisa Fortes, Patricia Altermann e Marciana Demarchi por sempre me receberem de braços abertos, as inúmeras vezes me auxiliarem nos momentos de urgência e necessidade.

À minha querida amiga/professora de Inglês Karen Saldanha da Silva Rocha, que dedicou muitas horas para ensinar e auxiliar no inglês das publicações, tua ajuda foi imprescindível.

E quando tudo estava difícil e tenso, as terapias da Graduanda em Fisioterapia Gabrieli Ritter me ajudaram a manter o equilíbrio, obrigada pela paciência e pela tua disponibilidade.

A Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiana e a CAPES pelo auxílio financeiro e à concessão da bolsa. Em especial à Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação pelo auxílio na publicação do artigo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul pela concessão de financiamento do Programa PPSUS que proporcionou a aquisição de materiais de consumo, equipamentos e qualificação profissional, os quais tive a grande satisfação de usufruir durante uma parte do desenvolvimento dos experimentos.

Professora Mirela e equipe do laboratório ACVET pela ajuda e pela valiosa colaboração na condução de algumas análises laboratoriais.

À Empresa Bioclin Quibasa por doar material para a realização das análises bioquímicas.

Aos professores Charley Christian Staats, Livia Kmetzsch Rosa e Silva, Augusto Schrank e Marilene Henning Vainstein do Centro de Biotecnologia da UFRGS pela oportunidade de realizar treinamento e desenvolver experimentos nos laboratórios, pelas inúmeras vezes que foram solicitadas orientações técnicas e empréstimo de materiais,

também agradeço a doutoranda Patrícia Aline Gröhns Ferrareze e a Dr<sup>a</sup> Ângela Junges pelo auxílio e pelos ensinamentos repassados nos períodos de treinamento.

Agradeço a equipe do Laboratório *Coleção de Leishmania* CLIIOC da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pela doação das cepas de *Leishmania* utilizadas em todo o experimento e pelo treinamento realizado.

Ao Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, pelo carinho e acolhimento durante o período em que estive realizando treinamento, foi uma experiência única, em especial às Pesquisadoras Dr<sup>a</sup> Aline Fagundes e Dr<sup>a</sup> Eliame Mouta pela acolhida durante o período de treinamento, pela amizade e por todos os ensinamentos. As queridas, Célia e Beatriz que se tornaram pessoas especiais, as quais tive a oportunidade de conviver durante o treinamento.

A super amiga Fernanda Viviani pela acolhida durante a estadia no Rio de Janeiro, os passeios e momentos de descontração durante as três semanas que estive lá.

A amigona Caroline Medeiros que sempre me recebeu na sua casa quando eu precisava estar em Porto Alegre para os cursos ou congressos.

A minha família que sempre torceu por mim, em especial a minha vó Izar e às tias Marleni, Nilza e Fátima, que prontamente me receberam todas as vezes que estive fora e que sempre tiveram as palavras e a companhia certa nos momentos de desafios.

Aos colegas de trabalho da Secretaria de Saúde de Uruguaiana, pelo apoio e torcida nestes últimos meses.

Aos professores que eu tive a honra de conviver e aprender durante toda a vida escolar, desde o início, na pré-escola, até aqui, todos foram essenciais na minha vida. Em especial à querida amiga Maria Del Carmen Braccini que me apresentou à pesquisa, e que também mostrou grandes qualidades durante o tempo em que tive a honra de ser sua aluna.

Aos professores da Banca Examinadora pela disponibilidade e interesse em contribuir com este trabalho.

Aos revisores e editores dos periódicos dos, nos quais os artigos foram aceitos, foi um grande aprendizado em vários aspectos, as contribuições feitas por eles foram essenciais para a publicação dos artigos.



“Corte-se até a verba para a alimentação.  
Mas não se sacrifique a Biblioteca.”

Oswaldo Cruz

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Universidade Federal do Pampa

### IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO CLÍNICA, BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA EM EQUINOS E CANINOS COM LEISHMANIOSE

Autora: Taiane Acunha Escobar  
Orientadora: Vanusa Manfredini  
Co-orientadora: Irina Lübeck

Data e local da defesa: Uruguaiana, 31 de outubro de 2019.

A leishmaniose é uma enfermidade parasitária infecciosa, de transmissão vetorial, causada pelos protozoários do gênero *Leishmania*. Acomete diversas espécies vertebradas, sendo o cão, o principal reservatório urbano. Os equinos, especialmente em contato com reservatórios ou vetores, podem ser infectados. Frente à situação epidemiológica da leishmaniose visceral (LV) em Uruguaiana, fronteira oeste do Rio Grande do Sul, a qual é classificada como área de transmissão da enfermidade, o presente estudo teve finalidade de realizar a identificação molecular das espécies de *Leishmania* em caninos e equinos, bem como avaliar sinais clínicos, alterações hematológicas, bioquímicas e de estresse oxidativo dos animais infectados. Participaram do experimento 127 animais (98 equinos e 29 caninos), de ambos os sexos com raças e idades variadas, entre novembro de 2016 e setembro de 2017, de regiões urbanas e periurbanas do município. Foi realizada anamnese e os animais foram submetidos a avaliação clínica e coleta de sangue periférico. O diagnóstico molecular, empregando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi realizado após extração de DNA do sangue, com dois pares de iniciadores: RV1/RV2 – os quais hibridizam a região LT1 do kDNA gerando um *amplicon* de 145 pb; e os iniciadores L5.8SR/LITSV – específicos para a região ITS2 do DNA ribossomal, gerando um *amplicon* de 750 pb. Estes amplicons tiveram sua sequência determinada, a qual foi posteriormente utilizada para inferência filogenética. As alterações hematológicas e bioquímicas foram avaliadas com analisador hematológico (*Sysmex KX-21N*), contagem diferencial em lâminas de esfregaço e analisador bioquímico (*Wiener CM 200*) com kits comerciais Bioclin - Quibasa. O dano oxidativo foi mensurado pelo emprego das técnicas de Peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas. O diagnóstico molecular identificou 14 equinos e

15 caninos infectados por *Leishmania* spp.. Destes, foram determinadas as sequências obtidas nos amplicons oriundos de 11 equinos e 14 caninos. A caracterização molecular revelou similaridade com: *Leishmania infantum*/ *Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani* e *Leishmania major*. As principais alterações clínicas e hematológicas encontradas foram: lesões de pele, nódulos, linfadenopatia, redução da quantidade de hemácias e hematócrito, além de aumento da ureia em equinos. Nos cães, observou-se uma diminuição na quantidade de hemácias e linfocitose. Não foram observadas alterações nos marcadores de estresse oxidativo. Este trabalho foi pioneiro na identificação e caracterização de *Leishmania* spp. circulantes na região da fronteira oeste do Rio Grande do Sul, após a classificação desta área como local de transmissão da LV. Também, foram iniciadas as investigações sobre a infecção por *Leishmania* e a avaliação das alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e de estresse oxidativo em equinos provenientes de áreas com LVC no município. Pesquisas devem ser intensificadas para reconhecer os diferentes hospedeiros e suas alterações clínicas, bem como aprimorar as técnicas de identificação e caracterização das espécies infectantes na região, que representa fundamental importância epidemiológica considerando a localização, Brasil/Uruguai/Argentina, para então reavaliar-se as medidas de controle e prevenção da leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina. Leishmaniose equina. Doenças Parasitárias. Métodos de Diagnóstico. PCR.

## **ABSTRACT**

Doctoral Thesis  
Biochemistry Postgraduate Program  
Federal University of Pampa

# **MOLECULAR IDENTIFICATION AND CLINICAL, BIOCHEMICAL, HAEMATOLOGICAL EVALUATION OF EQUINE AND CANINE LEISHMANIOSIS**

Author: Taiane Acunha Escobar  
Advisor: Vanusa Manfredini  
Coadvisor: Irina Lübeck  
Date and Place: Uruguaiiana, October, 31, 2019.

Leishmaniosis is a vector-borne infectious parasitic disease, caused by *Leishmania* protozoa. It affects several vertebrate species, being the dog as the main urban reservoir. Equines can also be infected, especially when in contact with reservoirs or vectors in endemic areas. In view of the epidemiological situation of visceral leishmaniosis (VL) in Uruguaiiana, western border of Rio Grande do Sul, as the transmission area, this study was carried out to perform molecular identification of *Leishmania* sp. in canines and equines, as well as to evaluate clinical signs, haematological, biochemical and oxidative stress disorders of infected animals. A total of 127 animals (98 horses and 29 canines) of both genders with different breeds and ages, in the period ranging from November 2016 to September 2017, present either in urban and suburbs areas of the municipality, participated in the experiment. Anamnesis was performed and the animals underwent clinical evaluation and peripheral blood collection. The molecular diagnosis was performed using Polymerase Chain Reaction (PCR) with DNA isolated from blood samples, with two primer pairs: RV1 / RV2 - which hybridizes to kDNA LT1 region (amplicon of 145 bp); and the L5.8SR / LITSV primers - specific for the 750 bp ribosomal DNA ITS2 region. These amplicons had their sequences determined and used for phylogenetic inference. Haematological and biochemical changes were assessed with hematology analyzer (Sysmex KX-21N), differential smear slide count and biochemical analyzer (Wiener CM 200) with commercial Bioclin - Quibasa kits. Lipid peroxidation and protein carbonylation techniques were employed for oxidative damage analysis. Molecular diagnosis identified 14 horses and 15 canines infected by

*Leishmania* spp.. From these, the amplicons obtained from 11 horses and 14 canines were determined. Molecular characterization revealed similarity with: *Leishmania infantum* / *Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani* and *Leishmania major*. The main clinical and haematological disorders were: skin lesions, nodules, lymphadenopathy, red blood cells and hematocrit decrease, and increase of urea in horses. In dogs, there were a decrease in the amount of red blood cells and lymphocytosis. No changes in oxidative stress markers were observed. This work pioneered the identification and characterization of *Leishmania* spp. circulating in the western border region of Rio Grande do Sul, after identifying this area as the transmission area for VL. In addition, investigations into the *Leishmania* infection and the evaluation of clinical, hematological, biochemical and oxidative stress alterations in horses from areas with CVL in the municipality were initiated. Research should be intensified to recognize the different hosts and their clinical alterations, as well as to improve the identification and characterization techniques of the infecting species in the region, which represents fundamental epidemiological importance considering the location, Brazil / Uruguay / Argentina, in order to re-evaluate the measures of control and prevention of leishmaniosis.

Keywords: Canine visceral leishmaniosis. Equine leishmaniosis. Parasitic Disease. Diagnostic Methods. Infection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> .....	26
Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão: Formas Promastigotas e Amastigotas de <i>Leishmania</i> .....	27
Figura 3 - Organização celular dos protozoários tripamossomatídeos.....	28
Figura 4 - Organização do <i>locus</i> do DNA ribossomal de <i>Leishmania</i> sp. ....	29
Figura 5 - kDNA do maxi círculo e seu genes e fragmentos de cinco espécies de <i>Leishmania</i> : <i>L. major</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. tarentolae</i> .....	30
Figura 6 - Organização do mini círculo do kDNA de <i>Leishmania</i> spp. ....	31
Figura 7 - Mini círculos do kDNA de <i>Leishmania</i> e seus fragmentos das regiões conservadas – CBS (sequências de blocos conservados) .....	31
Figura 8 - Estágios do desenvolvimento de <i>Leishmania</i> sp. no tubo digestório do flebotomíneo.....	33
Figura 9 - Ciclo de vida do protozoário <i>Leishmania</i> sp. ....	34
Figura 10 – Repasto sanguíneo da fêmea adulta da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	37
Figura 11 - Situação epidemiológica da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul - Agosto de 2019.....	43
Figura 12 – Sinais clínicos clássicos da leishmaniose visceral canina.....	46
Figura 13 - Equino com sinal clínico da infecção por <i>Leishmania infantum</i> - nódulo solitário na região dos olhos. ....	47
Figura 14 - Equino com sinais clínicos de leishmaniose.....	48
Figura 15 - Leishmaniose em equinos e caninos no município de Uruguaiana - RS.....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alvos moleculares das regiões kDNA e ITS para diagnóstico de <i>Leishmania</i> spp.....	55
Tabela 2- Teste de normalidade da população canina - <i>Shapiro-Wilk</i> , valores de probabilidade, brutos e após transformação. ....	61
Tabela 3 – Teste de normalidade da população equina - <i>Kolmogorov-Smirnov</i> , valores de probabilidade, brutos e após transformação. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

a.C – antes de Cristo

A/G – Razão Reduzida de albumina / globulina

A/T – (adenina/timina)

bp – *base pairs*

cNOS – óxido nítrico sintase constitutiva

CVL – *Canine visceral leishmaniosis*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio Padrão

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FC – Frequência cardíaca

FR – Frequência respiratória

GSH – Glutationa reduzida

GSSH – Glutationa oxidada

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

IFN  $\gamma$  – Interferon-gama

ITS – *Internal transcribed spacers*

ITS1 – *Internal transcribed spacers 1*

ITS2 – *Internal transcribed spacers 2*

kb - quilobase

kDNA – ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LCH – Leishmaniose cutânea humana

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LM – Leishmaniose mucosa

LO – Radical alcóxila

LOO – Radical peróxila



LOOH – Hidroperóxido  
LPG – lipofosfolípidos  
LPO – Peroxidação lipídica  
LSU – subunidade maior do DNA ribossomal  
LV – Leishmaniose visceral  
LVC – Leishmaniose visceral canina  
LVH – Leishmaniose visceral humana  
MDA – Malondialdeído  
min – minutos  
NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina  
NO – Óxido nítrico  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Ânion superóxido  
•OH – Radical hidroxila  
pb – pares de bases  
PC – Proteína carbonilada  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
PKDL – Leishmaniose Post- Kala-azar  
rDNA – DNA ribossomal  
RIFI – Imunofluorescência Indireta  
rpm – Rotações por minuto  
SSU – subunidade menor do DNA ribossomal  
T - Tripanotona  
TBARS – Ácido tiobarbitúrico  
TC – Temperatura corporal  
TNF  $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  
TPC – Tempo de preenchimento capilar  
TR – Tripanotona redutase  
VL – *Visceral leishmaniosis*  
 $\mu$ L – microlitros  
 $\mu$ m – micrômetros

## LISTA DE SIGLAS

CEUA – Comissão de Ética em Uso Animal

CEVS – Centro Estadual de Vigilância em Saúde

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

LACEN – Laboratório Central do Estado

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde

PAHO – *Pan American Health Organization*

SES – Secretaria Estadual de Saúde

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SP – São Paulo

TR DPP – Teste Rápido *Dual Path Platform*

WHO – *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>22</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
2.1 Os Protozoários do gênero <i>Leishmania</i> .....	24
2.2 Aspectos estruturais dos Parasitos do Gênero <i>Leishmania</i> .....	27
2.2.1 Genoma dos Parasitos do Gênero <i>Leishmania</i> .....	28
2.3 Ciclo Biológico.....	32
2.5 Os Vetores da leishmaniose visceral .....	34
2.5.1. Distribuição vetorial .....	34
2.5.2. Características do vetor .....	36
2.5.3. Hábitos alimentares do vetor .....	38
2.6 Reservatórios e Hospedeiros Mamíferos .....	39
2.7 Epidemiologia.....	41
2.8 Formas Clínicas da leishmaniose visceral .....	44
2.8.1. Formas clínicas da leishmaniose visceral em humanos .....	44
2.8.2. Formas clínicas da leishmaniose visceral em animais domésticos .....	45
2.8.2.1 Cães .....	45
2.8.2.2 Equinos .....	46
2.9 Biomarcadores associados com a infecção por <i>Leishmania infantum</i> – Alterações hematológicas e bioquímicas.....	48
2.9.1 Alterações hematológicas .....	49
2.9.2 Alterações bioquímicas.....	50
2.10 Estresse Oxidativo .....	50
2.10.1 Dano em Lipídeos - Peroxidação Lipídica .....	51
2.10.2 Dano em Proteínas – Carbonilação .....	51
2.10.3 Estresse oxidativo e a infecção por <i>Leishmania</i> spp. ....	51

2.11 Diagnóstico.....	53
2.11.1 Marcadores Moleculares.....	54
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
3.1 Objetivo geral .....	57
3.2 Objetivos Específicos .....	57
<b>4 METODOLOGIA GERAL .....</b>	<b>58</b>
4.1 Aspectos Éticos .....	58
4.2 População de estudo .....	58
4.4 Análises Estatísticas .....	59
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>63</b>
<b>5 ARTIGO CIENTÍFICO 1.....</b>	<b>63</b>
<b>6 ARTIGO CIENTÍFICO 2.....</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>81</b>
<b>7 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>81</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>86</b>
<b>PERSPECTIVAS PARA O ESTUDO .....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO A – Protocolo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética em Uso Animal. ....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO B – Carta de Aceite do Artigo Científico 2, submetido e aprovado para publicação no Periódico <i>BMC Veterinary Research – Springer Nature</i>. ....</b>	<b>104</b>

## APRESENTAÇÃO

A presente Tese está dividida em três Capítulos. No **Capítulo I** encontram-se: **INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA, OBJETIVOS e METODOLOGIA GERAL**. O **Capítulo II** representa a íntegra deste estudo com as seções **INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS e DISCUSSÃO, CONCLUSÕES** e suas respectivas **REFERÊNCIAS** apresentadas sob a forma de dois artigos científicos publicados nos periódicos *Transboundary and Emerging Diseases* e *BMC Veterinary Research*. As seções, **DISCUSSÃO GERAL, CONSIDERAÇÕES FINAIS, PERSPECTIVAS PARA O ESTUDO, REFERÊNCIAS GERAIS e ANEXOS** encontram-se no **Capítulo III**, sendo apresentadas nas referências gerais somente as citações do **Capítulo I**.

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades de transmissão vetorial e integram o grupo de doenças infecciosas negligenciadas, uma vez que ocorrem em países pobres, subdesenvolvidos e atingem as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde (OPAS, 2019). São causadas por protozoários, parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, consideradas crônicas, graves, e potencialmente fatais para o homem quando não se institui o tratamento adequado (PAHO, 2017b).

A leishmaniose visceral (LV) representa um grave problema de saúde pública, devido a sua magnitude e complexidade clínica, biológica e epidemiológica. Por se tratar de uma doença negligenciada, requer um esforço coletivo e um compromisso compartilhado entre os governos, as organizações, as instituições e a sociedade para seu controle (PAHO, 2017a; b). Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção e doença e 12 milhões de pessoas infectadas, com incidência anual de 200.000 a 400.000 casos. É uma zoonose endêmica distribuída em mais de 98 países, nos trópicos, subtropicais e mediterrâneo. Nas Américas, a LV é endêmica em 12 países, no período entre 2001 a 2017 foram registrados 59.769 casos novos, resultando em uma média anual de 3.516 casos. Destes, 96% (57.582) foram reportados pelo Brasil, o qual está entre os 10 países com o maior número dos casos de leishmaniose cutânea (LC) e LV no *ranking* mundial (AKHOUNDI *et al.*, 2016; PAHO, 2017b).

As áreas de fronteiras estão recebendo atenção especial da Organização Pan-Americana de Saúde, principalmente, nos aspectos epidemiológicos das leishmanioses, uma vez que muitos países compartilham entre si os casos, ambientes, espécies de parasitos, vetores e reservatórios (PAHO, 2017a). No Brasil, se observa uma gradativa expansão da enfermidade, antes restrita as zonas rurais do nordeste, que foram se expandindo para outras regiões com rápida urbanização, devido à grande capacidade de adaptação do vetor a ambientes distintos (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; WERNECK, 2010).

Até 2008, não havia relatos de ocorrência no Rio Grande do Sul, no entanto, os primeiros casos autóctones da leishmaniose visceral canina (LVC) foram notificados neste ano, assim como o primeiro registro do vetor. Em humanos, o primeiro diagnóstico ocorreu em 2009, tornando o estado do Rio Grande do Sul uma área de transmissão desse agravo (DEBONI; BARBOSA; RAMOS, 2011). O município de Uruguaiana, na fronteira oeste, foi classificado como área de transmissão da LVC, com notificações de animais e humanos infectados e presença do vetor (DEBONI; BARBOSA; RAMOS, 2011). A enfermidade até então

era desconhecida na região, e não havia entendimento de quais fatores estariam relacionados com o início da transmissão entre cães no município. Entretanto, a ampla disseminação da infecção em todos os bairros da área urbana, impossibilitou a identificação de quais fatores de risco foram predisponentes à instalação e permanência do vetor (ESCOBAR *et al.*, 2018).

O cão é o principal reservatório e hospedeiro doméstico no ciclo de transmissão, seu papel é considerado fundamental para a expansão da doença em áreas endêmicas (OTRANTO *et al.*, 2017). A incidência em humanos está relacionada com a presença do cão, que pode promover a manutenção da infecção interespecífica devido à proximidade entre as duas espécies, aumentando o risco de infecção para o homem (ASHFORD, 1996). Além dos seres humanos e cães, já foi identificada infecção por protozoários do gênero *Leishmania* em diversos mamíferos, incluindo primatas, marsupiais, edentados, roedores e equinos (DE ARAÚJO *et al.*, 2013; MALTA *et al.*, 2010; PAPADOGIANNAKIS *et al.*, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2013).

Na Europa, existem descrições de equinos infectados por *L. infantum* na Grécia, em Portugal, Espanha e Alemanha (KOUAM *et al.*, 2010; ROLÃO *et al.*, 2005; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2003; KOEHLER *et al.*, 2002). No Brasil, foram detectados anticorpos anti-*Leishmania* (FEITOSA *et al.*, 2012) e presença de parasitos por meio de técnicas sorológicas e moleculares, com possível infecção mista causada por *L. infantum* e *L. braziliensis* em equinos provenientes de regiões endêmicas de Minas Gerais (SOARES *et al.*, 2013). Na região sul do Brasil, no estado do Paraná houve relatos de infecção por *L. braziliensis* em equinos (TRUPPEL *et al.*, 2014). As evidências de que equinos de áreas endêmicas para LVC e leishmaniose visceral humana (LVH), são capazes de se infectar com *Leishmania* sp., reforçam a importância da investigação da espécie, que atua como fonte de alimentação para os vetores ou participante do ciclo epidemiológico (MUKHTAR *et al.*, 2000; ROLÃO *et al.*, 2005).

Deste modo, considerando a predisposição de infecção da espécie equina por protozoários do gênero *Leishmania* sp. em regiões endêmicas, surgiram questionamentos sobre a ocorrência de infecção nessa espécie no Rio Grande do Sul, em uma região de fronteira com dois países (Argentina e Uruguai) em que há notificação de casos humanos e caninos. O presente estudo teve finalidade de realizar a identificação molecular das espécies de *Leishmania* em caninos e equinos, bem como avaliar sinais clínicos, alterações hematológicas, bioquímicas e de estresse oxidativo dos animais infectados no município de Uruguaiana fronteira oeste do Rio Grande do Sul.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Os Protozoários do gênero *Leishmania*

Nos primórdios do século XIX, os pesquisadores Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, identificaram, em estudos independentes, os parasitos causadores das leishmanioses. Ronald Ross nomeou o protozoário de *Leishmania*. Em 1904, Cathoire e Laveran encontraram o parasito em crianças com anemia esplênica. Nicole nomeou esta espécie como *Leishmania infantum*, devido ao diagnóstico da enfermidade em uma criança (WHO, 2010). No Brasil, Carini e Paranhos (1909a e 1909b) identificaram *Leishmania* em lesões mucosas de pacientes em 1909, em uma região no Mato Grosso onde estava sendo construída uma estrada de ferro. Nos anos seguintes, foram encontrados os parasitos em diferentes regiões do mundo (Ásia, Índia e Palestina) com distintas características clínicas e geográficas (WHO, 2010). Entretanto, recentemente foram encontradas descrições primitivas da doença em escritos antigos datando 2.500 a.C, e descobertas moleculares recentes de material arqueológico da mesma época (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Os parasitos *Leishmania* pertencem ao Reino Protozoa (Haeckel, 1866), Classe Kinetoplastida (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976), Subclasse Metakinoplastina (Vickerman, 2004), Ordem Trypanosomatida (Kent, 1880), Família Trypanosomatidae (Döflein, 1901), Subfamília Leishmaniinae (Maslov e Lukeš 2012) e Gênero *Leishmania* (Ross, 1903) (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

É um gênero de protozoários que possui, reconhecidamente, grande número de espécies descritas com elevada variabilidade comprovada nas análises filogenéticas (CUPOLILLO; BOITÉ; PORROZZI, 2014). Desde a primeira descrição do gênero *Leishmania*, o número de espécies tem variado, com muitas sendo descritas e algumas sendo consideradas sinonímias. Contudo, todas, são parasitos heteroxênicos, agentes etiológicos de uma ampla variedade de síndromes clínicas com formas viscerais, cutâneas (que podem evoluir para formas metastáticas) e infecção da mucosa orofaríngea em hospedeiros humanos (CUPOLILLO; BOITÉ; PORROZZI, 2014).

O gênero *Leishmania* compreende aproximadamente 53 espécies (desconsiderando os sinônimos), as quais são divididas em subgêneros e complexos: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, *Leishmania enriettii* e *Paraleishmania* (Figura 1). Destas, 31 espécies são conhecidas como parasitos de mamíferos (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Nas Américas, 15 dos 22 tipos patogênicos de *Leishmania* foram identificados em seres humanos (PAHO, 2017b).

Devido à diversidade genética desse gênero, as primeiras classificações eram baseadas em caracteres extrínsecos, e datam do período entre 1916 e 1961. Atualmente, uma nova



classificação foi proposta com base em dados moleculares combinados, que dividem as espécies em duas principais linhagens filogenéticas (Figura 1), chamadas de *Euleishmania* e *Paraleishmania* (AKHOUNDI *et al.*, 2016). A seção *Euleishmania* compreende quatro Subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Leishmania enriettii*. A seção *Paraleishmania* inclui *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis* e *L. colombiensis*, bem como o antigo Gênero *Endotrypanum*. Deste grupo, apenas *L. colombiensis* foi considerado patogênico para humanos (AKHOUNDI *et al.*, 2016; CUPOLILLO *et al.*, 2000).

O Subgênero *Leishmania* subdivide-se em complexos, as espécies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* e *L. arcchibaldi* estão reunidas no Complexo *L. donovani* (LUKEŠ *et al.*, 2007). Neste grupo estão incluídas as espécies que circulam nas Américas, África, Ásia e Europa, o que justifica as referências desse Subgênero como do Novo e do Velho mundo, conforme a região geográfica ao qual são observadas (CUPOLILLO; BOITÉ; PORROZZI, 2014). Existe uma notável similaridade genética entre as espécies *L. infantum* e *L. chagasi*. O status da espécie *L. chagasi* está sob discussão, pois se concluiu que no Novo Mundo, essa espécie é a mesma que *L. infantum*, sendo identificada por *L. infantum (L. chagasi)* indicando a possível migração da enfermidade de países europeus, onde o protozoário é *L. infantum*, para as Américas, que é usualmente referida como *L. chagasi* (KUHLS *et al.*, 2007; KUHLS *et al.*, 2011).

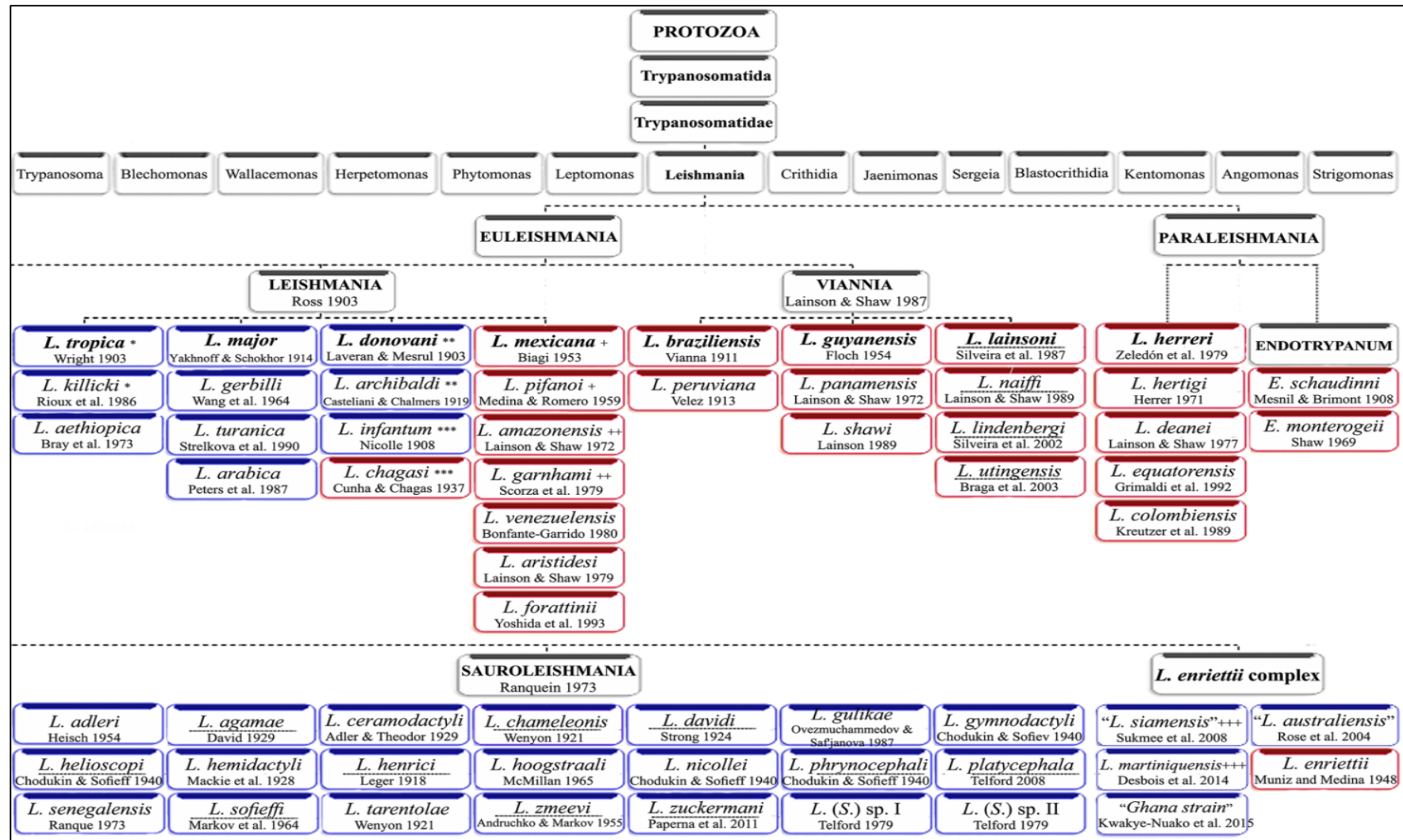
O Subgênero *Viannia* foi encontrado somente nas Américas e corresponde a maioria das espécies referidas ao Novo Mundo variando enormemente em seu grau de diversidade (CUPOLILLO; BOITÉ; PORROZZI, 2014).

O complexo de *L. enriettii* e os parasitos relacionados formam um grupo monofilético que muito provavelmente representa um novo Subgênero, *L. martiniquensis* foi descrito em 2014 como um agente causador de doenças humanas. Em 2015, introduziram-se espécies não identificadas de *Leishmania* em casos humanos em Gana (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

O Subgênero *Sauroleishmania* é uma exceção, seus hospedeiros vertebrados são os répteis, apesar disso, está intimamente relacionado com o Subgênero *Leishmania*, compartilhando um ancestral comum. Existem 19 espécies descritas e duas sem nomenclatura, restritas ao velho mundo, na Ásia e na África (COUGHLAN *et al.*, 2017).

O Gênero *Endotrypanum* pertencente ao grupo *Paraleishmania* e é conhecido como um parasito de preguiças que é transmitido por espécies de *Lutzomyia* nas Américas Central e do Sul. Esses parasitos são encontrados nos eritrócitos de preguiças *Choloepus* e *Bradypus*. Apenas duas espécies, *E. schaudinni* e *E. monterogeei*, foram descritas neste Gênero (FRANCO *et al.*, 2000).

Figura 1 - Classificação das espécies de *Leishmania*

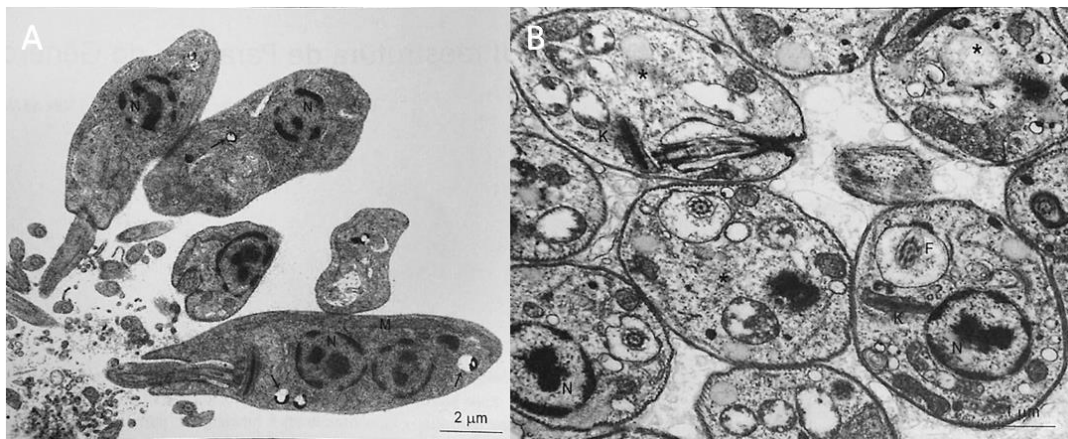


Fonte: Akhoundi *et al.* (2016) Adaptado.

## 2.2 Aspectos estruturais dos Parasitos do Gênero *Leishmania*

Os protozoários do Gênero *Leishmania* são parasitos hemoflagelados intracelulares com reprodução por divisão binária. Apresentam ciclo digenético com duas formas principais distintas: promastigota e amastigota (Figura 2).

Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão: Formas Promastigotas e Amastigotas de *Leishmania*.



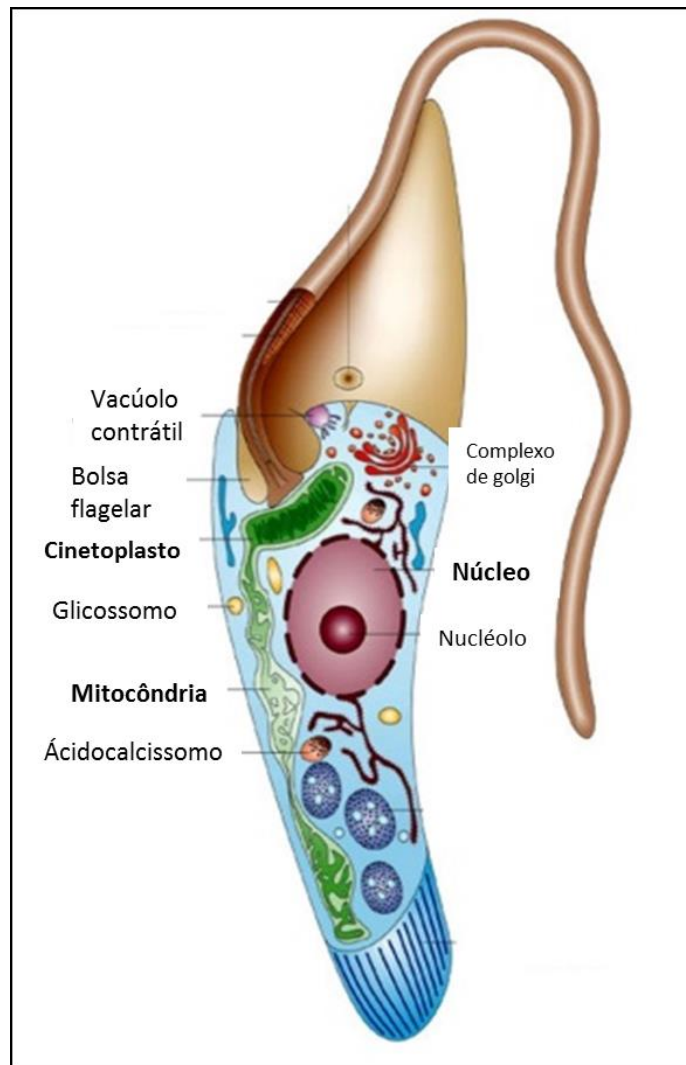
A - Promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* formando a tradicional roseta em cultura axênica. Uma delas apresenta dois núcleos (N), indicando início de divisão celular. B – Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* intracelulares com morfologia arredondada, flagelo (F) curto localizado na bolsa flagelar, núcleo (N) e cinetoplasto (K). Fonte: Silva *et al.* (2014)

A forma promastigota (Figura 2A) ocorre no tubo digestório do inseto vetor, mede entre 16 a 40 µm de comprimento e 1,5 a 3 µm de largura, possui flagelo que se origina no corpo basal do cinetoplasto e emerge na extremidade anterior celular, permitindo sua mobilidade no intestino do inseto. No hospedeiro invertebrado, o parasito apresenta duas fases de desenvolvimento. A fase promastigota procíclica, com morfologia celular alongada e flagelo habitualmente mais curto que o corpo celular e a fase promastigota metacíclica, com estrutura celular relativamente curta e arredondada e flagelo longo (duas a três vezes maiores que o corpo celular) e grande mobilidade. Esta última é a fase final do desenvolvimento do protozoário no inseto vetor e a forma infectante que será inoculada no hospedeiro vertebrado (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005; SILVA *et al.*, 2014).

A forma amastigota (Figura 2B) é intracelular obrigatória das células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro mamífero, o tamanho varia de acordo com a espécie, medindo entre 1,5 a 3 µm x 3,6 a 5 µm de diâmetro. São ovoides ou esféricos, com flagelo curto e interiorizado na bolsa flagelar, possuem o núcleo arredondado que ocupa aproximadamente um terço do corpo do parasito. São providos de uma única mitocôndria,

com dupla membrana, distribuída pelo corpo celular que abriga o cinetoplasto na porção próxima à base do flagelo, em forma de bastonete (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SILVA *et al.*, 2014). O cinetoplasto é uma estrutura característica dos protozoários tripanossomatídeos, e possui o mais complexo DNA mitocondrial encontrado na natureza (AKHOUNDI *et al.*, 2017; LUKEŠ *et al.*, 2002).

Figura 3 - Organização celular dos protozoários tripanossomatídeos



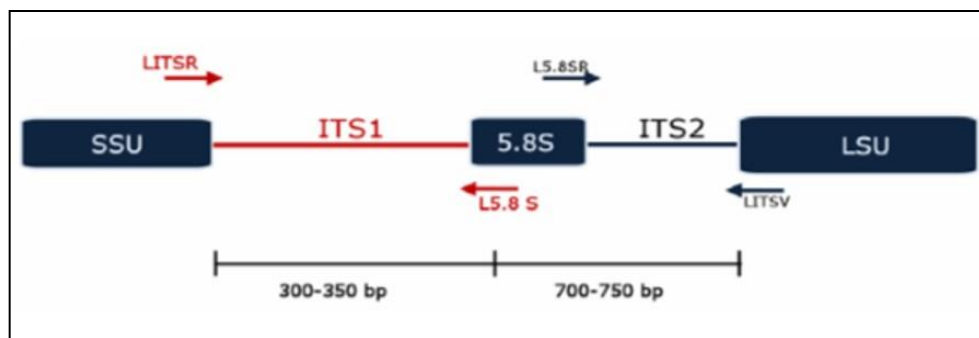
Fonte: Moreira (2010) Traduzido.

### 2.2.1 Genoma dos Parasitos do Gênero *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um genoma composto por dois DNAs distintos (Figura 3), o DNA ribossomal ou nuclear e o DNA mitocondrial do cinetoplasto (kDNA).

O DNA ribossomal está localizado no núcleo celular (Figura 2), apresenta as seguintes regiões conservadas: SSU (Subunidade menor) e LSU (Subunidade maior) e regiões variáveis: ITS (*Internal Transcribed Spacers*), os espaçadores transcritos internos, com alto nível de variação intra/interespecífica. São extremamente utilizadas como marcadores moleculares (Figura 4), com o emprego da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

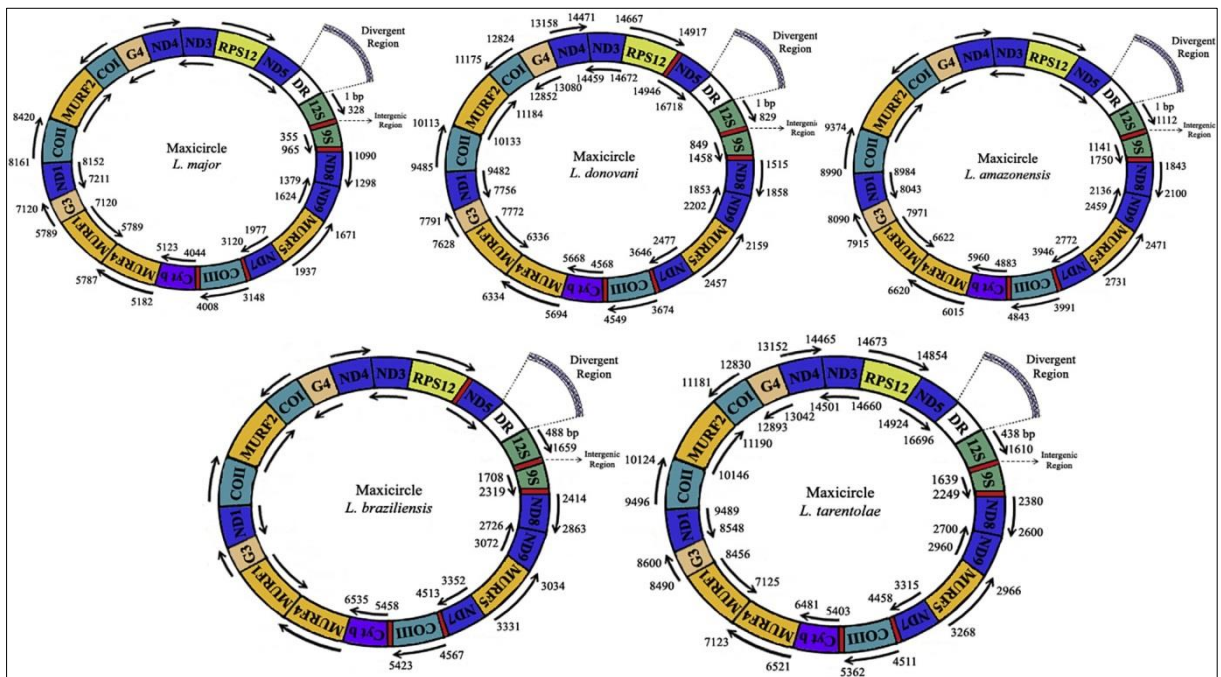
Figura 4 - Organização do *locus* do DNA ribossomal de *Leishmania* sp.



Subunidades conservadas: SSU (subunidade menor) e LSU (subunidade maior) / Subunidades variáveis: ITS1 e ITS2. Fonte: Lima (2010).

Todos os Kinetoplastidas flagelados possuem um único genoma mitocondrial conhecido como DNA de cinetoplasto (kDNA), que consiste em vários milhares de moléculas de DNA ligadas entre si em uma rede concatenada, a qual compõe o cinetoplasto, e corresponde entre 20% e 25% do DNA total. Os círculos de kDNA são de dois tipos: os maxi círculos e os mini círculos (LUKEŠ *et al.*, 2002). Os maxicírculos codificam genes homólogos aos presentes no DNA mitocondrial de outros eucariotos. Possuem entre 20 e 50 cópias por células e geralmente têm intervalo de tamanho entre 20-40 kb, dependendo da espécie. São considerados homogêneos nas sequências. Nos maxi círculos são codificadas subunidades do sistema da cadeia respiratória mitocondrial, uma subunidade ribossômica e duas subunidades pequenas de rRNAs (12S e 9S). Em contraste com a maioria dos DNAs mitocôndrias, o kDNA não codifica tRNAs (ALFONZO; THIEMANN; SIMPSON, 1997; LUKEŠ; HASHIMI; ZIROV, 2005). Os genes mais importantes dos maxi círculos são brevemente descritos na Figura 5.

Figura 5 - kDNA do maxi círculo e seus genes e fragmentos de cinco espécies de *Leishmania*: *L. major*, *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. tarentolae*.



Fonte: AKHOUNDI *et al.*, (2017).

Os minicírculos compõem aproximadamente 95% do kDNA e codificam pequenas moléculas de RNA, RNAs guia, que fornecem informações para edição de RNA de transcritos codificados por maxicírculos (STUART *et al.*, 2005). Os mini círculos contém aproximadamente 10.000 cópias por células, geralmente são quase idênticos em tamanho – 0,5 a 10 kb, dependendo da espécie, mas heterogêneos nas sequências (LUKEŠ *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2014). Em todos os tripanossomatídeos, aproximadamente 800 pb constituem o mini círculo (Figura 6), sendo possível identificar a presença de uma região variável de 600 pb a 680 pb e uma região conservada de 120 a 200 pb representadas na Figura 6 (CORTES, 2008; SIMPSON, 1987).

A região variável possibilita a distinção entre espécies e entre cepas (Figura 6). A região LT1 (fragmento com 145 pb) é específica do complexo *L. donovani* (ALMEIDA *et al.*, 2013a; BIGELI; OLIVEIRA JÚNIOR; TELES, 2012). Além disso, são utilizados iniciadores intitulados "marcadores anônimos", estes são utilizados para a detecção e identificação de *Leishmania*, mas ainda não são conhecidas as regiões genéticas (AKHOUNDI *et al.*, 2017).

Figura 6 - Organização do mini círculo do kDNA de *Leishmania* spp.

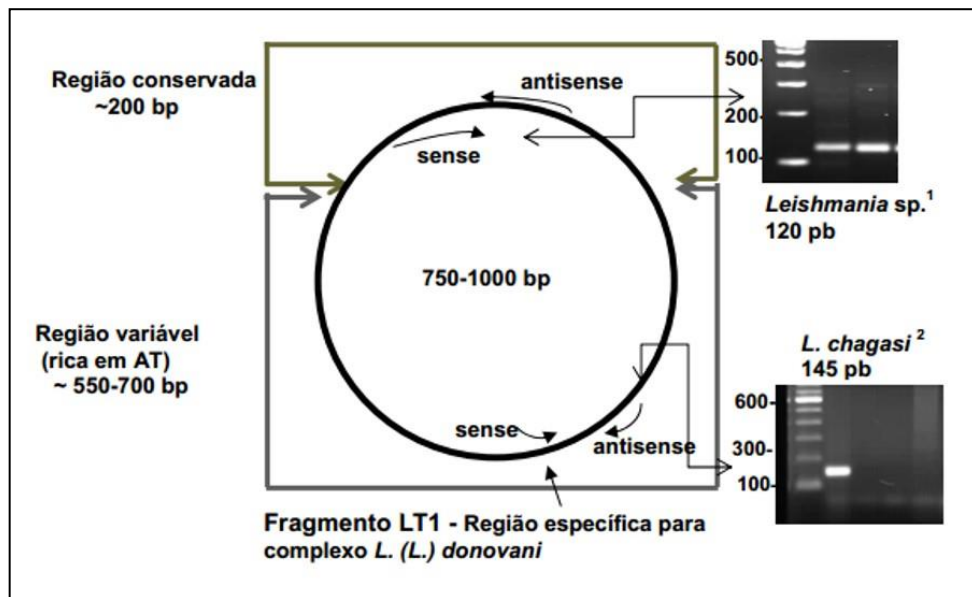
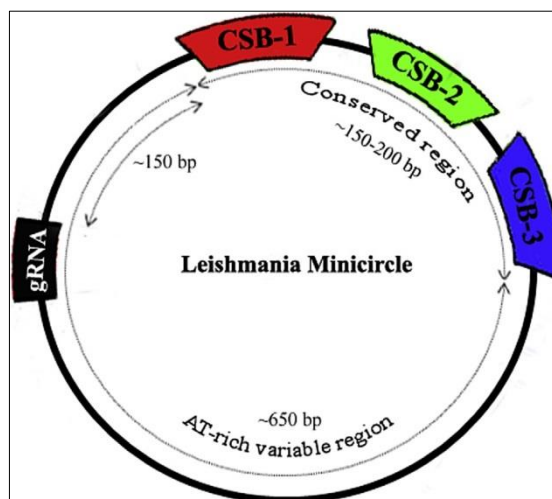


Diagrama esquemático da organização do minicírculo de *Leishmania* spp. e localização dos marcadores para *Leishmania* sp.<sup>1</sup> e *L. (L.) donovani*<sup>2</sup>. Fonte: Gomes (2008).

A região conservada do mini círculo do kDNA permite a diferenciação molecular ao nível de gênero e contém três sequências de blocos conservados (*conserved sequence blocks* – CSB): CSB-I, CSB-II e CSB-III (Figura 7), com comprimento variável em todo o gênero *Leishmania* (RAY, 1989).

Figura 7 - Mini círculos do kDNA de *Leishmania* e seus fragmentos das regiões conservadas – CBS (sequências de blocos conservados)



Fonte: AKHOUNDI *et al.*, (2017).

### 2.3 Ciclo Biológico

Todos os membros do gênero *Leishmania* são parasitos heteroxênicos, sendo os flebotomíneos os hospedeiros invertebrados e os mamíferos e répteis os hospedeiros vertebrados. Possuem ciclo digenético com duas formas distintas: promastigota nos hospedeiros invertebrados e amastigota nos hospedeiros vertebrados (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987).

No intestino dos vetores, durante o ciclo biológico do parasito ocorre um processo complexo envolvendo alterações comportamentais, morfológicas e bioquímicas, que diferem entre as espécies de *Leishmania* (CORTES, 2008). A Figura 8 representa esquematicamente os estágios do protozoário *Leishmania* sp. no tubo digestório dos insetos vetores. As formas amastigotas (1) inseridas no repasto sanguíneo necessitam sobreviver a ação das proteases digestivas secretadas logo após a ingestão sanguínea. Entre dois e três dias após o repasto sanguíneo, estas formas, já diferenciadas em promastigotas entram em contato com o tubo digestório depois da degradação da matriz peritrófica. Neste período geralmente são observadas as formas promastigotas procíclicas (2) e, posteriormente nectomonas (3). A partir do segundo dia de transformação surgem as formas haptomonas (4), que se tornam majoritárias no tubo digestório do quarto dia em diante. No terceiro dia, as formas paramastigotas (5) surgem e se mantem em baixa concentração. Entre o quinto e o sétimo dia após a infecção, os parasitos migram para as partes bucais do flebotomíneo. As formas promastigotas metacíclicas (6), consideradas infectivas, surgem no quarto dia após a infecção e se mantêm sempre em baixa concentração em relação as demais formas promastigotas. Porém, tais formas serão encontradas principalmente na região anterior do inseto, formando um *plug* composto de um gel secretado de promastigotas na válvula estomodeal. Este *plug* afeta a eficiência do repasto sanguíneo, forçando o inseto a regurgitá-lo, com as formas metacíclicas, na pele do hospedeiro vertebrado antes de se alimentar (TEMPONE; PITALUGA; TRAUB-CSEKÖ, 2014).



Figura 8 - Estágios do desenvolvimento de *Leishmania* sp. no tubo digestório do flebotomíneo



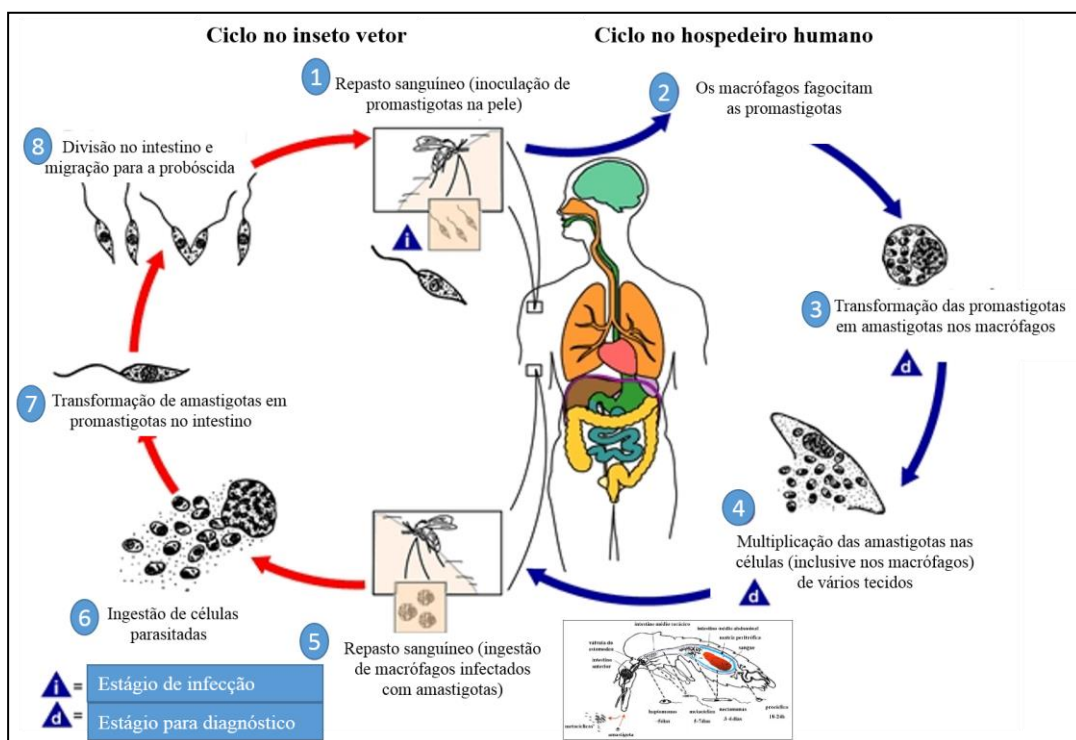
Fonte: TEMPONE; PITALUGA; TRAUB-CSEKÖ (2014)

A perpetuação do ciclo biológico e processo de transmissão do protozoário ocorrem por meio do repasto sanguíneo. Os insetos vetores são infectados ao ingerir formas amastigotas presentes nas células mononucleares fagocitárias parasitadas dos mamíferos (Figura 9). Após a ingestão das formas amastigotas de *Leishmania*, as mesmas são direcionadas ao intestino médio, onde ocorre a diferenciação em formas promastigotas no inseto vetor (Figura 8). Estas formas, com alta taxa de multiplicação no bolo alimentar, possuem moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície, que permitem a interação com lectinas intestinais e, conseqüente, adesão ao epitélio. A adesão é importante, pois garante o desenvolvimento completo do protozoário, impedindo que seja eliminado junto com o alimento, é uma etapa crucial na infecção dos flebotomíneos pelas *Leishmanias*. Possibilita a multiplicação e diferenciação das formas de *Leishmanias* e está relacionada à permissividade do vetor. Os parasitos incapazes de aderir ao epitélio intestinal do flebotomíneo serão eliminados na excreção do bolo alimentar. Após a fixação das formas promastigotas, o parasito sofre metaciclógênese diferenciando-se até atingir a forma promastigota metacíclica (Figura 8). Este processo perdura de 8 a 20 dias e é responsável pela geração das formas infectantes (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005; TEMPONE; PITALUGA; TRAUB-CSEKÖ, 2014). Nesta fase não há reprodução, os parasitos perdem a capacidade de

aderência ao epitélio digestório, e migram para o esôfago, faringe e probóscida, onde serão eliminadas durante o repasto sanguíneo, atingindo as células do hospedeiro.

No momento em que a fêmea flebotomínea realiza o repasto sanguíneo (Figura 9), necessário para a maturação dos ovos, ocorre a inoculação simultânea das formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro mamífero. As formas promastigotas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos, perdendo o flagelo livre e transformando-se em amastigotas. Estas formas se multiplicam por divisão binária, provocando o rompimento das células e infectando novos macrófagos (CORTES, 2008). As formas amastigotas se disseminam pelos sistemas linfático e vascular dos hospedeiros, além atingirem também a medula óssea, fígado e baço (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Figura 9 - Ciclo de vida do protozoário *Leishmania* sp.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2018) – Adaptada

## 2.5 Os Vetores da leishmaniose visceral

### 2.5.1. Distribuição vetorial

Insetos flebotomíneos são os principais vetores naturais das leishmanioses, estão agrupados na Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae (MAROLI *et al.*, 2013). Já foram descritas aproximadamente 800 espécies de flebotomos em diferentes regiões do mundo (60% localizadas em regiões tropicais),

entretanto, 98 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são vetores comprovados ou suspeitos de causar a transmissão das leishmanioses (MAROLI *et al.*, 2013; TEMPONE; PITALUGA; TRAUB-CSEKÖ, 2014).

No Velho Mundo, 42 espécies de vetores são comprovados ou prováveis na transmissão, dos quais, 20 estão envolvidas na transmissão de *L. infantum*, seis na transmissão *L. donovani*, sete na transmissão de *L. major*, sete na transmissão de *L. tropica* e três na transmissão de *L. aethiopica*. Cada espécie de *Phlebotomus* parece estar relacionada à transmissão de uma única espécie de *Leishmania*, exceto *P. sergenti*, a qual já foi identificada na transmissão de *L. tropica* e *L. aethiopica*. Entre os flebotomíneos registrados no Novo Mundo, 56 espécies, todas pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, são envolvidas na transmissão de 15 espécies de *Leishmania*: *L. infantum* (= *Leishmania chagasi*), *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. garnhami*, *L. pifanoi*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. venezuelensis* e *L. colombiensis*. Em contraste com os *Phlebotomus* spp. do Velho Mundo, algumas espécies de *Lutzomyia* são capazes de transmitir mais de uma espécie de *Leishmania*; por exemplo, *Lu. migonei* foi identificado como vetor de quatro diferentes espécies de parasitos (MAROLI *et al.*, 2013).

No Brasil, foram identificadas aproximadamente 229 espécies de flebotomíneos, 28% do total de espécies conhecidas, com ocorrência em todas as regiões do país. Entretanto, são considerados vetores de leishmaniose para humanos e animais no Brasil aproximadamente 30 espécies (MAROLI *et al.*, 2013). Destas, *Lu. intermedia*, *Lu. migonei* e *Lu. whitmani* foram encontradas em todas as regiões brasileiras e *Lu. longiplapis* foi descrita em todo o continente americano, do México à Argetina, e está presente em todo o território brasileiro, inclusive na região sul que até pouco tempo atrás não era encontrada (DEBONI; BARBOSA; RAMOS, 2011; TEMPONE; PITALUGA; TRAUB-CSEKÖ, 2014). Esta espécie reúne fortes evidências quanto a sua competência vetorial e está intimamente ligada ao processo de expansão da doença, devido a sua ampla distribuição geográfica nas Américas (LAINSON; RANGEL, 2005). Em 2003, havia registros de *Lu. longiplapis* em 21 estados e no Distrito Federal, exceto: Amazonas, Acre, Amapá, Santa Catarina e Sergipe. Recentemente, nos estados do Acre, Amapá e Sergipe houvera registros de *Lu. longiplapis*. Apenas nos estados do Amazonas e de Santa Catarina a espécie não foi identificada até o momento (BORGES *et al.*, 2017; BRASIL, 2014; GALARDO *et al.*, 2013; JERALDO *et al.*, 2012).

A primeira identificação da espécie *Lu. longiplapis* no Rio Grande do Sul foi no ano de 2008 em São Borja, sudoeste do estado, após o diagnóstico da infecção em um cão

(SOUZA; SANTOS; ANDRADE FILHO, 2009). Desde então, oito municípios já registraram sua presença, todos eles na fronteira oeste: Barra do Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja, Garruchos, Pirapó, Porto Xavier, Porto Lucena. Nos municípios de Uruguaiana, Itaqui e São Borja, ocorre transmissão urbana, devido ao ciclo de vida dos vetores na área urbana, tendo como reservatório os cães domésticos. Viamão, Porto Alegre e Santa Cruz do Sul não registraram a presença vetor *Lu. longipalpis*, entretanto, houve casos em canídeos e em humanos. Nestas regiões, a transmissão ocorre próximo ou em fragmentos de mata, sendo os vetores pertencentes a fauna silvestre de flebotomíneos (CEVS, 2017). Após levantamento entomológico, foram capturados 437 flebotomíneos de duas espécies: *Pintomyia fischeri* e *Migonemya migonei*, infectados por *L. infantum*, possivelmente novos vetores da leishmaniose na região de Porto Alegre (MAHMUD *et al.*, 2019).

Nos países fronteiriços com o Rio Grande do Sul - Brasil, a presença de *Lu. longipalpis* foi registrada pela primeira vez na Argentina em 1951 e após em 2000, ambos na Província de Misiones (SALOMÓN *et al.*, 2001), mais tarde foram relatados casos de LVC e houve captura do vetor em Clorinda, na fronteira com o Paraguai (SALOMÓN; ORELLANO, 2005). No ano de 2009, foram encontrados espécimes de *Lu longipalpis* na província de Corrientes, em diferentes localidades banhadas pelos Rios Paraná e Uruguai: Ituzaingó, Virasoro, Santo Tomé, Garruchos, Riachuelo y Corrientes y Monte Caseros (SALOMÓN *et al.*, 2009). Santo Tomé e Garruchos fazem fronteira com municípios rio-grandenses que tiveram aparição do vetor no mesmo período, e Monte Caseros, faz fronteira com o Departamento de Artigas – Bella Unión Cuareim – Uruguai, as três localidades separadas pelo Rio Uruguai. Salomón *et al.* (2011) capturaram exemplares de *Lu. longipalpis* em Salto e Bella Unión, Uruguai, um ano após a identificação do vetor na Argentina, fronteira com o Uruguai.

Perceber-se que a partir de 2008, quando surgiram os primeiros casos de LVC e LVH no Rio Grande do Sul, a presença do vetor e casos caninos e humanos aumentarem nas fronteiras com Uruguai e Argentina, embora os relatos na Argentina fossem mais antigos.

### 2.5.2. Características do vetor

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte (2 a 3 mm), frágeis, com o corpo densamente coberto por finas cerdas e coloração castanho claro (Figura 10) (TEMPONE; PITALUGA; TRAUB-CSEKÖ, 2014). Possuem atividade crepuscular ou noturna, durante o dia ficam em repouso em ambientes sombreados e úmidos (BRASIL, 2014). São insetos holometábolos, desenvolvendo-se a partir do ovo para quatro estágios larvares (L1 a L4), uma

fase pupal e uma fase adulta (TEMPONE; PITALUGA; TRAUB-CSEKÖ, 2014). Após a cópula, as fêmeas colocam seus ovos sobre um substrato úmido no solo, com alto teor de matéria orgânica e de baixa incidência luminosa, para garantir a alimentação das larvas. Ao se desenvolverem, as larvas aumentam o metabolismo e o tamanho. Quando atingem o estágio de pupa, fixam-se no substrato e não se alimentam, iniciando a metamorfose até o inseto adulto. O período de desenvolvimento do ovo até o estágio de inseto adulto varia de 30 a 40 dias, de acordo com a temperatura do ambiente (SANTOS; SILVA; SOUZA, 2011).

O tubo digestório dos flebotomíneos é especialmente importante tanto para a fisiologia do inseto quanto para o aspecto vetorial da transmissão da leishmaniose. A alimentação sanguínea nos flebotomíneos é necessária para o desenvolvimento dos ovos, por isso as fêmeas são hematófagas obrigatórias, com hábitos ecléticos, podendo realizar o repasto sanguíneo em várias espécies de animais vertebrados, inclusive em humanos, entretanto, em áreas urbanas, o cão parece ser a principal fonte de alimentação no ambiente doméstico. A longevidade das fêmeas é estimada em média de 20 dias. Na fase adulta, as espécies têm se mostrado, ao longo dos últimos 30 anos, altamente adaptadas às condições urbanas e periurbanas (BRASIL, 2014; HARHAY *et al.*, 2011; TEMPONE; PITALUGA; TRAUB-CSEKÖ, 2014).

Figura 10 – Repasto sanguíneo da fêmea adulta da espécie *Lutzomyia longipalpis*



Fonte: BRASIL (2014)

Apesar das evidências de que espécies de pulgas e carrapatos sejam infectados por *Leishmania*, ainda não está clara a atuação destas espécies como vetores. Segundo Coutinho *et al.* (2005), carrapatos de cães infectados apresentaram 15,4% de taxa de infecção, sendo a mesma, decorrente do repasto sanguíneo das fêmeas. Entretanto, Paz *et al.* (2010)

constataram, a presença de DNA do parasito em diversas culturas de *Rhipicephalus sanguineus* e apenas uma forma flagelada em esfregaço, indicando um baixo número de formas infectantes neste artrópode. Para os autores, a manutenção e multiplicação de *Leishmania* nos carrapatos parece pouco provável de acontecer, havendo a necessidade de desenvolvimento de outros experimentos para elucidação da interação entre as espécies.

Na tentativa de verificar a possível transmissão de leishmaniose através de pulgas de cães infectados a outros animais, foi realizada uma infecção experimental em 36 *hamsters* (via oral e peritoneal). Os testes moleculares apresentaram resultados positivos em 16 amostras. Entretanto, quando realizada a investigação do parasito em esfregaços, estes resultados foram negativos, os autores relataram a possibilidade de reações cruzadas com *Leptomonas* (COUTINHO; LINARDI, 2007).

### 2.5.3. Hábitos alimentares do vetor

Nos últimos anos, as pesquisas com insetos vetores têm ganhado um grande enfoque, muitas desenvolvidas na tentativa de ampliar os conhecimentos sobre a interação inseto vetor-parasita-hospedeiro. Afonso *et al.* (2012) enfatizaram que estudos relacionados aos hábitos alimentares dos vetores poderiam contribuir para um melhor entendimento da ecoepidemiologia da LV, discutindo sua estreita associação com *L. infantum* e os reservatórios.

*Lu. longipalpis* tem uma dieta variada, alimentando-se de uma diversidade de animais, além dos reservatórios conhecidos, incluindo pássaros, gambás, cavalos, gatos, ovelhas, roedores. A análise da preferência alimentar dos vetores em cidades do nordeste brasileiro apontou maior ocorrência de repasto sanguíneo em pássaros, cachorros e equinos (AFONSO *et al.*, 2012). A técnica de PCR revelou que 53,6% dos vetores capturados em quintais de residências localizadas em Teresina, Piauí haviam se alimentado de galinhas (SANT'ANNA *et al.*, 2008). Da Silva Sales *et al.* (2015) identificaram que a maioria das fêmeas de *Lu. Longipalpis* possuíam no bolo alimentar DNA de humanos, seguido de galinhas, cães, cavalos, ratos e gatos. Curiosamente, a maior parte das fêmeas capturadas foi próxima a uma cooperativa de frango, destas, 19,2% também apresentaram sangue de frango no bolo alimentar.

As ações de controle e prevenção da leishmaniose estão sempre voltadas para o principal reservatório doméstico conhecido, o cão. Entretanto, já foi relatado o ecletismo e a alta antropofilia do vetor, fato, que suscita novos questionamentos sobre a importância dos

cães na epidemiologia da LV, bem como, do possível papel do homem como fonte de infecção (DE OLIVEIRA et al., 2008). Seguramente, o estudo do comportamento do repasto sanguíneo de vetores da LV pode auxiliar na compreensão das interações hospedeiro-vetor e, possivelmente, contribuir para um melhor entendimento da dinâmica de transmissão das *Leishmanias* (DA SILVA SALES et al., 2015)

## 2.6 Reservatórios e Hospedeiros Mamíferos

Os reservatórios habituais estão relacionados às formas, ambientes silvestres e urbanos, em que a cadeia epidemiológica é conhecida. Primeiramente, a enfermidade foi notificada nas zonas rurais com reservatórios silvestres de espécies de carnívoros como *Lycalopex vetulus* (raposa-do-mato), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Speothos venaticus* (cachorro-do-mato-vinagre) e *Didelphis albiventris* (gambás) (COURTENAY et al., 1996; CURI; MIRANDA; TALAMONI, 2006; LOMBARDI et al., 2014). No Brasil, dentre os canídeos silvestres, a raposa (*Cerdocyon thous*) foi considerada reservatório natural da LV (SHERLOCK, 1996).

Os reservatórios em ambientes urbanos são os canídeos, sendo *Canis familiaris* considerado o principal reservatório e hospedeiro vertebrado doméstico do ciclo de transmissão da LV. Seu papel é considerado fundamental na expansão da doença em áreas endêmicas (OTRANTO et al., 2017). A incidência da doença em humanos está relacionada com a presença do cão, que pode promover a manutenção da infecção interespecífica devido à proximidade entre as duas espécies, aumentando o risco de infecção para o homem (ASHFORD, 1996; SILVA et al., 2012; SOARES, 2012). Os cães configuram a principal fonte de infecção para os flebótomos devido ao alto grau de parasitismo na pele e à grande susceptibilidade à infecção (HARHAY et al., 2011).

Os hospedeiros da LV participam ativamente da cadeia epidemiológica e garantem a manutenção do agente etiológico (SOARES et al., 2013). No Novo Mundo, mais de 40 espécies de mamíferos (de várias ordens) são conhecidas como hospedeiros de *Leishmania* sp. em diferentes ciclos de transmissão (SOARES, 2012). Algumas espécies inseridas no gênero *Leishmania*, dentre as quais aquelas de maior importância em saúde pública no continente americano: *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. São parasitos multi-hospedeiros, capazes de infectar uma ampla variedade de espécies (ROQUE; JANSEN, 2014a).

Roque Jansen (2014b) compilaram sete ordens de mamíferos que foram infectados por diferentes espécies de *Leishmania* sp. nas Américas: Didelphimorphia, Pilosa, Cingulata, Rodentia, Carnivora, Primata, Chiroptera. Primatas, incluindo *Callicebus nigrifrons*, *Cebus*

*xanthosternos*, *Leontopithecus crysomelas*, *Aotus nigriceps*, *Pithecia irrorata* e *Saguinus imperator*. Três Primatas (*Alouatta guariba*) conhecidos como bugio marrom, mantidos em cativeiro de vida livre procedentes de região endêmica, apresentaram infecção por *L. infantum*, (LOMBARDI *et al.*, 2014; MALTA *et al.*, 2010) assim como marsupiais (SANTIAGO *et al.*, 2007) da espécie *Didelphis spp.*, edentados *Tamandua tetradactyla* (DE ARAÚJO *et al.*, 2013) e roedores (PAPADOGIANNAKIS *et al.*, 2010).

Os felinos, principalmente o gato doméstico, podem ser acometidos por leishmaniose, sendo susceptíveis tanto a forma visceral quanto cutânea, também estão relacionados a infecção em ambientes urbanos (COSTA *et al.*, 2010). Na Espanha, Millán *et al.* (2011) encontraram *L. infantum* em gatos selvagens, e no Brasil já foram identificadas infecções em felinos domésticos pelo mesmo agente etiológico (PENNISI *et al.*, 2015).

Vários estudos identificaram a infecção por *L. infantum* em animais de produção e de companhia, inclusive aqueles que estão em criação no campo, como bovinos, ovinos, suínos e caprinos (GAO *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2018; PAIXÃO-MARQUES *et al.*, 2019; ROHOUSOVA *et al.*, 2015)

A infecção por *Leishmania sp.* em equinos foi relatada em diferentes países. O primeiro caso conhecido foi em um animal na Argentina em 1927 (MAZZA, 1927). A partir deste, foram diagnosticados outros casos em diversos países, com uma variedade de espécies responsáveis pela infecção, entre elas: *L. siamensis* nos Estados Unidos (REUSS *et al.*, 2012). *L. infantum* na Alemanha, Espanha, Portugal e Brasil (FERNÁNDEZ-BELLON *et al.*, 2006; KOEHLER *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2013), *L. (Viannia) braziliensis* e *L. chagasi* no Brasil (FEITOSA *et al.*, 2012; VEDOVELLO FILHO *et al.*, 2008).

No continente europeu, as descrições de cavalos infectados por *L. infantum* apontam esta espécie como o agente etiológico da LV. Equinos que vivem em áreas endêmicas estão mais expostos a contrair a enfermidade (MUKHTAR *et al.*, 2000; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2003). Foram relatados casos em Portugal, Espanha e Alemanha (FERNÁNDEZ-BELLON *et al.*, 2006; KOEHLER *et al.*, 2002; ROLÃO *et al.*, 2005; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2003). No Brasil, foram detectados anticorpos anti-*Leishmania sp.* em equinos na cidade de Araçatuba (SP), região endêmica para LVC e LVH (FEITOSA *et al.*, 2012). Também houve relato da presença de *L. infantum* nesta espécie no estado de Minas Gerais, cujo diagnóstico realizado em três animais detectou presença de parasitos em lesões e aspirado de medula óssea, sendo a identificação realizada por meio de técnicas sorológicas e moleculares. O resultado do PCR sugeriu uma infecção mista causada por *L. infantum* e *L. braziliensis* (SOARES *et al.*, 2013).



Cerqueira *et al.* (2003) sugeriram a participação dos equinos na cadeia epidemiológica da leishmaniose, por serem comumente utilizados como meio de transporte ou de carga, movimentando-se constantemente por diversas locais das regiões endêmicas. A espécie constitui adequada fonte sanguínea para a alimentação dos flebótomos, o que pode estimular a proliferação dos vetores, aumentando a reprodução, a densidade e elevando o risco de transmissão do agente etiológico.

## 2.7 Epidemiologia

As doenças transmitidas por vetores são limitadas por variáveis ambientais como temperatura, umidade, uso do solo e vegetação. O ciclo de vida dos vetores, assim como dos reservatórios e hospedeiros que participam da cadeia de transmissão de doenças, está fortemente relacionado à dinâmica ambiental dos ecossistemas onde vivem. Porém, além dos fatores ambientais, existem outros que influenciam nesta dinâmica, como os fatores sócio-demográficos, biológicos e médico-sociais (BARCELLOS *et al.*, 2009).

A cadeia epidemiológica da leishmaniose é tema de diversos estudos em diferentes regiões do mundo. A alta capacidade de adaptação aos mais variados ambientes, aliada à grande diversidade de espécies de vetores e de protozoários que podem causar a enfermidade, bem como a diversidade de espécies de mamíferos que podem ser acometidos tornaram essa afecção um problema de saúde pública global, mostrando um aumento crescente nos casos na última década (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

As leishmanioses são doenças de transmissão vetorial e integram o grupo de doenças infecciosas negligenciadas, uma vez que ocorrem nos países mais pobres e atingem as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde. Em relação à LV, apresenta uma ampla distribuição global, mais de 90% dos casos ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (ALVAR *et al.*, 2012; OPAS, 2019; WHO, 2010). Estima-se que mais de 98 países já identificaram casos positivos, representando a gravidade e os impactos na saúde pública, pois anualmente são em média 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção e doença pelo parasito. Nas Américas, a LV é endêmica em 12 países, no período entre 2001 a 2017 foram registrados 59.769 casos novos, resultando em uma média anual de 3.516 casos. Destes, 96% (57.582) foram reportados pelo Brasil, o qual está entre os 10 países com o maior número dos casos de ambas as formas de leishmanioses, LC e LV, no *ranking* mundial (AKHOUNDI *et al.*, 2016; PAHO, 2017b).

O Brasil representa um dos maiores focos da doença no mundo. Entre os anos de 1980 e 2005, foram notificados pelo Ministério da Saúde 59.129 casos de LVH no nordeste brasileiro que gradativamente foram expandindo-se para outras regiões (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008). Até o final da década de 80, estava restrita às zonas rurais do nordeste do país e o ciclo de transmissão ocorria entre vetores e animais silvestres. Na década de 1990, a região nordeste concentrava 89% dos casos positivos de leishmaniose. A partir de então, verificou-se a ocorrência de uma nítida expansão geográfica para os estados mais ao sul do país e franco processo de urbanização do vetor em regiões distintas.

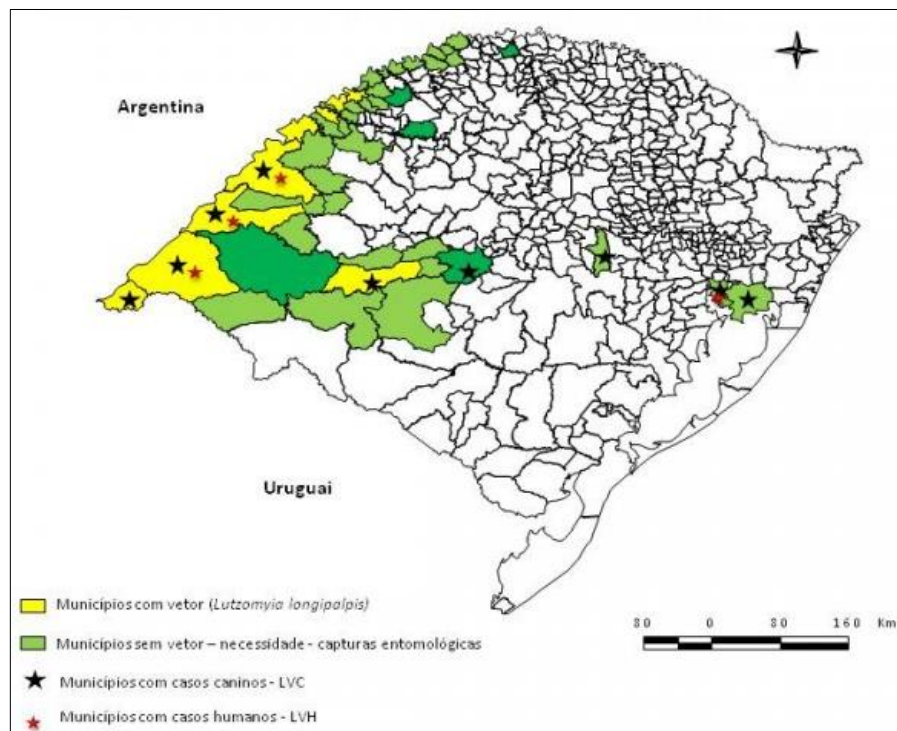
O Estado do Rio Grande do Sul era considerado área indene para LV até 2008. No entanto, em outubro de 2008, foi diagnosticado um cão residente no município de São Borja. Nos meses seguintes, foram efetuadas capturas de vetores na cidade para corroborar a autoctonia do caso canino, com a comprovação da presença do vetor *Lu. longipalpis*. Em janeiro de 2009, foi confirmado o primeiro caso humano autóctone no município (SES, 2014). No mesmo ano, a doença passou a ocorrer em todas as regiões do país, sendo que a principal condição de transmissibilidade nesses novos ambientes estava relacionada à adaptação do vetor *Lu. longipalpis* ao peridomicílio (CEVS, 2010).

A Nota Técnica do Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul identificou até abril de 2010 sete municípios com a presença do vetor (*Lu. longipalpis*), todos localizados na fronteira com a Argentina: Barra do Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja, Garruchos, Pirapó e Porto Xavier. Entretanto, atualmente segundo dados de 2019, foram encontrados vetores da LV em mais dois municípios no estado do Rio Grande do Sul: Cacequi e Santa Maria (Figura 11). Também foram registrados 11 municípios com a presença de LVC, sendo que cinco dessas cidades fazem fronteira com o território argentino (Barra do Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja e Porto Xavier), mais recentemente em Cacequi. As cidades de São Borja e Uruguaiana foram incluídas como municípios pertencentes à área de transmissão, onde foram encontrados vetores e houve casos positivos humanos e caninos autóctones, com caracterização do parasito (CEVS, 2010; DEBONI; BARBOSA; RAMOS, 2011; TARTAROTTI *et al.*, 2011). Dos casos autóctones de LVH o Rio Grande do Sul conta com 31 casos, distribuídos nos municípios de São Borja, Uruguaiana, Itaqui, Porto Alegre e Viamão, destes, 26 casos evoluíram para cura e cinco para óbito.

Embora, ambas as formas da leishmaniose humana, LC e LV, estejam incluídas na lista nacional de doenças e agravos de notificação compulsória (BRASIL, 2017), os dados encontrados ainda podem estar subnotificados. O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) contém vários dados necessários para o cálculo dos principais

indicadores epidemiológicos e operacionais utilizados para a avaliação local, municipal, estadual e nacional (BRASIL, 2017). No entanto, para que essas informações sejam efetivamente úteis ao monitoramento das ações e permitam planejar e adotar as medidas de prevenção e controle das leishmanioses de maneira oportuna é imprescindível que os dados sejam fidedignos e completos, e que os profissionais de saúde, tanto da rede pública quanto da rede privada, estejam comprometidos em notificar os casos assim que diagnosticados.

Figura 11 - Situação epidemiológica da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul - Agosto de 2019



Fonte: CEVS, 2019.

A urbanização da LV no Brasil é multifatorial, estando associada a fatores ambientais, biológicos do vetor e demográficos. Como principal fator ambiental, pode-se inferir o desmatamento desordenado das zonas rurais que resultou na invasão do ambiente peridomiciliar pelos vetores. Estes ambientes, com a presença dos vetores e grande população do cão doméstico susceptível à infecção por *L. infantum*, contribuíram para a disseminação e manutenção do ciclo peridomiciliar da endemia (ROSAS FILHO; SILVEIRA, 2007).

Algumas características biológicas do vetor também propiciam disseminação da doença, especialmente a alta capacidade de adaptação a variadas condições de temperaturas, assim como sua permanência e reprodução em diversos ambientes, fatores estes que justificam a expansão geográfica da leishmaniose em todo território brasileiro, desde climas mais quentes como nas regiões do nordeste até climas amenos no sul do país. Em regiões

urbanas, o vetor é encontrado principalmente nas zonas de periferia, entretanto em alguns municípios, a enfermidade apresenta uma distribuição mais ampla, além das zonas periféricas. Os vetores são bem adaptados aos peridomicílios, intradomicílios, galinheiros, chiqueiros, canis e paióis (ALVES; BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2014).

Outra característica peculiar é o ecleticismo dos hábitos alimentares das fêmeas durante o repasto sanguíneo, o que explica a grande quantidade de animais vertebrados mamíferos que podem ser infectados pelo protozoário, e desta forma, tornando mais complexo o entendimento da cadeia epidemiológica (BRASIL, 2014; SOARES, 2012).

Frente a essas condições epidemiológicas, o Ministério da Saúde implementou, em 2006, o *Programa de Controle da Leishmaniose Visceral* e instituiu algumas metas para a eliminação da doença, incluindo o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, identificação e eutanásia dos cães soropositivos, controle do inseto vetor e educação em saúde. Embora exista o programa, suas ações apresentam pouco impacto sobre a situação epidemiológica da leishmaniose no país. Os dados apontam uma grande expansão do vetor e dos casos diagnosticados dentro do território brasileiro, com significativo aumento anual.

Por ser uma enfermidade relativamente nova no estado, com casos diagnosticados a partir da década de 2000, o sistema de controle e prevenção está em estruturação. Entretanto, tem se observado um grande aumento de cães infectados, principalmente em áreas urbanas. Como a urbanização da doença é um fenômeno recente, são escassas as informações sobre a epidemiologia e as relações entre os componentes da cadeia de transmissão nesse novo cenário no estado do Rio Grande do Sul.

## 2.8 Formas Clínicas da leishmaniose visceral

### 2.8.1. Formas clínicas da leishmaniose visceral em humanos

A leishmaniose apresenta variadas manifestações clínicas intimamente relacionadas às espécies de vetor e parasito envolvidos na infecção. Adicionalmente, os sinais clínicos variam conforme a resposta imunológica desencadeada pelo organismo do hospedeiro (CHAPPUIS *et al.*, 2007; DESJEUX, 2004). A infecção em humanos é subdividida em três quadros clínicos distintos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar Post-kala-azar (PKDL), embora o indivíduo possa permanecer assintomático por meses ou até anos.

A apresentação clínica mais comum é a LC, a qual está concentrada em nove países com 70 a 75% de incidência mundial: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru. É classificada em três formas clínicas básicas:

leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). A LCL tem como principal manifestação uma lesão ulcerada que se desenvolve no local de inoculação do parasito. Em algumas situações, a infecção pode se desenvolver de forma atípica, produzindo formas disseminadas ou difusas. Nessa apresentação clínica, os parasitos são facilmente detectados, entretanto a resposta ao tratamento é dificultada, levando à cronicidade da infecção e ao acometimento progressivo (AKHOUNDI *et al.*, 2016; CHAPPUIS *et al.*, 2007; WHO, 2010).

A LV está prioritariamente concentrada em seis países: Índia, Sudão do Sul, Sudão, Brasil, Etiópia e Somália. É a forma de acometimento que se localiza principalmente em órgãos e vísceras do sistema linfohematopoiético, fígado, baço, gânglios e medula óssea. Tem apresentação clínica e sintomatologia variável, é a forma mais grave e pode ser fatal quando não tratada. Os principais sintomas são anemia, febre, hepatoesplenomegalia, manifestações hemorrágicas, linfadenomegalia, perda de peso, taquicardia, diarreia, tosse seca e desnutrição. A PKDL manifesta-se em indivíduos portadores de LV, após tratamento. É associada tipicamente a infecção por *L. donovani*, porém nas Américas, foi reportada, excepcionalmente em associação à infecção pelo vírus HIV. (AKHOUNDI *et al.*, 2016; BRASIL, 2014; CHAPPUIS *et al.*, 2007; WHO, 2010).

A classificação adotada para as formas clínicas da leishmaniose em humanos não se aplica para infecção em outros mamíferos (ROQUE; JANSEN, 2014a).

## 2.8.2. Formas clínicas da leishmaniose visceral em animais domésticos

### 2.8.2.1 Cães

O quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final (BRASIL, 2014). Os animais sintomáticos, praticamente todos desenvolvem doença visceral ou sistêmica, sendo que 90% também apresentam algum envolvimento cutâneo. A evolução da doença é lenta e o início insidioso, as manifestações clínicas estão intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressada pelo animal infectado (BRASIL, 2014).

Os sinais viscerais mais comuns são: linfadenopatia, emaciação, sinais de insuficiência renal (poliúria, polidipsia, vômito), neuralgia, poliartrite, polimiosite; sendo que aproximadamente um terço dos pacientes apresenta febre e esplenomegalia. Dentre os sinais cutâneos pode-se citar hiperqueratose, descamação e eczema particularmente no espelho nasal e orelhas, pequenas úlceras localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações, pelagem seca e quebradiça, perda de pelos. Nas fases mais avançadas

pode-se observar onicogribose, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, apatia, edema de patas (Figura 12). Na fase final da infecção, ocorrem em geral a paresia das patas posteriores, a caquexia, a inanição e morte.

Figura 12 – Sinais clínicos clássicos da leishmaniose visceral canina



A – Cão com onicogribose. B – Cão com apatia, alopecia e lesões cutâneas. C – Cão com emagrecimento e apatia. D – Cão com emagrecimento, ceratoconjuntivite lesões de orelha. Fonte: Brasil (2014)

A pele dos cães é a região do corpo que mais manifesta sinais clínicos, local que ocorre a primeira interação entre o parasito e o sistema imune. Também é o tecido onde se encontra grande quantidade de formas amastigotas do parasito (CIARAMELLA *et al.*, 1997). Segundo Solano-Gallego *et al.* (2004), as lesões de pele, alopecia e dermatites são comuns na LVC, no entanto, a maioria dos cães infectados não apresenta sinal clínico, e mesmo na pele clinicamente sadia pode haver presença de parasitos. Sobretudo, a identificação dos animais assintomáticos é um desafio enfrentado no diagnóstico canino. Devido a este fato, Solano-Gallego *et al.* (2004) alertaram para a relevância desses animais no ciclo de transmissão da doença. Nas regiões Sul Americana e Mediterrânea a maior parte dos cães infectados (soropositivos) é assintomática, e mesmo assim, reservatórios do protozoário (OTRANTO *et al.*, 2009).

#### 2.8.2.2 Equinos

A infecção por protozoários do gênero *Leishmania* em equinos normalmente não apresenta indícios de acometimento sistêmico, sendo mais encontradas as alterações cutâneas, sem padrão característico (KOEHLER *et al.*, 2002; MÜLLER *et al.*, 2009). As manifestações

clínicas variam entre pápulas ou nódulos na pele com apresentação solitária ou múltipla (Figura 13), que podem ser ulceradas, e são mais comumente presentes na cabeça, ouvidos, pescoço, escroto e membros. Também é possível encontrar lesões cutâneas, do tórax, das axilas e dos flancos (MÜLLER *et al.*, 2009).

Figura 13 - Equino com sinal clínico da infecção por *Leishmania infantum* - nódulo solitário na região dos olhos.



Fonte: SOLANO-GALLEGO *et al.* (2003)

Sinais clínicos da infecção por *L. infantum* em equinos podem ser temporários. Um relato de equino, com confirmação da infecção após detecção da presença de formas amastigotas e material genético de *L. infantum*, apresentou nódulo dérmico na região dos olhos, que após remoção evoluiu para ulceração na pele com múltiplas lesões. Foi observada cicatrização completa em seis meses, com cura espontânea (KOEHLER *et al.*, 2002; ROLÃO *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2013).

No Brasil, recentemente, foram diagnosticados os primeiros casos de leishmaniose em equinos pela infecção por *L. infantum*. No entanto, já existiam relatos de equinos com lesões cutâneas, causadas pela espécie *L. braziliensis*. Os sinais clínicos aparentes incluíram lesão ulcerada grande, granulomatosa e exsudativa com um grau moderado de prurido, somado à baixa condição corporal (Figura 14). Outro animal apresentou lesões ulcerativas na região vulvar e problemas locomotores (FEITOSA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013; VEDOVELLO FILHO *et al.*, 2008).

Figura 14 - Equino com sinais clínicos de leishmaniose.



A- Animal com baixa condição corporal. B – lesão ulcerada granulomatosa. Fonte: SOARES *et al.* (2013)

Por outro lado, animais saudáveis, frequentemente expostos à infecção pelo protozoário em áreas endêmicas e na presença de cães com LVC, também podem estar infectados, apresentando resposta imunológica para *L. infantum*, mesmo sem manifestações clínicas aparentes (CERQUEIRA *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ-BELLON *et al.*, 2006; MÜLLER *et al.*, 2015).

Os resultados apresentados pelos diferentes autores na Europa, assim como no Brasil, mostram que a enfermidade em equinos, assim como em outras espécies, pode causar uma série de manifestações clínicas, ou até mesmo, manter o hospedeiro assintomático. A prevalência de infecção subclínica equina por *L. infantum*, em áreas endêmicas, é consideravelmente maior que a doença, como observado em outros animais como gatos e cães, (CARDOSO *et al.*, 2010; FERNÁNDEZ-BELLON *et al.*, 2006), impactando diretamente no diagnóstico, que muitas vezes pode ser inconclusivo, tardio ou inexistente. Dessa forma, há o aumento no risco de infecção na população humana e animal nas regiões endêmicas, propiciando a expansão destes protozoários através de vetores infectados a regiões indenes.

## 2.9 Biomarcadores associados com a infecção por *Leishmania infantum* – Alterações hematológicas e bioquímicas

O resultado da infecção por *L. infantum* é uma consequência de interações complexas entre o protozoário e o contexto imunológico e genético do hospedeiro. As manifestações clínicas podem variar de infecção subclínica a doença grave (MAIA; CAMPINO, 2018). A identificação de biomarcadores da infecção por *Leishmania sp.*, da doença e de determinação de um tratamento adequado representa uma ferramenta importante para auxiliar no diagnóstico, monitoramento e no prognóstico de cães infectados e doentes subclínicos (MAIA;



CAMPINO, 2018). Essas informações também podem ser extrapoladas para demais espécies hospedeiras, já que o padrão de alterações clínicas pode ser semelhante nas variadas espécies animais.

Em cães infectados assintomáticos ou sintomáticos com sinais clínicos leves, nos quais a presença de *Leishmania* foi confirmada por métodos diretos e que possuem anticorpos anti-*Leishmania* negativos ou de baixo título, os parâmetros hematológicos e bioquímicos geralmente não são alterados (PALTRINIERI *et al.*, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

### 2.9.1 Alterações hematológicas

As células do sangue diferem umas das outras nas funções biológicas e nas características metabólicas. Os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos B, linfócitos T e monócitos) constituem a primeira linha de defesa do sistema imune. Maia Campino (2018) relata que anormalidades laboratoriais são comuns em cães com LVC, a relação existente entre altas infestações parasitárias e alterações hematológicas é amplamente estudada. As alterações patológicas presentes na medula óssea de cães com LVC podem atingir a linhagem eritrocitária, leucocitária e trombocitária levando o surgimento de distúrbios hemostáticos que podem ocorrer devido a disfunção plaquetária (CIARAMELLA *et al.*, 1997).

Cães sintomáticos apresentam como anormalidade hematológica mais comum, anemia não regenerativa normocítica e normocrômica leve a moderada, típica de uma doença inflamatória crônica (PALTRINIERI *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2006). A anemia pode ser de causa multifatorial, como sequestro esplênico e destruição de eritrócitos, bloqueio de produção na medula, hemorragia, hemólise, mecanismos imunes, infecções concomitantes e carência nutricional. Outras alterações menos comuns são observadas nas populações de leucócitos como: monocitose, linfopenia, eosinopenia ou leucopenia. O estresse oxidativo está envolvido na patogênese da anemia, observada em cães, as espécies reativas de oxigênio (EROs) lesionam membranas celulares eritrocitárias causando peroxidação lipídica (LPO) e predispondo as células à apoptose (CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; PALTRINIERI *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2006).

### 2.9.2 Alterações bioquímicas

As alterações bioquímicas podem estar presentes durante o curso da enfermidade, e incluem elevação dos níveis das aminotransferases (duas a três vezes os valores normais), das bilirrubinas e aumento discreto dos níveis de ureia e creatinina (BRASIL, 2014). Em cães, alterações proteicas como hiperglobulinemia, hiperproteinemia, hipoalbuminemia e razão reduzida de albumina / globulina (A / G) têm sido associadas à progressão da doença, bem como elevação dos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais (CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). As alterações na atividade funcional dos rins, representado pelo aumento das concentrações séricas de ureia e creatinina é um achado relativamente comum em cães portadores de LVC.

### 2.10 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição biológica caracterizada pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e sua eliminação/neutralização (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Em condições fisiológicas, os radicais livres desempenham papel fundamental na resposta imune e atuam como fatores de transcrição na sinalização celular, induzindo à apoptose. No entanto, a produção aumentada de espécies reativas, pode ocasionar dano a biomoléculas, como lipídeos de membranas, proteínas e material genético. Portanto, o equilíbrio oxidativo é determinante para o gatilho apoptótico em células T, assim como, está envolvido nos processos concernentes à sua ativação, diferenciação, proliferação e função celular (CHEN *et al.*, 2006).

A formação de espécies reativas ocorre durante o metabolismo celular, em decorrência de atividade enzimática, por diversos fatores como exposição a agentes externos: tabaco, radiações, luz ultravioleta, produtos químicos e fármacos. Além disso, o estresse oxidativo tem sido atribuído a várias doenças inclusive as parasitárias. Pode-se medir o estresse oxidativo por meio de diversos marcadores: como a glutatona reduzida e glutatona oxidada (GSH/GSSH), o óxido nítrico (NO) e os produtos da LPO, como o malondialdeído (MDA).

A capacidade do corpo de neutralizar o estresse oxidativo depende do status e das atividades de moléculas antioxidantes, incluindo a integridade de várias enzimas que requerem suprimento adequado de minerais como zinco, cobre, cobalto, selênio e manganês (EVANS; HALLIWELL, 2001).

### 2.10.1 Dano em Lipídeos - Peroxidação Lipídica

Todas as membranas celulares são especialmente vulneráveis à oxidação devido à sua alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados. Os danos ocasionados em lipídeos são frequentemente estudados, a LPO é uma consequência biológica importante em termos de dano oxidativo celular (MELLO FILHO; HOFFMANN; MENEGHINI, 1984). As principais espécies reativas de oxigênio resultantes da LPO são: o radical alcoxila ( $LO\bullet$ ), radical peroxila ( $LOO\bullet$ ) e o hidroperóxido ( $LOOH$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Observa-se um efeito citotóxico das espécies reativas formadas a partir da LPO sobre os fosfolipídios constitutivos das membranas, devido a alteração da permeabilidade modificando a fluidez e rigidez e até mesmo causando sua ruptura (CEMEK *et al.*, 2010). Além de outras ações deletérias como: mutação do DNA, oxidação dos lipídios insaturados, formação de resíduos químicos como o MDA e o comprometimento dos componentes da matriz extracelular, proteoglicanos, colágeno e elastina. A avaliação, pelo método químico, dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente o MDA, é útil na investigação da peroxidação lipídica (LIMA; ABDALLA, 2001). A formação do MDA ocorre através da decomposição de hidroperóxidos, produtos primários da oxidação lipídica.

### 2.10.2 Dano em Proteínas – Carbonilação

A oxidação de proteínas, carbonilação, é um dano comum que ocorre em alguns resíduos de aminoácidos (L-arginina, L-lisina, L-prolina e L-treonina), principalmente pelo ataque de radicais  $O_2\bullet^-$  e  $\bullet OH$ . A formação de resíduos carbonilados em proteínas pode ocorrer em resposta a conjugação de produtos de LPO e detecção de ácidos sulfênicos (WONG *et al.*, 2010) ou outros mecanismos como: a oxidação do sítio catalítico, oxidação induzindo a quebra da cadeia polipeptídica e a oxidação de aminoácidos. A principal consequência da oxidação proteica é a geração de proteína carbonilada (PC) e possível formação de agregados proteicos resultando no acúmulo de proteínas oxidadas e consequentemente aumento de disfunção celular. A determinação de PC é um marcador de dano oxidativo proteico (VALKO *et al.*, 2007)

### 2.10.3 Estresse oxidativo e a infecção por *Leishmania* spp.

Protozoários do gênero *Leishmania* são capazes de invadir o sistema imunológico dos hospedeiros e perpetuar a infecção. Após a fagocitose, os macrófagos são ativados e ocorrem

vários processos celulares simultâneos com intuito de destruir o organismo invasor. O processo de fagocitose requer um alto consumo de oxigênio que resulta na explosão respiratória induzida pela enzima NADPH oxidase, aumento nas concentrações celulares de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e conseqüentemente formação das EROs, como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroxila radical ( $\cdot$ OH) e óxido nítrico (NO) como mecanismo de defesa do hospedeiro. Concomitantemente, ocorre a produção de enzimas de degradação do fagolisossomo, as quais induzem efeito citotóxico e acidificam o meio. Bem como a produção de NO através da ativação da enzima óxido nítrico sintase, a L-Arginina presente nos macrófagos atua na conversão de nitrato à nitrito. Uma das principais funções dos macrófagos é destruir organismos invasores, por meio da produção de EROs (SERARSLAN; YILMAZ; SÖĞÜT, 2005; VAN ASSCHE *et al.*, 2011).

Os tripamossomatídeos de maneira geral, embora dentro dos macrófagos expostos à intermediários oxigenados e nitrogenados tóxicos, têm um eficiente sistema de defesa antioxidante constituído de um tiol, a tripanotiona (T) e a tripanotiona redutase (TR), assim como a capacidade de liberar óxido nítrico através da enzima óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS). As espécies do gênero *Leishmania* são um dos poucos protozoários que são capazes de sobreviver e se replicar neste ambiente hostil, embora apresentem sensibilidade as EROs, possuem mecanismos que permitem inibir o desbalanço oxidativo (CASTRO-PINTO; FABRINO; LEON, 2014; VAN ASSCHE *et al.*, 2011).

Infecções por *L. infantum* na espécie canina, foram apontadas como um dos agravantes para o desbalanço entre as EROs nos hospedeiros (ALMEIDA *et al.*, 2013c; TORRECILHA *et al.*, 2016). Existem evidências de que, quando a infecção está estabelecida, o parasito pode inibir o metabolismo de oxidação de neutrófilos e prolongar a sobrevivência celular, utilizando assim neutrófilos como 'Cavalo de Tróia' nos estágios iniciais da infecção (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). No entanto, quando a doença já está estabelecida em cães, há o aumento da produção de superóxido em neutrófilos, o que poderia contribuir significativamente ao estresse oxidativo (CIARLINI *et al.*, 2010).

Embora o estresse oxidativo tenha sido reportado em humanos e caninos infectados pelos protozoários do gênero *Leishmania* sp., a continuidade dessas investigações é importante para a expansão de conhecimentos acerca da fisiopatologia das respostas inflamatórias, o impacto clínico desse desbalanço oxidativo na LV.

## 2.11 Diagnóstico

O Manual de Vigilância Epidemiológica da Leishmaniose, Visceral e Tegumentar padronizou o diagnóstico da LVC e LVH, os quais se fundamentam na detecção do agente causal, baseando-se em técnicas imunológicas ou parasitológicas (BRASIL, 2014; SES, 2014). Porém além dos testes oficiais existem outros que podem ser empregados no diagnóstico.

Os testes laboratoriais de rotina mais utilizados são os imunológicos, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), os quais são baseados na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* ou de antígenos específicos. Tais testes são empregados em levantamentos soro epidemiológicos, pois permitem a avaliação de um grande número de amostras em um curto espaço de tempo (SOARES, 2012). Contudo, nas técnicas sorológicas a presença de reações cruzadas com outras espécies de parasitos da Família Trypanosomatidae, em especial *Trypanosoma cruzi* podem apresentar resultados falsos positivos (INIESTA *et al.*, 2002; MATOS *et al.*, 2015). Também é utilizado o teste imunocromatográfico TR-DPP (Teste Rápido *Dual Path Platform*), como método de triagem, o qual detecta anticorpos específicos de LVH e LVC. Este método destaca-se pela praticidade da execução e interpretação dos resultados (SES, 2014).

Uma limitação encontrada na utilização das técnicas sorológicas é o diagnóstico de LV em animais assintomáticos, pois frequentemente, nestes casos os testes sorológicos não apresentam reatividade pela baixa carga de infecção, e conseqüentemente, pelos baixos níveis de anticorpos (FERNÁNDEZ-BELLON *et al.*, 2006; INIESTA *et al.*, 2002).

Entre as técnicas laboratoriais, o método parasitológico é considerado de maior especificidade para o diagnóstico de LV, embora nem sempre este seja de fácil execução, pois a coleta do material biológico é invasiva (MATOS *et al.*, 2015). O diagnóstico parasitológico busca a presença de parasito, nas formas amastigotas, nos órgãos infectados, por meio das técnicas de observação microscópica, cultura ou exame direto (CORTES, 2008). O material biológico deve ser obtido preferencialmente da medula óssea, aspirado de linfonodos ou biópsia hepática (SES, 2014).

A técnica de PCR tem sido muito utilizada em pesquisas para o diagnóstico da LVC e LVH, embora não esteja prevista no manual como técnica oficial para o diagnóstico de leishmaniose. Este método permite a amplificação de sequências de DNA específicas do parasito, mesmo em amostras biológicas com baixos níveis de infecção parasitária, apresentando viabilidade de diagnóstico inclusive em animais assintomáticos e soronegativos nas técnicas imunológicas (INIESTA *et al.*, 2002; SOLANO-GALLEGOS *et al.*, 2004).

Amostras de aspirados ou biópsias de linfonodo, baço, medula óssea e fígado apresentam melhores resultados, contudo, amostras de sangue periférico, pele e conjuntiva proporcionam uma colheita menos invasiva. Embora o PCR apresente maior sensibilidade no diagnóstico de LV, é pouco utilizada na rotina de laboratórios e não está padronizada pelo Ministério da Saúde do Brasil por ser onerosa, inviabilizando inquéritos epidemiológicos (QUEIROZ *et al.*, 2010).

No Rio Grande do Sul, casos suspeitos para a LVC são avaliados pelo Laboratório Central do Estado (LACEN), com realização de triagem utilizando o TR-DPP e pela técnica de ELISA, que é o teste confirmatório, ambos preconizados pela Nota Técnica do Ministério da Saúde N°1/11. Quando os dois testes são positivos, o cão é considerado portador da doença (sintomático ou assintomático).

Diferentemente da infecção em humanos e caninos, que já possuem padronização nas técnicas de diagnóstico, para a detecção do parasito em outras espécies, como a equina, utilizam-se os mais variados testes (sorológicos, moleculares, culturas, biópsias). Os testes sorológicos e parasitológicos têm sido amplamente utilizados nessa espécie (BIGELI; OLIVEIRA JÚNIOR; TELES, 2012; FEITOSA *et al.*, 2012; KOUAM *et al.*, 2010).

### 2.11.1 Marcadores Moleculares

Os métodos moleculares são amplamente empregados na detecção de *Leishmania* e podem identificar o parasito ao nível de gênero, complexo ou espécies, com a utilização de diferentes marcadores genéticos conforme o alvo desejado (AKHOUNDI *et al.*, 2017; PITA-PEREIRA *et al.*, 2012).

*Leishmania* spp., assim como todos os tripanossomatídeos, têm características únicas de organização genômica, como genes sem íntrons e policistrons e pequenos cromossomos com alta densidade genética. Além disso, esses flagelados possuem uma única mitocôndria composta por uma organela denominada cinetoplasto, que contém uma grande rede de kDNA (AKHOUNDI *et al.*, 2017; LUKEŠ *et al.*, 2002). Assim, a detecção do parasito pode ser realizada usando marcadores genéticos oriundos de DNA não cromossômico, o kDNA, em regiões conservadas para o gênero *Leishmania* ou para espécies como *Leishmania infantum* (CORTES *et al.*, 2004; LE FICHOUX *et al.*, 1999; MICHALSKY *et al.*, 2011; PANDEY *et al.*, 2008). Embora as regiões amplificadas dos minicírculos de kDNA sejam muito úteis devido à alta sensibilidade ao Gênero, o polimorfismo das sequências do kDNA pode ser um obstáculo para a diferenciação interespecífica. A região LT1, a qual é amplificada com os iniciadores

RV1 / RV2 em um fragmento de 145 pb, é altamente variável e rica em A/T (adenina/timina), que é comumente usada para diferir entre subclasses de minicírculos (CECCARELLI *et al.*, 2014; LACHAUD *et al.*, 2002).

O DNA cromossômico (DNA ribossomal - rDNA), localizado principalmente no cromossomo 27, tem entre os diferentes componentes dos genes as regiões ITS mais variáveis, ideais para identificação de espécies (KUHLIS *et al.*, 2005; SCHÖNIAN *et al.*, 2001). A detecção das regiões ITS específicas em fragmentos de DNA de *Leishmania* é realizada com diferentes pares de iniciadores: LITSR-L5.8S, LITSV-LITSR e LITSV-L5.8SR, esses são alguns dos iniciadores usados como alvo molecular (EL TAI *et al.*, 2000; EL TAI *et al.*, 2001).

Os alvos moleculares do kDNA e regiões ITS foram anteriormente utilizados para a detecção da infecção por *Leishmania* sp. em equinos assintomáticos da região da fronteira oeste, município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul (ESCOBAR *et al.*, 2019). Os detalhes das condições de PCR estão listados na Tabela 1.

Tabela 1- Alvos moleculares das regiões kDNA e ITS para diagnóstico de *Leishmania* spp.

Região do Gene	Iniciadores	Tamanho das bandas	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Análise da plataforma BLAST	Condições de amplificação
ITS rDNA	LITSV LITSR	1020 bp	ACACTCAGGTCTGTAAAC CTGGATCATTT-TCCGATG	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	95°C/ 2 min, 95°C/ 20s, 53°C/30s, 72°/60s (34 cycles), 72°/6 min (El Tai <i>et al.</i> , 2000)
ITS1 rDNA	LITSR L5.8S	320 bp	CTGGATCATTT-TCCGATG TGATACCACTTATCGCACT	<i>Trypanosomatidae</i> sp.	95°C/ 2 min, 95°C/ 20s, 53°C/30s, 72°/60s (34 cycles), 72°/6 min (El Tai <i>et al.</i> , 2001)
ITS2 rDNA	LITSV L5.8SR	700 bp	ACACTCAGGTCTGTAAAC AAGTGCG-ATAAGTGTA	<i>Leishmania</i> sp. <i>Trypanosoma</i> sp.	95°C/ 2 min, 95°C/ 20s, 53°C/30s, 72°/60s (34 cycles), 72°/6 min (El Tai <i>et al.</i> , 2001)
LT1 kDNA	RV1 RV2	145 bp	CTTTTCTGGTCCC GCGGGT CCACCTGCCTATTTACA	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> .	94°C/ 4 min, 94°C/ 30s, 60°C/30s, 72°/30s (30 cycles), 72°/10 min (Almeida <i>et al.</i> , 2013a; Le Fichoux <i>et al.</i> , 1999; Silva <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Escobar *et al.* (2019) Adaptado

A sensibilidade das técnicas pode ser aumentada quando, como alvo de detecção do parasito, são utilizadas sequências representadas em múltiplas cópias no genoma. A escolha de regiões conservadas ou variáveis presentes em tais alvos permite adaptar a especificidade do PCR. Muitas vezes se faz necessário o acoplamento de outras ferramentas moleculares

para a caracterização do parasito. No caso de amplificação de regiões de sequências variáveis, podem ser empregadas outras metodologias como RFLP, hibridização com sondas específicas ou sequenciamento para a identificação do parasito em nível de complexo ou espécie (BRITTO; PITA-PEREIRA, 2014).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo da presente tese foi realizar a identificação molecular, avaliação clínica, hematológica e bioquímica da leishmaniose em equinos e caninos no município de Uruguaiana – RS.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1- Verificar a presença de material genético de *Leishmania* sp. em amostras de sangue periférico de equinos e caninos;

2- Realizar a caracterização molecular dos fragmentos de DNA de *Leishmania* em amostras de equinos e caninos para identificar as espécies infectantes;

3- Avaliar os aspectos clínicos dos animais naturalmente infectados.

4- Avaliar alterações no hemograma e na contagem de plaquetas totais dos animais infectados;

5- Comparar os resultados das análises hematológicas entre os animais do grupo infectado por *Leishmania* sp. e grupo não infectado;

6- Avaliar os parâmetros bioquímicos séricos, entre os grupos infectados e não infectados diagnosticados pela técnica de PCR, correlacionando com formas assintomáticas e sintomáticas;

7- Determinar o dano oxidativo em biomoléculas de animais naturalmente infectados com *Leishmania* sp. e comparar com os perfis dos animais do grupo não infectado;

## 4 METODOLOGIA GERAL

### 4.1 Aspectos Éticos

O estudo foi conduzido em estrita conformidade com as recomendações das diretrizes nacionais sobre experimentação animal (BRASIL, 2008). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal do Pampa (CEUA - UNIPAMPA), sob o número CEUA- 016/2016. Os sujeitos participaram do estudo (equinos e caninos) com o consentimento oral de todos os tutores de ambas as espécies antes do início das coletas de material biológico, bem como, das coletas de dados e das avaliações clínicas.

Os mesmos foram informados de que, a participação no estudo permitiria que os pesquisadores realizassem um exame físico e clínico completo e coletas de amostras biológicas sanguíneas, para o diagnóstico da leishmaniose ou infecção por *Leishmania* spp. Ainda, os tutores foram informados que a participação no estudo não traria complicações legais e todas as informações coletadas seriam confidenciais. Não teriam nenhum custo, nem receberiam vantagem financeira. No momento das coletas, foram fornecidos os números de telefone dos pesquisadores para esclarecimento de quaisquer dúvidas.

### 4.2 População de estudo

Participaram deste estudo 127 animais, dos quais no primeiro artigo foram incluídos 123 animais e no segundo artigo foram incluídos 124 animais. Os equinos e caninos eram de ambos os sexos, com raças e idades variadas, no município de Uruguaiana, área de transmissão de LV, localizado na fronteira oeste do Rio Grande do Sul (29° 44' 58" S e 57° 5' 18" W), Brasil. O período de coletas de material biológico e avaliação clínica foi entre novembro de 2016 e setembro de 2017.

Durante o desenvolvimento das coletas, tivemos a participação de uma equipe multiprofissional, com médicos veterinários e discentes do curso de Medicina Veterinária, veterinários mestrados e residentes, bem como profissionais da área da saúde (enfermagem, biologia e farmácia) que atuaram nas diversas etapas das coletas. Desde as anamneses, avaliações clínicas, coletas de materiais biológicos e orientações sobre a enfermidade e métodos de prevenção para os tutores dos animais.

A equipe do Projeto Carroceiro e Equipampa, ambos vinculados ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pampa Campus Uruguaiana, atuou diretamente nas coletas. Bem como na etapa de busca ativa por animais para participarem do experimento. Todas as coletas foram pré-agendadas e divulgadas na comunidade onde seriam realizadas para que os tutores pudessem participar. Os animais foram coletados através da adesão de

seus tutores ao estudo. No final de cada coleta os animais recebiam aplicação de vermífugos e os tutores eram orientados sobre cuidados gerais dos animais.

A população alvo do estudo foi composta por equinos de zona urbana e periurbana e cães que habitavam os mesmos locais dos equinos, preferencialmente foram escolhidos aqueles animais que pertenciam ao mesmo tutor. A maioria desses equinos desempenhavam atividades relacionadas a serviços urbanos como fretes e coleta de lixo para reciclagem.

Os animais foram avaliados para identificação da infecção por *Leishmania* sp., alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas, bem como, o possível dano oxidativo das biomoléculas. O número amostral variou de acordo com as técnicas realizadas, devido à impossibilidade de coleta ou falta de material biológico de alguns sujeitos, especialmente nas análises bioquímicas e hematológicas.

#### 4.3 Amostras Clínicas

Avaliações clínicas e cutâneas foram realizadas para verificação da presença de lesões de pele, do estado geral do animal, da consciência, do grau de hidratação, das mucosas ocular e oral, dos linfonodos, além de verificação do Tempo de Preenchimento Capilar (TPC), das Frequências Cardíaca (FC) e Respiratória (FR) e da Temperatura Corporal (TC).

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa da jugular, após antissepsia. Para cada animal foram coletadas amostras de sangue em tubos contendo EDTA e com gel separador para realização das análises moleculares (PCR), hematológicas, bioquímicas e de estresse oxidativo.

Os animais foram separados em dois grupos - Grupo infectado por *Leishmania* sp. e Grupo não infectado, de acordo com os resultados obtidos no PCR.

#### 4.4 Análises Estatísticas

As observações clínicas e laboratoriais dos grupos, a saber, Grupo infectado por *Leishmania* sp. e Grupo não infectado, foram comparadas de acordo com a natureza da variável.

As variáveis quantitativas foram submetidas ao teste de normalidade, o teste de *Shapiro-Wilk* foi usado para os grupos de cães (Tabela 2) e *Kolmogorov-Smirnov* para os grupos de equinos (Tabela 3). As variáveis com distribuição paramétrica foram submetidas ao teste estatístico *T Student*. As variáveis com distribuição não paramétrica foram transformadas pelo  $\text{Log}(x + 1)$  e submetidas ao teste *T Student*, aquelas que após transformação,

apresentaram distribuição normal. O teste estatístico de Wilcoxon foi utilizado para as variáveis não paramétricas mesmo após a transformação. Ambos os testes foram utilizados para avaliação de diferenças entre os grupos independentes.

As variáveis dicotômicas foram avaliadas por dispersão de frequência e submetidas ao teste do qui-quadrado (sexo, massa corporal, lesões cutâneas, linfadenopatia, desidratação, alterações das membranas mucosas oral e ocular). Os dados foram analisados no programa computacional SPSS® para Windows, com *p-value* <0,05.

**Tabela 2-** Teste de normalidade da população canina - *Shapiro-Wilk*, valores de probabilidade, brutos e após transformação.

Variáveis	Valores de probabilidade (p)		Teste Estatístico
	Teste de Normalidade		
	Dados Brutos	Após transformação	
Tempo de Preenchimento Capilar (TPC)	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Frequência Respiratória (FR)	0,000	0,010	<i>Wilcoxon</i>
Frequência Cardíaca (FC)	0,879	-	<i>T student</i>
Temperatura Corporal (TC)	0,005	0,007	<i>Wilcoxon</i>
Peroxidação Lipídica (TBARS)	0,263	-	<i>T student</i>
Carbonilação de Proteínas (Carbonil)	0,000	0,002	<i>Wilcoxon</i>
Eritrócitos	0,168	-	<i>T student</i>
Hematócrito (HCT)	0,259	-	<i>T student</i>
Hemoglobina (HB)	0,157	-	<i>T student</i>
Volume Corpuscular Médio (VCM)	0,035	0,026	<i>Wilcoxon</i>
Concentração Média da Hemoglobina Corpuscular (CMHC)	0,623	-	<i>T student</i>
Plaquetas	0,001	0,244	<i>T student</i>
Leucócitos	0,115	-	<i>T student</i>
Neutrófilo Bastonete Absoluto	0,000	0,567	<i>T student</i>
Neutrófilo Bastonete Relativo	0,019	0,463	<i>T student</i>
Neutrófilo Segmentado Absoluto	0,429	-	<i>T student</i>
Neutrófilo Segmentado Relativo	0,861	-	<i>T student</i>
Eosinófilo Absoluto	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Eosinófilo Relativo	0,000	0,004	<i>Wilcoxon</i>
Basófilo Absoluto	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Basófilo Relativo	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Linfócito Absoluto	0,164	-	<i>T student</i>
Linfócito Relativo	0,762	-	<i>T student</i>
Monócito Absoluto	0,001	0,610	<i>T student</i>
Monócito Relativo	0,000	0,078	<i>T student</i>
Relação Neutrófilo/Linfócito	0,000	0,024	<i>Wilcoxon</i>
Relação Plaqueta/Linfócito	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Aspartato aminotransferase (AST)	0,003	0,095	<i>T student</i>
Alanina aminotransferase (ALT)	0,023	0,772	<i>T student</i>
Gama glutamiltransferase (GGT)	0,227	-	<i>T student</i>
Creatinina	0,870	-	<i>T student</i>
Fosfatase Alcalina (FA)	0,150	-	<i>T student</i>
Ureia	0,000	0,105	<i>T student</i>
Proteína Total	0,768	-	<i>T student</i>
Albumina	0,431	-	<i>T student</i>
Globulina	0,733	-	<i>T student</i>
Gama Globulina	0,004	0,087	<i>T student</i>
Relação Albumina/Globulina	0,011	0,058	<i>T student</i>

**Tabela 3** – Teste de normalidade da população equina - *Kolmogorov-Smirnov*, valores de probabilidade, brutos e após transformação.

Variáveis	Valores de probabilidade (p)		Teste Estatístico
	Teste de Normalidade		
	Dados Brutos	Após transformação	
Tempo de Preenchimento Capilar (TPC)	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Frequência Respiratória (FR)	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Frequência Cardíaca (FC)	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Temperatura Corporal (TC)	0,200	-	<i>T student</i>
Peroxidação Lipídica (TBARS)	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Carbonilação de Proteínas (Carbonil)	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Eritrócitos	0,200	-	<i>T student</i>
Hematócrito (HCT)	0,065	-	<i>T student</i>
Hemoglobina (HB)	0,012	0,006	<i>Wilcoxon</i>
Volume Corpuscular Médio (VCM)	0,017	0,061	<i>T student</i>
Concentração Média da Hemoglobina Corpuscular (CMHC)	0,001	0,001	<i>Wilcoxon</i>
Plaquetas	0,000	0,041	<i>Wilcoxon</i>
Leucócitos	0,002	0,057	<i>T student</i>
Neutrófilo Bastonete Absoluto	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Neutrófilo Bastonete Relativo	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Eosinófilo Absoluto	0,008	0,200	<i>T student</i>
Eosinófilo Relativo	0,045	0,001	<i>Wilcoxon</i>
Basófilo Absoluto	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Basófilo Relativo	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Linfócito Absoluto	0,000	0,156	<i>T student</i>
Linfócito Relativo	0,000	0,009	<i>Wilcoxon</i>
Monócito Absoluto	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Monócito Relativo	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Relação Neutrófilo/Linfócito	0,122	-	<i>T student</i>
Relação Plaqueta/Linfócito	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Aspartato aminotransferase (AST)	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Gama glutamiltransferase (GGT)	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Creatinina	0,034	0,002	<i>Wilcoxon</i>
Ureia	0,200	-	<i>T student</i>
Proteína Total	0,059	-	<i>T student</i>
Creatinoquinase (CK)	0,000	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Albumina	0,200	-	<i>T student</i>
Globulina	0,018	0,000	<i>Wilcoxon</i>
Gama Globulina	0,200	-	<i>T student</i>
Relação Albumina/Globulina	0,200	-	<i>T student</i>

## CAPÍTULO II

### 5 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Os resultados desta Tese, referentes aos objetivos específicos 1 e 2, estão apresentados sob a forma de um artigo científico (DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13361>), publicado no Periódico *Transboundary and Emerging Diseases* (Online ISSN:1865-1682), Qualis Capes B1 na área CBII. As seções Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Referências encontram-se no artigo a seguir.

## Molecular detection of *Leishmania* spp. in Brazilian cross-border south region mammalian hosts

Taiane Acunha Escobar<sup>1</sup>  | Gabriela Dowich<sup>1</sup>  | Leticia Carvalho Cantele<sup>1</sup> |  
 Luísa Zuravski<sup>1</sup> | Patrícia Aline Gröhns Ferrareze<sup>2</sup> | Cláudia Acosta Duarte<sup>1</sup> |  
 Lívia Kmetzsch Rosa e Silva<sup>2</sup> | Irina Lübeck<sup>1</sup> | Vanusa Manfredini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Pampa, Uruguaiana, Brazil

<sup>2</sup>Molecular Biology and e Biotechnology, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

### Correspondence

Taiane Acunha Escobar, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil. Post Code: 118 BR 472 km 575, 97500701.  
 Email: taianeescobar@hotmail.com

### Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: N° 1740877 - DS; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

### Abstract

Visceral leishmaniasis is an endemic zoonotic disease identified especially in developing territories. Brazil's northeast, southeast and midwest have been endemic for several years; currently, the infection is spreading to the south. Dogs are the main reservoirs; however, other mammal species have also been infected. Herein, we have identified the infecting *Leishmania* species in dogs and horses from the south of Brazil, a new outbreak of the infection. Blood samples were collected in the urban area of Uruguaiana city. DNA was extracted from peripheral blood, kinetoplast DNA (kDNA) and ribosomal DNA (rDNA) fragments were obtained by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. Out of 123 samples, 25 of them (14 dogs and 11 horses) were positive for *Leishmania* spp. Sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that the kDNA in positive samples was similar to four species previously reported: *L. infantum*/*L. chagasi*, *L. donovani*, *L. major*. Despite kDNA minicircles regions are very useful due to high sensitivity to *Leishmania* spp. DNA detection, the sequence polymorphism among minicircles can be an obstacle to interspecific differentiation. Our results suggest that these strains are circulating in Brazil south region cross-border and indicate the susceptibility of new outbreak for visceral leishmaniasis infection in horses domiciled in endemic region for canine and human visceral leishmaniasis.

### KEYWORDS

canine visceral leishmaniasis, equine, infectious disease, leishmaniasis

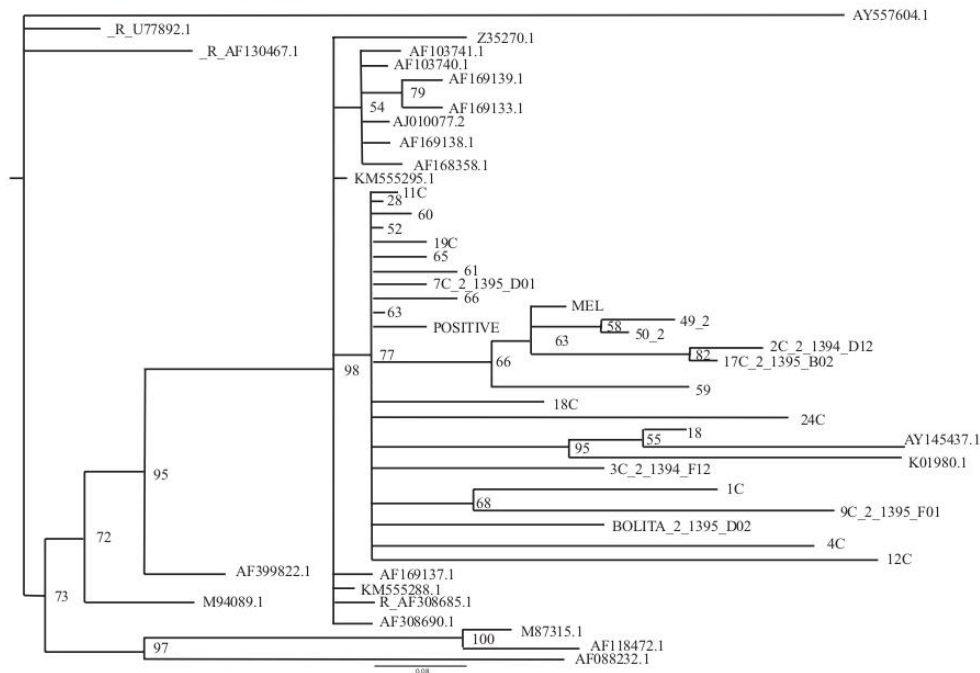
## 1 | INTRODUCTION

In American countries, visceral leishmaniasis (VL), endemic zoonotic disease, remains a public health issue owing to its magnitude and clinical, biological and epidemiological complexity. Brazil northeast, southeast and midwest regions have been VL endemic for several years. Until 2008, the southern region was indene, but nowadays the pathogen has been expanding to the south, by the Argentina–Uruguay cross-border. Rio Grande do Sul state had its first case in 2008, detected on a dog and later in humans (Deboni & Barbosa, 2011; Monteiro & Stainki, 2010). Since then, the infection spreaded

rapidly with reported cases in regions with well-defined seasons and low temperatures, despite the adverse weather conditions for the vector's adaptation and reproduction.

There is a notable gap in the dynamics of infection, mainly because it is an area where the two border countries (Argentina and Uruguay) have already informed the presence of vector, infection in humans and dogs (Salomón, Basmajdian, Fernández, & Santini, 2011; Salomon et al., 2009; Salomon & Sinagra, 2008). Considering the great potential transmission of the infection in the three countries—in the Brazilian south cross-border, where CVL and human cases were increased, there is the possibility of being a new VL endemic





**FIGURE 1** Phylogenetic tree of *Leishmania* spp. isolates from south Brazil, generated from Bayesian inference analysis of sequences of the kDNA. The isolates were described in Supplementary item

region. The infection has been reported for a little more than a decade in south Brazil, and so far, even with efforts among public agencies, there is a notable lack of control measures as well as diagnosis and treatment in the southern region.

As the canine visceral leishmaniasis (CVL) rose, in spite of adoption of control actions, and the vector is already adapted to the environment conditions—as it has happened in cold weather European countries—there was a growing concern regarding the possibility of other mammal species also be infected. It would be perfectly possible that the equine species, in contact with reservoirs, become part of the contamination chain as a probable host in this region. The infection in horses has been reported in southeast Brazil previously (Soares et al., 2013), thus, our work aimed to investigate the presence of *Leishmania* spp. parasites in domestic reservoirs and horses from a new outbreak area of south of Brazil.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

A total of 28 dogs (*Canis familiaris*) and 95 horses (*Equus caballus*) of both genders coming from Uruguaiana city (29°44'58"S and 57°5'18"W) southwest of south Brazil, cross-border region with Argentina and Uruguay countries, participated in the study from November 2016 to September 2017. Most of equines were draught animals and generally slept in the backyards of residences, close to dogs (which had blood collected as well). The blood samples

were collected by venipuncture of the external jugular vein in EDTA tubes.

DNA was extracted by salting-out technique (Joseph & David, 2001). The PCR amplification was carried out with two primer pairs separately: RV1/ RV2 (LT1 kDNA) with 145 bp and L5.8SR/LITSV (ITS2) with 750 bp size bands expected, to have a more precise and accurate diagnostic test and PCR conditions were described elsewhere (El Tai et al., 2001; le Fichoux et al., 1999). The reaction mixtures adjusted in a final volume of 25  $\mu$ l (25–50 ng of DNA), 2.5 U of Taq DNA polymerase, 1X PCR buffer, 1.5 mM of  $MgCl_2$ , (Invitrogen, USA), 10 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) (Promega, EUA), 10 pmol of each primer (IDT, EUA) and ultrapure water, were performed in thermocycler (Amplitherm Thermal Cyclers). *L. (L.) infantum chagasi* (MOHM/BR/1974/PP75 and MOHM/BR/2002/LPC-RPV) and *L. (L.) donovani* (MOHM/ET/1976/HU3) were used as positive controls while milli-Q water was a negative control. The amplicons were visualized by electrophoresis in 1.5% agarose gels in 1  $\times$  TAE-buffer staining with ethidium bromide. Direct sequencing fragments of 145 bp (LT1 kDNA) was performed by an automated sequencer *ABI-Prism 3500 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, USA) on both strands. After purification of amplified PCR fragments with the *Purelink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification kit* (Invitrogen, USA). Only positive samples in both primers pairs were selected for direct sequencing.

The consensus sequences of forward and reverse sequenced fragments were obtained with Bioedit software. The

alignment of consensus sequences with 23 published *Leishmania* and *Trypanosoma* kDNA sequences (NCBI accession codes in Table 1) was performed with the multiple sequence aligner MAFFT v.7 and default parameters. The evolutionary model of DNA substitution was inferred by jModelTest as GTR (*General Time Reversible*) with Gamma distribution. The phylogenetic tree was constructed by MrBayes with selected evolutionary model and *Trypanosoma evansi* minicircle kDNA sequence (AY557604.1) as outgroup. The inferred tree was calculated with 50,000,000 generations and had an average deviation score of 0.003885. The tree visualization was generated with FigTree software.

### 3 | RESULTS AND DISCUSSION

The partial sequences of LT1 kDNA region (145 bp) of *Leishmania donovani* complex and ITS 2 (750 bp) were effective to detect canine

**TABLE 1** List of species sequences from GenBank, used in phylogenetic reconstructions, associated with their hosts (habitat), geographical origin, accession number and genetic region to the kDNA

Accession Number	Specie	Host	Country of origin
AF 118472.1	<i>L. panamensis</i>	*	-
AF 088232.1	<i>L. lainsoni</i>	*	-
AF 103741.1	<i>L. infantum</i>	Canine	Tunisia
AF 103740.1	<i>L. infantum</i>	Human	Ukraine
R_AF 130467.1	<i>L. guyanensis</i>	*	-
AF 168358.1	<i>L. donovani</i>	Human	China
AF 169133.1	<i>L. infantum</i>	Human	Algeria
AF 169138.1	<i>L. chagasi</i>	*	-
AF 169139.1	<i>L. infantum</i>	*	-
R_AF 308685.1	<i>L. major</i>	Human	Israel
AF 308690.1	<i>L. tropica</i>	Human	Iran
AF 399822.1	<i>L. donovani</i>	*	-
AF 169137.1	<i>L. chagasi</i>	Human	Panama
AJ 010077.2	<i>L. donovani</i>	Human	Sudan
Z 35270.1	<i>L. infantum</i>	*	-
KM 555295.1	<i>L. major</i>	Human	Israel
KM 555288.1	<i>L. major</i>	Human	Israel
M 87315.1	<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	*	-
M 94089.1	<i>L. amazone-nensis</i>	*	-
R_U 77892.1	<i>L. aethiopica</i>	*	-
AY 557604.1	<i>T. evansi</i>	*	-
AY 145437.1	<i>L. Mexicana</i>	*	-
K 01980.1	<i>L. tarentolae</i>	*	-

Note: Strains selected in GenBank database for phylogenetic analyses for comparison with the strains of this work.

\*Complete sequences in GenBank.

and horse infection. Out of 25 from 123 samples analysed produce PCR fragments, in both PCR, 14/28 (50%) dog blood samples and 11/95 (11.6%) horses. *Leishmania* spp. infection in domestic reservoirs of Uruguaiana city represents a higher infection rate than that found in a survey in Uruguay (22%) with *L. infantum* (Satragno & Faral-Tello, 2017). The vectors have food preference for dogs and humans (Macedo-Silva et al., 2014); however, other mammalian species, including equines, may represent an alternative food source. Visceral leishmaniasis has been investigated in southern Brazil for more than a decade. There are currently humans and dogs case records in the three border region (Brazil, Argentina and Uruguay) (Salomón et al., 2011; Salomon et al., 2008; Satragno et al., 2017). We have found *Leishmania* infection in equine peripheral blood in sites with CVL, inferring the possibility that animals residing in endemic CVL areas are at risk of being infected. The results revealed that *Leishmania infantum* DNA and *Leishmania major* DNA were also identified in the equine species (Supplementary File). Just like here, *Leishmania infantum* DNA has already been detected in European horses and in Brazil for the first time in Minas Gerais state (Gama et al., 2014; Rolão, Martins, João, & Campino, 2005; Soares et al., 2013; Solano-Gallego et al., 2003). *Leishmania major*, from Old World, causes human cutaneous leishmaniasis in Asia and Africa. It was also identified in Iraq, for the first time, from dog cutaneous lesions. In south Brazil, there were no reports of infection until now (Al-Bajalan, Niranjji, Al-Jaf, & Kato, 2018).

Even though the amplified kDNA minicircle regions are very useful due to high sensitivity to *Leishmania* spp. DNA detection, the sequence polymorphism among minicircles can be an obstacle to interspecific differentiation. The LT1 region, amplified in a 145 bp fragment by RV1/RV2 primers, is located in a highly variable and A/T rich region, which is commonly used to differ between minicircle subclasses (Ceccarelli, Galluzzi, Migliazzo, & Magnani, 2014; Lachaud et al., 2002). Therefore, according to the kinetoplast genotype, it is possible to have more similarity between genotypes shared by different species (with potential cross-species amplification) than between the species themselves, leading to the formation of unspecific clades in the phylogenetic tree (Ceccarelli et al., 2017; Yurchenko, Kolesnikov, & Lukes, 2000). Among these, there is the monophyletic cluster comprising *L. mexicana*, *L. tarentolae* and the horse sample number 18. Other groups, however, are supported by *Leishmania* phylogeny studies, as the cluster of *L. panamensis*, *L. braziliensis* and *L. lainsoni*; as well as the paraphyletic clade of *L. infantum*, *L. chagasi* and *L. donovani* (Figure 1).

In this border region, where epidemiological triad (vector, etiologic agent and reservoir) is installed, it is highly recommended to continue investigating, considering the great potential of transmission in the three countries due to the intense traffic of people and animals. There were studies reporting that domestic canine reservoirs and humans were infected by the *Leishmania infantum* species, but until this research, no other host species had been identified with the *Leishmania* infection in this border region. Our results indicate the horse susceptibility of infection in endemic areas for canine and human visceral leishmaniasis, and here, we present the horse

infection as a new outbreak. For this reason, it is most important to clarify the role of this animal in the transmission cycle. Now, we need to improve the phylogenetic analysis, characterization of these isolates and to investigate the presence of dermatropic species in this region to compare the pathogenic species found in southern Brazil with those in other countries specially in the Old World.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Biotechnology Centre of Federal University of Rio Grande do Sul and the Leishmania collection of the Oswaldo Cruz Institute (CLIOC-FIOCRUZ) for kindly providing *Leishmania* reference strains. This work was supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) PhD scholarship to T. Acunha Escobar and by Research Program for SUS: Shared Health Management—PPSUS: DECIT/SCITIE/MS, CNPq, FAPERGS and SES-RS (N° 17/2551-001 405-7).

#### ETHICAL APPROVAL

The study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Brazilian National Guidelines on animal experimentation. The protocol was approved by the Federal University of Pampa Ethics Committee on Animal Use (CEUA - UNIPAMPA) permit number: CEUA - 016/2016.

#### CONFLICT OF INTEREST

All authors have no conflict of interest.

#### ORCID

Taiane Acunha Escobar  <https://orcid.org/0000-0001-8896-3271>  
Gabriela Dowich  <https://orcid.org/0000-0002-5386-8706>

#### REFERENCES

- Al-Bajalan, M. M., Niranji, S. S., Al-Jaf, S. M. A., & Kato, H. (2018). First identification of *L. major* in a dog in an endemic area of human cutaneous leishmaniasis in Iraq: Molecular and phylogenetic studies. *Parasitology Research*, 117(2), 585–590. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5704-7>
- Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Diotallevi, A., Andreoni, F., Fowler, H., Petersen, C., ... Magnani, M. (2017). The use of kDNA minicircle subclass relative abundance to differentiate between *Leishmania* (*L.*) *infantum* and *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*. *Parasites & Vectors*, 10(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2181-x>
- Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Migliazzo, A., & Magnani, M. (2014). Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS ONE*, 9(2), e88845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088845>
- Deboni, S. C., Barbosa, M., & Ramos, R. R. (2011). Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. In *Boletim Epidemiológico. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Secretaria de Saúde* (Vol. 13, p. 8). Porto Alegre, Brazil: Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. Retrieved from <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/27124724-n-1-marco.pdf>
- El Tai, N. O., El Fari, M., Mauricio, I., Miles, M. A., Oskam, L., El Safi, S. H., ... Schönian, G. (2001). *Leishmania donovani*: Intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Experimental Parasitology*, 97(1), 35–44. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4592>
- Gama, A., Elias, J., Ribeiro, A. J., Alegria, N., Schallig, H. D. F. H., Silva, F., ... Cotovio, M. (2014). Cutaneous leishmaniasis in a horse from northern Portugal. *Veterinary Parasitology*, 200(1), 189–192. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.005>
- Joseph, S., & David, W. R. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P., & Bastien, P. (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 210–215. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.210-215.2002>
- le Fichoux, Y., Quaranta, J.-F., Aufeuve, J. P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, I., ... Kubar, J. (1999). Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1953–1957.
- Macedo-Silva, V. P., Martins, D. R., De Queiroz, P. V., Pinheiro, M. P., Freire, C. C., Queiroz, J. W., ... Ximenes Mde, F. (2014). Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Journal of Medical Entomology*, 51(1), 237–244. <https://doi.org/10.1603/ME12131>
- Monteiro, S. G., Stainki, D. R., Dalmolin, F., Braccini, E. T., & Pinto-Filho, S. T. (2010). Detecção de *Leishmania infantum* em cão no município de Uruguaiana, RS: Uma contribuição para a discussão das leishmanioses na região sul do Brasil. *Veterinária E Zootecnia*, 17(4), 497–501.
- Rolão, N., Martins, M., João, A., & Campino, L. (2005). Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12(2), 183–186. <https://doi.org/10.1051/parasite/2005122183>
- Salomón, O. D., Basmajdian, Y., Fernández, M. S., & Santini, M. S. (2011). *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: The first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(3), 381–382. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000300023>
- Salomon, O., Ramos, L. K., Quintana, M. G., Acardi, S. A., Santini, M. S., & Schneider, A. (2009). Distribution of vectors of visceral leishmaniasis in the Province of Corrientes, 2008. *Medicina*, 69(6), 625–630.
- Salomon, O. D., Sinagra, A., Nevot, M. C., Barberian, G., Paulin, P., Estevez, J. O., ... Estevez, J. (2008). First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 109–111. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100018>
- Satragno, D., Faral-Tello, P., Canneva, B., Verger, L., Lozano, A., Vitale, E., ... Basmadjian, Y. (2017). Autochthonous outbreak and expansion of canine visceral leishmaniasis, Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*, 23(3), 536. <https://doi.org/10.3201/eid2303.160377>
- Soares, I. R., Silva, S. O., Moreira, F. M., Prado, L. G., Fantini, P., Maranhão, R. D. P. A., ... Palhares, M. S. (2013). First evidence of autochthonous cases of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 197, 665–669. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.014>
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellón, H., Serra, P., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D., & Ferrer, L. (2003). Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Veterinary Journal*, 35(3), 320–323. <https://doi.org/10.2746/042516403776148336>

Yurchenko, V., Kolesnikov, A. A., Lukes, J. (2000). Phylogenetic analysis of Trypanosomatina (Protozoa: Kinetoplastida) based on mini-circle conserved regions. *Folia Parasitologica*, 47(1), 1–5. <https://doi.org/10.14411/fp.2000.001>

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Acunha Escobar T, Dowich G, Cantele LC, et al. Molecular detection of *Leishmania* spp. in Brazilian cross-border south region mammalian hosts. *Transbound Emerg Dis*. 2019;00:1–5. <https://doi.org/10.1111/tbed.13361>

## Supplementary item

Table of kDNA PCR consensus sequence of vertebrate hosts of *Leishmania* infection in Brazilian cross-border south region.

ID	Vertebrate Host	Consensus sequence	BLAST description	Query cover	E-value	Ident	Access
Positive	Control strain	TCTTTTCTGGTCCC GCGGTAGGGGCGTTCTGCRAAATCGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAA--TTGGGYCAAAAAT	<i>Leishmania chagasi</i> strain MHOM/BR/74/PP75 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	98%	4E-24	92%	AF103739.1
18	Horse	TCTTTYKGGTCCSGGGTAGGGGCGTTYTGMRAAAATGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA TTTT--TTGGCCAAAATT-----GCCATTTTGGG--CTCCGGG GCGGAAAA CTG-	<i>Leishmania infantum</i> kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	99%	4E-40	93%	AB678348.1
28	Horse	TCTTTTCTGGTCCC GCGGTAGGGGCGTTCTGCRAAATCGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAA--TYGGYCAAAAAT-----GCCAAAAATCRG--CTCCGGGGCG GAA AACTG-	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	98%	4E-25	86%	Z32842.1
49_2	Horse	TCTTTYTGTTCCCGCGGTAGGGGCGTTYTGCRAAAATCGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAA--WTYGGYCAAAAAT-----GCCMAAWATYRRGYTTCCCGGGSSMGA AAMT	<i>Leishmania major</i> strain MHOM/IL/67/LV563 minicircle, complete sequence; kinetoplast	78%	2E-25	87%	KM555295.1
50_2	Horse	TCTTTTCTGGTCCC GCGGTAGGGGCGTTCTGCRAAATCGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAW--TYGGYCAAAAAT-----GCCMAAAATYSR GCTTCCSCGGG SG GRRAAAT-	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	57%	4E-20	95%	Z32842.1
52	Horse	TCTTTTCTGGTCCC GCGGTAGGGGCGTTTGCRAAATYGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAA--TCGGYCAAAAAT-----GCCAAAAATRRG--CTCCGGG GCGGR A AACTG-	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	98%	1E-25	86%	Z32842.1
59	Horse	TCTTTTCTGGTCCC GCGGTAGGGGCGTTYTGCAAAATYGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAA--TCGGCAAAAATATWTTCCCTTTTGGGCTTTAGCCAAAAATCCG--RCCCC GGGGCGAAAATA-	<i>Leishmania infantum</i> strain MCAN/TN/78/LEM78 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	60%	4E-26	94%	AF103741.1
60	Horse	TCTTTTCTGGTCCC GCGGTAGGGGCGTTTGCRAAATYGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAA--TCGGYCAAAAAT-----GCCAAAAATYAG--CTTCGG GCGGGA AACTG-	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	98%	4E-20	83%	Z32842.1
61	Horse	TCTTTYTGTTCCCGCGGTAGGGGCGTTYTGCRAAAATGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAA--TCGGCAAAAAT-----GCCAAAAATCGG--TCCCGGG GCGGGA AATGG-	<i>Leishmania infantum</i> strain MCAN/TN/78/LEM78 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	96%	7E-38	93%	AF103741.1
63	Horse	TCTTTTCTGGTCCC GCGGTAGGGGCGTTCTGCRAAATYGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAAA--TCGGYCAAAAAT-----GCCAAAAATCGG--CTCCCGGGGCGGAAAACTG	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	75%	1E-19	88%	Z32842.1
65	Horse	YCTTTTCTGGTCCC GCGGTAGGGGCGTTYTGCRAAAATYGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAAA--TCGGCAAAAAT-----GCCAAAAATGGS--TTCCCGGGGCGGAAAAATG-	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	96%	6E-23	84%	Z32842.1
66	Horse	TCTTTTCTGGTCCC GCGGTAGGGGCGTTCTGCRAAATYGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAA--TCGGYCAAAAAT-----GCCAAAAATCCG--CTCCYGGGGYGAACKGG-	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	76%	1E-20	88%	Z32842.1

1C	Dog	YCTTTTTGGTCCMRCGGGTAGGGGCGGTTTGCAGAAATGGAAAAAGGGGTGCAGAAATCCCGTTCT ASAG---KRGGTCAAAAAT-----CCAAAAWTCGG--CTCGGGGCMGGAMACG--	<i>Leishmania major</i> strain MHOM/IL/67/LV563 minicircle, complete sequence; kinetoplast	98%	4E-22	83%	KM555295. 1
2C_2_1394_D12	Dog	TCITTTYTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGCRAAATYGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCA AAAA--TSGGTCAAAAAT-----GCCAAAAAWTYGGTYYSRGGYGRKMTA--	<i>L. donovani</i> (AJS-PEKIN) kinetoplast DNA	79%	1E-28	91%	Z35275.1
3C_2_1394_F12	Dog	TCITTTCTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGCRAAATYGGAAAAATGGGTGCMGRAATCCCGTTCT MMAARTTTGGTCCAAAAAT-----YCCMMAACAAA--T-----	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	65%	3E-15	89%	Z32842.1
4C	Dog	ACTTTTCTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGWAAAAATKGGAGAAATMGGGGGAGAAATWCWWTG KGAAAA--TYGGCAGAAAAAT-----ARCKAAAAAMAGG--CTTGGGGARGGARMC--	<i>Leishmania major</i> clone p kinetoplast sequence	26%	5E-04	100%	MG209692. 1
7C_2_1395_D01	Dog	CTITTYTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGCRAAATYGGAAAAATGGGTGCMGRAATCCCGTTCAA AAA--TTGGYCAAAAAT-----GCCMAAAWTKRG--YTCCSGGGCSRGRAAT	<i>Leishmania donovani</i> isolate MHOM/IQ/88/RTC6 kinetoplast minicircle, sequence	99%	3E-29	83%	AF168356.1
9C_2_1395_F01	Dog	TCTKTCTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGCAGAGGGTRGAAAAA-- GGCGGCAGAAATCCTGCTMAACAG--GWGGCAAAAAT-----CCCACAATTGG-- CTCCGGGGCWGTAAG--	<i>Leishmania infantum</i> kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/98/LLM-737, clone 102	98%	4E-09	74%	AJ275320.1
11C	Dog	TCITTTCTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGCGAAATCGAAAAATGGGTGCAGRAATCCCGTTCA AAA--TTGGTCAAAAAT-----GCCAAAAATCAG--CTCCGGGGCGGAAAAATG-	<i>L. chagasi</i> (AJS-PPECO) kinetoplast DNA	99%	2E-42	96%	Z35276.1
12C	Dog	TCITTYCGTYCCSCGGGTCAGGCCTTTTAAACAGGTRRGAATAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAM YAA--TCKGMCAGAAATG-----GCTAAAKATTGG--CTCCTTGGCGAAAAACTG	<i>Leishmania infantum</i> isolate MCAN/CN/90/SC clone I minicircle, partial sequence; kinetoplast	61%	3E-11	83%	HQ585883. 1
17C_2_1395_B02	Dog	CTITTYTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGAAAAATYGGAAAAATGGGKCMGRAATCCCGTTMAA AAA--TSGGYCAAAAAT-----GCCAAAAATCGGGTTCCTCCGGGGGGGAAT--	<i>Leishmania donovani</i> isolate MHOM/SD/00/Khartoum kinetoplast minicircle, sequence	99%	2E-25	83%	AF168357.1
18C	Dog	TCITTTCTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGCGAAATCGAAAAATGGGGCAGAAATCCCGTTCA AAAA--TTGGYCGAAAAAT-----GCCAATAATSRGYCTCCGGGGCGGCAATAG-	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	99%	2E-23	85%	Z32842.1
19C	Dog	TCITTTCTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGCGAAATYGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAA AAA--TTGGYCAAAAAT-----GCCAAAAATSRG--CTCCSGGGCGGAAAAAT--	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	76%	6E-23	91%	Z32842.1
24C	Dog	TCITTTCTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGCRAAATYGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCYGYTTCT AMA--AAAAWTKGGSC-----YCCRAAAA-----	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	65%	1E-14	92%	Z32842.1
Mel	Dog	TCITTTCTGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGCGAAAWYGGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCA AAAA--TAYGGCCRAAAAT-----GCCAAAAATTCGSSTTCCGGGGSGGRAAC--	<i>Leishmania major</i> (X2316) kinetoplast DNA	57%	3E-21	95%	Z32842.1
Bolita_2_1395_D02	Dog	CTITTCGGTCCCAGGGGTAGGGGCGTYYTGCGAAAWTCGAAAAWGGGWGCMGRAATCCCGTTCAA AA--AGGCCAAAAAT-----CCAAAAATTSGG--YTTCCGGGGCGGAAST--	<i>Leishmania infantum</i> kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 592	98%	3E-23	85%	AJ275335.1

## 6 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Os resultados desta Tese, referentes aos objetivos específicos 3 à 7, estão apresentados sob a forma de artigo científico publicado (DOI - <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2108-1>) no periódico *BMC Veterinary Research* (ISSN: 1746-6148), Qualis Capes B2 na área CBII. As seções Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Referências encontram-se no artigo a seguir.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations in a canine visceral leishmaniosis transmission area



Taiane Acunha Escobar<sup>1\*</sup> , Gabriela Dowich<sup>2</sup>, Thália Pacheco dos Santos<sup>3</sup>, Luísa Zuravski<sup>1</sup>, Claudia Acosta Duarte<sup>4</sup>, Irina Lübeck<sup>4</sup> and Vanusa Manfredini<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Leishmaniosis, zoonosis that produces significant public health impacts, is caused by *Leishmania infantum*. Canines are the main domestic reservoir and, besides humans, other species of mammals could be infected when living in endemic areas. In this study, we detected equine *Leishmania infantum* infections in a canine visceral leishmaniosis transmission area and evaluated the clinical, haematological, biochemical and oxidative stress disorders. This study was conducted in Uruguaiana, Rio Grande do Sul, south of Brazil. Peripheral blood samples were collected from 124 animals (98 horses and 26 dogs) of both genders and several breeds after they underwent general and dermatologic examinations.

**Results:** Twenty five *Leishmania infantum* infected animals (20.16%), 14 horses and 11 dogs were detected by PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of kinetoplast DNA regions with 96% homology to *Leishmania infantum* (GenBank Accession No. L 19877.1). The clinical and haematological alterations of infected equines were skin lesions, nodules, lymphadenopathy, decreased levels in red blood cells and haematocrit ( $p < 0.05$ ) and increase in urea serum concentration ( $p < 0.05$ ), while CVL presented a decrease in red blood cells counts ( $p < 0.05$ ), increase in lymphocytes ( $p < 0.05$ ), and decrease in neutrophil-lymphocyte ratio ( $p < 0.05$ ). Oxidative stress markers of plasma protein carbonyl and plasma lipid peroxidation were not statistically significant ( $p > 0.05$ ) in both species.

**Conclusions:** To our knowledge, this has been the first leishmaniosis equine survey performed in south of Brazil, caused by *Leishmania infantum* that were able to initially identify haematological and biochemical changes in the species, even in asymptomatic animals. We present evidence supporting those findings of haematological and biochemical changes could be related to infection. Surprisingly, the clinical manifestations of equine infection were similar to those found in canine visceral leishmaniosis. The equine population could be play an important role in the cycle of leishmaniosis in south Brazil and consequently indicates a great risk of public health. This evaluation of infected animals is important to establish the clinical and laboratory parameters involved in the disease progression.

**Keywords:** PCR, Diagnosis, Clinical valuation, Haematology, Biochemical analysis, Horse, Dog

## Background

Leishmaniosis is a zoonotic disease distributed globally, capable of causing significant impacts on public health. It has high lethality if untreated, as well as impossibility of vector eradication and consequently, a proven trend of expansion [1]. Visceral leishmaniosis (VL) is caused

by *Leishmania infantum* protozoa and affects humans, as well as domestic dogs, which are the main reservoir of this infection [2]. Currently, the disease is widespread throughout Brazil. The disease was not endemic in Rio Grande do Sul until 2008 when the first canine case was diagnosed. Since then, seven municipalities on the cross border with Argentina, neighbouring country, including São Borja and Uruguaiana cities were transmission areas for CVL with the vector *Lutzomyia longipalpis* has been reported [3, 4].

\* Correspondence: [taianeescobar@hotmail.com](mailto:taianeescobar@hotmail.com)

<sup>1</sup>Biochemistry Postgraduate Program, Federal University of Pampa, 118 BR 472, Uruguaiana, Rio Grande do Sul Km 592, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



In view of epidemiological situation at the western border of the state of Rio Grande do Sul, the identification of possible host species of leishmaniosis is a challenging and necessary task, since it is known that besides dogs, dozens of wild and domestic mammals, including equines, have already been identified to carry the infection in other regions [5–7]. The challenge is due to the variability of clinical signs in animals, in addition to the large number of asymptomatic individuals. In China, asymptomatic sheep infected with *Leishmania infantum* were suggested to contribute to VL transmission [8].

Evidences of horses residing in endemic areas for canine visceral leishmaniosis (CVL) and human visceral leishmaniosis (HVL) were susceptible to become infected with *Leishmania infantum*, only reinforce the importance of researching species that act as a food source for vectors or participants in the epidemiological chain [9]. Equine infection by the protozoan *Leishmania infantum* has been reported in South America and Europe [6, 10–12]. Unlike standardized human and canine diagnosis, parasitological, molecular and serological tests are used for the detection in other species, added to the clinical evaluation of the individual [6, 13, 14]. Besides, the disease in horses, can cause clinical manifestations (nodules, skin lesions), it can be spontaneously cured, or the host immune system can developing different mechanisms to evade or modulate the immune response keeping the host asymptomatic and hindering initial clinical evaluation and suspicion of infection [11, 12, 15, 16].

Haematological and biochemical markers of CVL have been identified [17, 18] however, it remains unclear at what extent the occurrence of clinical signs and variations in laboratory parameters can occur in horses. In this way, complementary tests can be used associated with diagnostic techniques, in order to secure more accurate diagnosis of the disease while providing a view of the individual's condition at the moment of collection.

In Rio Grande do Sul state, south of Brazil, the western border region, the use of draft horses for agricultural, farming and transportation activities are common. In this transmission area for CVL, horses living in close contact with humans and dogs, especially in the urban area, can participate in the transmission cycle through interaction with vectors. Because, they are excellent attractions and blood supply for the feeding of sand flies, thus stimulating the proliferation of these vectors [19]. There have been reports of infection in horses from endemic areas in other regions of the world, presumably because they are in contact with domestic reservoirs and vectors [13, 16, 20].

*Leishmania infantum* is not only pathogenic for animals, causes a serious disease in humans too, for this reason, its important pay attention for the occurrence of infection in potential reservoirs, especially in CVL endemic

and transmission areas. The incidence rates of leishmaniosis in the human and canine population in the Rio Grande do Sul western border evidences the urgent need to investigate the infection in horses. Due to the lack of information, that guided the research, the aims were evaluating the presence of clinical signs, haematological, biochemical and oxidative stress disorders that may be present in equines infected by *Leishmania infantum* in a CVL transmission area.

## Results

This study evaluated the clinical signs, haematological, biochemical and oxidative stress of 124 animals (98 horses and 26 dogs) of both genders and several breeds, from a CVL transmission area in the south of Brazil. The animals tested in this experiment, lived in areas with large amounts of organic matter, such as landfill sites, where there were substrates necessary for the multiplication of leishmaniosis vector. The draft horses generally slept in the backyards of residences, belonging to socio-economically deprived communities in semi-urban areas. Owners of 30 horses reported some previous diseases or clinical signs, the main complaints were: alopecia in different regions of the body and nasal discharge. One animal had ataxia and another had torticollis, four females were pregnant at the time of collection.

The PCR results, of kinetoplast DNA gene markers, revealing a detection of *Leishmania* amplicons in 20.16% samples. The direct sequencing fragments performed to confirm the identity of protozoan species in these samples showed 96% homology to the *Leishmania infantum* (GenBank Accession No. AF103741.1). The percent of *Leishmania infantum* infected horses were 14.3%, 14 animals among 98 of total equine population of the study. The molecular diagnosis of CVL showed 42.3% of infected dogs (11 animals) living in the same areas of infected horses.

Equine population was composed by 43 males (aged 0.5–24 years) and 55 females (aged 0.5–27 years). According to sex, the female *Leishmania infantum* infected equines were 64.3%, whereas the male rate *Leishmania infantum* infected equines was 35.7%. In the canine population, compound by 13 males and 13 females, the highest prevalence of CVL were recorded in females with 81.8% ( $p < 0.05$ ).

Five infected equines were symptomatic (SyE), the clinical alterations were skin lesions ( $n = 3$ ), nodules ( $n = 1$ ), lymphadenopathy ( $n = 1$ ) (see Table 1) and nine infected animals were without of clinical signs (AE). In CVL, five infected dogs were SyD and six were AD, in addition, the SyD group presented conjunctivitis. The clinical signs frequency of *Leishmania infantum* infected and control groups did not shows differences, most of evaluated animals were not dehydrated (Table 1).

**Table 1** Clinical signs frequency of control group and *Leishmania infantum* infected group by Chi-square test

	Control Group (N/%)	<i>Leishmania infantum</i> Infected Group (N/%)	<i>p</i> -value
Equine Samples Parameters			
Low Body mass ( <i>n</i> = 46)	14 (30.43)	3 (6.52)	1.00
Skin lesions ( <i>n</i> = 98)	15 (15.30)	3 (3.06)	1.00
Lymphadenopathy ( <i>n</i> = 98)	2 (2.04)	1 (1.02)	0.90
Dehydration ( <i>n</i> = 46)	4 (8.69)	0 (0)	0.97
Eyes pale mucous membrane ( <i>n</i> = 55)	13 (23.63)	1 (1.81)	0.40
Oral pale mucous membrane ( <i>n</i> = 45)	2 (4.44)	0 (0)	1.00
Canine Samples Parameters			
Low Body mass ( <i>n</i> = 25)	5 (20)	5 (20)	0.67
Skin lesions ( <i>n</i> = 26)	3 (11.53)	2 (7.69)	1.00
Eyes pale mucous membrane ( <i>n</i> = 24)	6 (25)	3 (12.50)	1.00

Due to the lack of adequate structure for the animal's containment, in some occasions, the clinical evaluation and parametric indices were performed on as many animals as possible (Table 1), as well as to some laboratory analyses due to the obtaining of little biological material at the time of collection.

The parametric indices of equine infected group show an increase of HR (heart rate) while in the canine specie the only change was body temperature (Table 2).

Results from equine haematological analysis, in see Table 3, revealed that the number of RBC and HCT were shorter in infected group than the CE group ( $p < 0.05$ ). While in both groups MCV and MCHC values were acceptable. The granulocyte absolute counts (eosinophil and basophil) and monocytes

values were acceptable in both groups, although neutrophil showed an decrease values in *Leishmania infantum* infected group ( $p < 0.05$ ) and relative basophils had an increase in this group ( $p < 0.05$ ). The same change in RBC rates was observed in the canine specie ( $p < 0.05$ ). The PLR values were shorter ( $p < 0.05$ ) and the lymphocytes (absolute and relative) were higher in ( $p < 0.05$ ) canine infected group (see Table 3).

The equine biochemical profile results of urea serum concentration were significantly increasing ( $p < 0.05$ ) in *Leishmania infantum* infected group. This biochemical disorder was the only one found in the infected group. Mean values of hepatic enzymes (AST, GGT) were in agreement with the reference

**Table 2** Comparison between parametric indices of control group and *Leishmania infantum* infected equines and canines

	Control Group ( $\bar{X} \pm SD$ )	<i>Leishmania infantum</i> Infected Group ( $\bar{X} \pm SD$ )	<i>p</i> -value
Equine Samples Parameters			
CRT ( <i>n</i> = 83)	1.89 ± 0.43	2.00 ± 0.00	0.36 <sup>b</sup>
RR ( <i>n</i> = 94)	21.59 ± 10.86	18.15 ± 5.50	0.30 <sup>b</sup>
HR ( <i>n</i> = 95)	44.10 ± 13.74	49.23 ± 9.67	0.05 <sup>b*</sup>
BT ( <i>n</i> = 81)	36.97 ± 0.95	37.06 ± 0.76	0.74 <sup>a</sup>
Canine Samples Parameters			
CRT ( <i>n</i> = 16)	1.75 ± 0.46	1.88 ± 0.64	0.69 <sup>b</sup>
RR ( <i>n</i> = 24)	35.20 ± 33.94	28.44 ± 9.26	0.85 <sup>b</sup>
HR ( <i>n</i> = 25)	102.40 ± 34.46	102.40 ± 20.93	1.00 <sup>a</sup>
BT ( <i>n</i> = 23)	38.73 ± 0.39	38.35 ± 0.23	0.00 <sup>b*</sup>

$\bar{X}$  Mean, *SD* Standard Deviation; \*The difference was considered significant when *P* value less than 0.05; <sup>a</sup> Student T test; <sup>b</sup> Wilcoxon test; CRT Capillary Refill Time, RR Respiratory Rate, HR Heart Rate, BT Body Temperature

**Table 3** Haematological profile in control group and *Leishmania infantum* infected equines and canines

	Control Group (X±SD)	Infected Group (X±SD)	p-value	Control Group (X±SD)	Infected Group (X±SD)	p-value
	Equine Samples			Canine Samples		
RBC (x10 <sup>6</sup> cells/μL)	7.51 ± 1.26	6.69 ± 1.58	0.03 <sup>a*</sup>	5.75 ± 0.98	4.90 ± 0.81	0.02 <sup>a*</sup>
HCT (%)	36.76 ± 5.52	32.47 ± 7.11	0.01 <sup>a*</sup>	38.47 ± 7.02	33.38 ± 6.03	0.06 <sup>a</sup>
Hb (g/dl)	12.48 ± 1.81	11.21 ± 2.32	0.09 <sup>b</sup>	13.00 ± 2.86	11.33 ± 2.20	0.12 <sup>a</sup>
MCV (fl)	49.17 ± 3.35	49.10 ± 5.01	0.86 <sup>a</sup>	66.84 ± 3.71	67.99 ± 4.07	0.37 <sup>b</sup>
MCHC (g/dl)	34.01 ± 1.27	34.69 ± 1.30	0.06 <sup>b</sup>	33.60 ± 2.03	33.90 ± 1.34	0.24 <sup>a</sup>
PLT (x10 <sup>3</sup> cells/μL)	163.51 ± 119.58	145.50 ± 72.07	0.81 <sup>b</sup>	169.30 ± 101.58	186.45 ± 139.86	0.78 <sup>a</sup>
WBC (x10 <sup>3</sup> cells/μL)	11.88 ± 3.27	11.23 ± 3.87	0.36 <sup>a</sup>	13.87 ± 5.00	18.57 ± 8.22	0.83 <sup>a</sup>
Absolute Neutrophils Rods (cells/μL)	340.48 ± 353.79	288.43 ± 229.50	0.72 <sup>b</sup>	1.764 ± 2.205	2.231 ± 1.220	0.09 <sup>a</sup>
Relative Neutrophils Rods (%)	2.99 ± 3.07	2.71 ± 2.40	0.99 <sup>b</sup>	11.73 ± 10.97	13.18 ± 7.44	0.30 <sup>a</sup>
Absolute Neutrophils (cells/μL)	6.118 ± 2.171	4.774 ± 1.598	0.01 <sup>a*</sup>	7.370 ± 2.972	8.768 ± 5.270	0.44 <sup>a</sup>
Relative Neutrophils (%)	51.61 ± 10.42	45.29 ± 14.24	0.11 <sup>b</sup>	54.47 ± 18.18	44.27 ± 12.15	0.12 <sup>a</sup>
Absolute Eosinophils (cells/μL)	460.75 ± 319.31	433.07 ± 372.51	0.55 <sup>b</sup>	395.33 ± 499.66	511.82 ± 687.42	0.73 <sup>b</sup>
Relative Eosinophils (%)	4.14 ± 3.08	4.07 ± 3.47	0.83 <sup>b</sup>	2.80 ± 3.52	2.64 ± 2.76	0.81 <sup>b</sup>
Absolute Basophils (cells/μL)	95.61 ± 137.59	148.64 ± 161.38	0.09 <sup>b</sup>	96.80 ± 195.41	126.45 ± 170.93	0.49 <sup>b</sup>
Relative Basophils (%)	0.80 ± 1.07	1.21 ± 0.89	0.05 <sup>b*</sup>	0.80 ± 1.82	1.00 ± 1.41	0.47 <sup>b</sup>
Absolute Lymphocytes (cells/μL)	4.444 ± 1.969	5.290 ± 3.543	0.42 <sup>a</sup>	3.148 ± 2.093	5.728 ± 2.531	0.00 <sup>a*</sup>
Relative Lymphocytes (%)	36.99 ± 10.78	44.36 ± 14.48	0.08 <sup>b</sup>	22.20 ± 10.97	33.36 ± 12.16	0.02 <sup>a*</sup>
Absolute Monocytes (cells/μL)	410.63 ± 366.48	300.71 ± 316.82	0.20 <sup>b</sup>	1.097 ± 909.43	1.207 ± 1.381	0.81 <sup>a</sup>
Relative Monocytes (%)	3.31 ± 2.66	2.36 ± 2.13	0.24 <sup>b</sup>	13.33 ± 21.77	5.55 ± 4.54	0.20 <sup>a</sup>
PLR	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.62 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.11	0.03 ± 0.02	0.04 <sup>b*</sup>
NLR	1.68 ± 0.79	1.30 ± 0.78	0.10 <sup>a</sup>	4.78 ± 5.22	2.09 ± 1.13	0.06 <sup>b</sup>

X Mean, SD Standard Deviation; \*The difference was considered significant when P value less than 0.05; <sup>a</sup> Student T test; <sup>b</sup> Wilcoxon test; Reference values for equine specie: RBC: 6.5-12.5; HCT: 32-52; Hb: 11-19; MCV: 34-58; MCHC: 31-37; PLT: 100-600; WBC: 5.5-12.5; Neutrophils Rods: 0-100; Neutrophils: 2.700-6.700; Eosinophil: 0-925; Basophil: 0-170; Lymphocytes: 1.500-5.500; Monocytes: 0-800; Reference values for canine specie: RBC: 5.5-8.5; HCT: 37-50; Hb: 12-18; MCV: 60-67; MCHC: 32-37; PLT: 200-500; WBC: 6-17; Neutrophils Rods: 0-300; Neutrophils: 3.000-11.500; Eosinophil: 150-1.250; Basophil: 0-200; Lymphocytes: 1.000-4.800; Monocytes: 150-1.350

values for the specie and total protein in both groups were higher than reference limits, although there was no statistical difference in the comparison between them (see Table 4). In the canine species we did not found significant changes in biochemical parameters in infected animals (see Table 4).

The results reported of means ± SD for oxidative stress markers carbonyl levels and TBARS of were not statistically significant ( $p > 0.05$ ) in both equine and canine species (Fig. 1).

## Discussion

The study revealed *Leishmania infantum* infection in the equine species of Uruguaiana municipality's semi-urban regions as a new transmission CVL area in the south of Brazil where they were exposed to the vector and mainly inhabiting the same places as infected canines.

These results agreed with findings of reported infected horses in different endemic areas around the world,

including southeast Brazil [12]. Confirmation of *Leishmania infantum* equine infection in this region showed the urgency and importance of investigating this animal species, taking them into account as a mean of transportation (people and cargo) that circulates throughout the city at any given time of the day. From these findings we must evaluate the equines' interaction with the vector species, even the degree of involvement of equines in the transmission to other hosts which has yet not been defined as a possible reservoir. They can also attract the vectors [16] and might guarantee their maintenance through the females feeding, contributing to the increasing incidence of *Leishmania infantum*. On the other hand, dogs, confirmed as domestic reservoirs, usually remain restricted to smaller regions of town. They do not cross the urban and semi-urban perimeter like the horses.

The CVL clinically displays a wide range of nonspecific symptoms, including skin lesions, which are present in

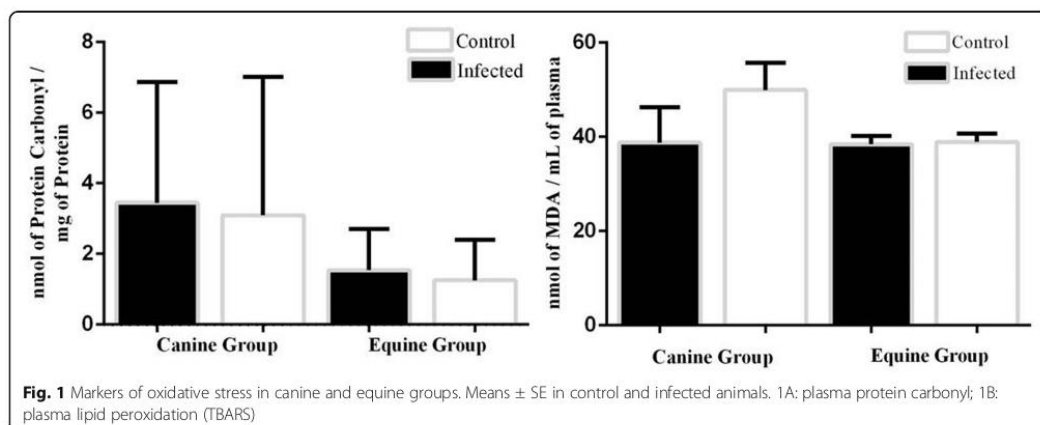
**Table 4** Biochemical profile in control group and *Leishmania infantum* infected equines and canines

	Control Group (X±SD)	Infected Group (X±SD)	<i>p</i> -value	Control Group (X±SD)	Infected Group (X±SD)	<i>p</i> -value
	Equine Samples			Canine Samples		
AST (U/L)	243.60 ± 129.49	218.64 ± 46.41	0.55 <sup>b</sup>	7.83 ± 3.86	12.71 ± 9.19	0.28 <sup>a</sup>
GGT (U/L)	20.77 ± 12.49	15.91 ± 4.94	0.30 <sup>b</sup>	5.57 ± 2.07	6.17 ± 3.06	0.68 <sup>a</sup>
Creatinine (mg/dL)	1.20 ± 0.26	1.22 ± 0.31	0.96 <sup>b</sup>	1.14 ± 0.25	1.15 ± 0.53	0.95 <sup>a</sup>
Urea (mg/dL)	48.31 ± 11.46	57.52 ± 13.61	0.01 <sup>a*</sup>	24.00 ± 2.12	28.04 ± 19.90	0.96 <sup>a</sup>
Total Protein (g/dl)	9.82 ± 0.99	9.35 ± 0.97	0.14 <sup>a</sup>	6.55 ± 0.94	7.16 ± 0.99	0.22 <sup>a</sup>
CK (U/L)	387.85 ± 212.38	365.91 ± 171.44	0.87 <sup>b</sup>	-	-	
ALB (g/dl)	4.08 ± 0.49	4.06 ± 0.50	0.91 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.50	2.27 ± 0.37	0.23 <sup>a</sup>
Globulin (g/dl)	5.73 ± 1.21	5.29 ± 1.16	0.28 <sup>b</sup>	3.99 ± 1.31	4.98 ± 1.29	0.16 <sup>a</sup>
Gamma Globulin	18.81 ± 3.81	19.35 ± 4.89	0.67 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.41	1.61 ± 0.92	0.31 <sup>a</sup>
A/G	0.75 ± 0.22	0.63 ± 0.22	0.29 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.42	0.49 ± 0.18	0.17 <sup>a</sup>

X Mean, SD Standard Deviation; \*The difference was considered significant when *P* value less than 0.05; <sup>a</sup> Student T test; <sup>b</sup> Wilcoxon test. Reference values for equine specie; AST: 120-480; GGT: 10-62; Creatinine: 0.96-1.3; Urea: 21.6-51; Total Protein: 5.8-8.7; CK: 40-280; ALB: 2.6 - 3.8; Globulin: 2.5 - 4.1; Gglobulin: No reference values were found in the literature. A/G: 0.5-1.7; Reference values for canine specie; AST: 23-66; GGT: 1.2-6.4; Creatinine: 0.5-1.5; Urea: 15-65; Total Protein: 5.4-7.1; ALB: 2.6 - 3.3; Globulin: 2.5 - 4.1; Gglobulin: 0.8-1.8; A/G: 0.5-1.7

most clinical cases [6], apathy, weight loss, enlarged lymph nodes, hepatomegaly, splenomegaly, and others [21]. Tegment and ocular signs, such as alopecia, hypotrichosis, exfoliate dermatitis, cutaneous and mucocutaneous ulcers, crusted scars, and onychogryphosis were recorded too [22]. We evaluated horses in an attempt to identify changes similar to those found in CVL. The cases described here, showed that the majority of the infected equines were without clinical signs, although SyE infected animals presented some apparent signs such as: skin lesions, nodules and lymphadenopathy, similar to clinical signs detected in dogs from the same areas. The clinical signs of leishmaniosis caused by *L. infantum* in horses had been described like temporary signs, which

included nodules of variable size, in sometimes covered by eroded or ulcerated epidermis [10, 12, 15]. Healthy infected equines were reported in north Portugal and Spain [20, 23]. The absence of clinical changes in equine infection were related to a possible immunological ability to reduce parasitic load or which may be associated with this pattern of temporary signs that the animals present [6, 19]. Prevalence of equine subclinical *Leishmania infantum* infection, in endemic areas, is considerably higher than that the disease, as observed in other animals, cats and dogs [23, 24]. The ratios of symptomatic and asymptomatic dogs were similar, which requires a careful attention because it is a transmission area and little is studied about the dynamics of the disease in



reservoirs and possible hosts, especially in regions, such as the one in the study, which dogs have close contact with horses.

Assessments of clinical and physical examination did not show signs and alterations in the infected animals except for HR that increased in infected group, but cannot be attributed only to *Leishmania infantum* infection, due to the physiological interference caused by the effort in this index which may possibly have occurred due to the short time interval between waiting for clinical examination or even the activities performed by these animals. Studies of infection in horses reported only the clinical changes caused by lesions, nodules and ulcers [12, 14, 19]. Alterations in parametric indices were not reported yet, so with this first finding of cardiac abnormality, we need to investigate the infected group to see if this change can be predictive of infection. Contrariwise, the evaluated dogs did not present this alteration.

Although several influencing factors in these animals, such as nutritional deficiency, stress due to heavy work, precarious conditions of animal health, it was possible evidence some indicative changes of the infection in haematological and biochemical tests. RBC and HCT decreased in equine infected group, as has been previously described in equine piroplasmiasis, another disease caused by two protozoans (*Theileria equi* and *Babesia caballi*) in Egypt populations [25]. Perhaps protozoan's infection in equines may present the same pattern of haematological disorders. Similarly, the canine infected group presented anaemia. In CVL, Alterations in laboratory parameters, particularly haematological, often reveal normocytic anaemia, thrombocytopenia [26].

A significant reduction in neutrophils was observed in equine infected group concomitant with uraemia. Neutrophils are the main effector cells in mammalian innate immunity; parasites like *Leishmania infantum* can modify the oxidative metabolism and causes apoptosis of neutrophils according to disease stage. In very severe stage of CVL, were observed decrease superoxide production and increased apoptosis associated with uraemia [27]. Because little is known about haematological changes in equine infection, it is not possible infer these findings at a severe stage of the infection, like in dogs. However, there are indications that at this stage in which animals were investigated, apoptosis of neutrophils could explain these reductions.

In humans, uraemia increases the rate of spontaneous neutrophil apoptosis [28], as well, the higher rate of spontaneous apoptosis and lower spontaneous viability of neutrophils in uremic groups are similar to previous studies in dogs [29, 30], similar to changes that we found in horses.

Deranged haematological and biochemical parameters is a feature of VL in humans [31], that can be used as an aid in HVL diagnosis and treatment. In CVL has found haematological, biochemical and oxidative markers, as well [29, 32]. In addition, the spread of infection in other species requires detailed scientific investigation to know the dynamics of the disease. We started with this study the identification of these alterations in equines to find establish prognostic biomarkers that could facilitate diagnosis, prophylactic and therapeutic procedures, since as in the other mammalian species, in the equines also there is a great variation of clinical signs and the possibility of not presenting any sign either.

Oxidative stress has been attributed to several parasitic diseases in the canine species, including infections caused by *Leishmania infantum* [29, 32]. It was not possible identify changes in oxidative stress markers levels in analysed groups, however, it's a clear limitation of the present study, because these parameters are difficult to assess when it comes to samples from uncontrolled individuals, and especially when they are under adverse conditions of nutritional, hydration and physiological status.

As expected, was found a higher level of infection in dogs, in comparison with equine specie, since the region is a potential CVL transmission area and the main reservoir was in contact with vectors and other mammals. In Paraná state, Brazil, another study showed a similar rate of *Leishmania braziliensis* (16.6%) infection in horses by PCR diagnosis [13]. The characterization of populations of infected dogs is important to identify the main parameters associated with the development of VL [17, 33], attending as an initial parameters for the investigation of the VL development in other mammalian species.

Results of sequencing kDNA regions indicate the presence of *Leishmania infantum*, in Blast search, the sequences finds regions of similarity between biological sequences of *Leishmania infantum* infecting horses and dogs in this CVL transmission area. The infection of *L. infantum* was been reported in Europe [10, 11, 14, 15], in Brazil, the infection in horses have been identified as well [12]. The European [14, 15, 20, 23] and Brazilian reports of VL infection in horses in are restricted to serological and molecular evaluation, without evidences of haematological, biochemical and oxidative stress changes in this specie [12, 16].

## Conclusions

Our results showed the occurrence of infection by *Leishmania infantum* through molecular diagnosis in 14.3% equines and in 42.5% canines. Surprisingly, the clinical manifestations of equine infection were similar to those found in CVL. We present evidence supporting those

values of HCT, RCB, neutrophil and urea changes in the equine species that could be related to infection. These results may aid in the identification of infected horses in endemic areas or in the transmission of CVL. It is suggested that the infected animals have a clinical follow-up during as well as the control of parasite load to assess whether haematological changes and identify which lymphocytes are acting on the immune response of the infection in order to relate to the absence of clinical signs. This evaluation of infected animals is important to establish the clinical and laboratory parameters involved in the evolution of the disease. To our knowledge, this has been the first leishmaniosis equine survey performed in south Brazil, caused by *Leishmania infantum* that were able to initially identify haematological and biochemical changes in the species, even in asymptomatic animals.

## Methods

### Study population

Ninety-eight mixed-breed equines and 26 canines of both genders were enrolled in the study. All the animals came from Uruguaiana municipality (29° 44' 58" S and 57° 5' 18" W), south of Brazil [1], which is a transmission area for VL and CVL. The collections on the individually-owned animals were carried out from November 2016 to September 2017. The subjects (equines and canines) were tested simultaneously in order to obtain a sample of animals living in the same environment, including the same owner, whenever possible. These animal samples were collected in residences of urban and semi-urban areas, whose volunteer owners used those horses as mean of transportation of people and cargo. After blood collection, the animals received an application of dewormer and were returned to their guardians.

Since the clinical signs, haematological, biochemical and oxidative stress alterations in CVL were described in other regions of Brazil, the canine specie was included to allow mean comparisons with the equine infection. The experiment started with animal's anamnesis, the owners were asked about the place where the animals lived, the purpose of using the horses, as well as their health history, age and gender. At the time of collection, horses and dogs were submitted to general clinical evaluation to verify presence of skin and lymph node changes, body condition, hydration status, and physical examination (mucosal evaluation, capillary filling time, respiratory rate, heart rate and body temperature). Infected dogs were clinically classified as symptomatic (SyD) and asymptomatic (AD) according to the presence or absence of canine leishmaniosis signs (skin lesions, nodules, lymphadenopathy and conjunctivitis). Non-infected dogs were considered as control group

(CD). The infected equines were classified with the same criteria, symptomatic equine (SyE), asymptomatic equine (AE) and non-infected group was named Control Equine (CE).

### Biological samples

The blood collection was by venepuncture of the external jugular, after carefully antiseptics, with anticoagulant EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) for molecular (PCR - Polymerase Chain Reaction) and haematological analyses and without anticoagulant for biochemical and oxidative stress analyses. The anticoagulant samples were frozen until the time of analyses and the samples without anticoagulant were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and the serum frozen in aliquots.

### Molecular diagnosis

DNA from blood samples and from promastigotes of *L. (L.) infantum chagasi* (MOHM/BR/1974/PP75) was extracted using the technique by salting out [34], the volume of blood (300 µL) was standardized. The DNA purified was submitted to PCR using primers for *Leishmania infantum* that had been designed to amplify a 145 bp fragment of the conserved region of kinetoplast DNA minicircles (kDNA) [18]. Reaction mixtures were prepared in a final volume of 25 µL, containing 8 µL de DNA template, 200 µM dNTP (deoxynucleotide) (Promega, Madison, EUA), 10 pmol of each primer (IDT, Coralville, EUA), 1x buffer solution, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Waltham, USA) and 8 µL of ultrapure water. The amplification conditions were as follows by Almeida et al. (2013) [18]. DNA of *L. (L.) infantum chagasi* (MOHM/BR/1974/PP75) kindly provided by *Leishmania* collection of the Oswaldo Cruz Institute (CLIOC - FIOCRUZ), was used as a positive control, while deionized water was used as a negative control for all molecular techniques. The amplicons were examined through electrophoresis on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized on an AlphaImager gel documentation system with UV light.

The molecular diagnosis of infection in equine and canine samples was confirmed by direct sequencing fragments of *Leishmania* parasites, performed by an automated sequencer *ABI-Prism 3500 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, USA), after purification of amplified PCR fragments with the *Purelink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification kit* (Invitrogen, USA).

### Haematological, biochemical and oxidative stress analyses

The parameters evaluated in haemogram included Erythrogram: red blood cell count (RBC), haematocrit (HCT), haemoglobin (Hb) concentration and red cell

indices; mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) platelet count (PLT); Leukogram: white blood cell count (WBC), granulocytes (Neutrophils, Eosinophils, Basophils); lymphocytes, monocytes, platelet-lymphocyte ratio (PLR) and neutrophil-lymphocyte ratio (NLR). Complete blood counts were performed by an automatic cell counter (Sysmex KX-21 N, Roche\*) followed by differential count and platelet count blade using the Quick Panoptic kit.

Furthermore, in vitro biochemical diagnostics were performed using an automatic biochemistry analyser (Wiener CM 200) Specific commercial kits (Bioclin - Quibasa) were used according to the manufacturers of hepatic enzymes: aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyltransferase (GGT); renal enzymes: creatinine and urea; total protein, creatine kinase (CK), albumin (ALB), globulin, gamma globulin and albumin globulin ratio (A/G).

Oxidative stress markers were quantified by plasma protein carbonyl [35, 36] and plasma lipid peroxidation-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [37]. All analyses were performed in duplicates.

#### Statistical analyses

Animals were divided into *Leishmania infantum* infected Group and Control Group, as the results of PCR, for the statistical analyses. The values are expressed as mean  $\pm$  SD for the *Leishmania infantum* infected Group and the Control Group separately. The quantitative variables were submitted to the normality test, Shapiro-Wilk test was used for canine samples and Kolmogorov-Smirnov for equine samples. Student T test was applied to normal distribution variables and Wilcoxon test was applied for non-parametric variables after transformation by Log ( $x + 1$ ), both statistical tests were used to evaluate differences between independent groups. The dichotomous variables were evaluated by frequency dispersion and submitted to the Chi-square test (low body mass, skin lesions, lymphadenopathy, dehydration, yes and oral pale mucous membrane changes, gender). Data were analysed using the SPSS® for Windows computing program, significance was set at  $p$ -value  $< 0.05$ .

#### Abbreviations

A/G: Albumin globulin ratio; AD: Asymptomatic dogs; AE: Asymptomatic equine; ALB: Albumin; AST: Aspartate aminotransferase; BT: Body temperature; CD: Control dogs; CE: Control equine; CEUA: Ethics Committee on Animal Use; CK: Creatine kinase; CRT: Capillary refill time; CVL: Canine visceral leishmaniasis; dNTP: Deoxynucleotide; EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid; GGT: Gamma glutamyltransferase; Hb: Haemoglobin; HCT: Haematocrit; HR: Heart rate; HVL: Human visceral leishmaniasis; kDNA: Kinetoplast DNA; MCHC: Mean corpuscular haemoglobin; MCV: Mean corpuscular volume; NLR: Neutrophil-lymphocyte ratio; PCR: Polymerase chain reaction; PLR: Platelet-lymphocyte ratio; PLT: Platelet; RBC: Red blood cell count; RR: Respiratory rate; SD: Standard deviations; SyD: Symptomatic

dogs; SyE: Symptomatic equine; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; VL: Visceral leishmaniasis; WBC: White blood cell

#### Acknowledgements

The authors wish to thank Equipampa Group for his support in the sampling and ACVET Laboratory of Federal University of Pampa for the supporting in biochemical analyses. Karen Saldanha da Silva Rocha is acknowledged for her help in text revision during the elaboration of the draft. We thank to Bioclin - Quibasa for the donation of the biochemical and haematological analysis kits and we thank to *Leishmania* collection of the Oswaldo Cruz Institute (CLIOC - FIOCRUZ) for kindly providing *Leishmania* reference strains.

#### Authors' contributions

TAE designed the study, extracted the DNA, performed the PCR and haematological tests, analysed the data and wrote the manuscript. GD, TPS, LZ, collected the blood samples, extracted the DNA and helped with PCR. CAD, IL designed the research, collected the blood samples, supervised the study, revised the manuscript, VM supervised the study, revised the manuscript. All the authors reviewed and approved the final version of the manuscript submitted to the journal.

#### Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 for PhD scholarship to T. A. Escobar and by Research Program for SUS: Shared Health Management - PPSUS; DECIT/SCTIE/MS, CNPq, FAPERGS and SES-RS (Nº 17/2551-001 405-7). The funders had no role in study design, data collection, analysis, the decision to publish or the preparation of the manuscript.

#### Availability of data and materials

The data involving in the manuscript can be obtained from the corresponding author upon reasonable request.

#### Ethics approval and consent to participate

The study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Brazilian national guidelines on animal experimentation [38]. The protocol was approved by the Federal University of Pampa Ethics Committee on Animal Use (CEUA - UNIPAMPA) permit number: CEUA- 016/2016. Oral consent was obtained from all equines and canines owners prior to sampling. Since this study did include only minimal animal invasive experiments, the CEUA (Ethics Committee on Animal Use) decided that no written approval was required from owners. Owners were informed that if they participate in the study they would allow the researchers to perform a complete physical and clinical examination and collection of biological samples such as blood and eye secretions for diagnosis of leishmaniasis. The participation in the study would not bring any legal complications and all information collected would be confidential. The owners would have no cost, nor receive any financial advantage. The telephone numbers of researchers were provided to clarify any doubts.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup>Biochemistry Postgraduate Program, Federal University of Pampa, 118 BR 472, Uruguaiana, Rio Grande do Sul Km 592, Brazil. <sup>2</sup>Animal Science, Postgraduate, Federal University of Pampa, 118 BR 472, Uruguaiana, Rio Grande do Sul Km 592, Brazil. <sup>3</sup>Pharmacy, Federal University of Pampa, 118 BR 472, Uruguaiana, Rio Grande do Sul Km 592, Brazil. <sup>4</sup>Veterinary Medicine, Federal University of Pampa, 118, BR 472, Uruguaiana, Rio Grande do Sul Km 592, Brazil.

Received: 23 April 2019 Accepted: 20 September 2019

Published online: 30 October 2019

#### References

1. Deboni SC, Barbosa M, Ramos RR. Leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul. In: Boletim Epidemiológico: Centro Estadual de Vigilância em Saúde.

- Secretaria de Saúde (BR); 2011. <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/27124724-n-1-marco.pdf>. Accessed 15 Mar 2019.
- Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014;6:147–54.
  - CEVRS - Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Nota Técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose visceral na Fronteira oeste do Estado Rio Grande do Sul com a Argentina. Porto Alegre: Centro Estadual de Vigilância em Saúde; 2010. 1
  - SES. Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul. Nota Técnica conjunta nº 01/2014 - CEVS-IPB-LACEN- SES/RS: Leishmaniose visceral no Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Secretaria de Saúde; 2014. 01
  - Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014;3(3):251–62.
  - Müller N, Hentrich B, Frey CF, Welle M. Quantitative PCR for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis from formalin-fixed and paraffin-embedded skin sections. *Mol Cell Probes*. 2015;29(6):507–10.
  - Rezende M, Herrera H, Carvalho C, Carvalho Anjos E, Ramos C, Araújo F, et al. Detection of *Leishmania* spp. in bats from an area of Brazil endemic for visceral leishmaniasis. *Transbound Emerg Dis*. 2017;64(6):36–42.
  - Han S, Wu W-P, Chen K, Osman I, Kiyim K, Zhao J, et al. Epidemiological survey of sheep as potential hosts for *Leishmania* in China. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):378.
  - Kouam MK, Diakou A, Kanzoura V, Papadopoulos E, Gajadhar AA, Theodoropoulos G. A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. *Vet Parasitol*. 2010;170(1):170–5.
  - Rolão N, Martins M, João A, Campino L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*. 2005;12(2):183–6.
  - Müller N, Welle M, Lobsiger L, Stoffel MH, Boghenbor KK, Hilbe M, et al. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Vet Parasitol*. 2009;166(3):346–51.
  - Soares JR, Silva SO, Moreira FM, Prado LG, Fantini P, Maranhão RdPA, et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol*. 2013;197(3–4):665–9.
  - Truppel JH, Otomura F, Teodoro U, Massafra R, da Costa-Ribeiro MCV, Catarino CM, et al. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? *PLoS One*. 2014;9(4):e93731.
  - Gama A, Elias J, Ribeiro AJ, Alegria N, Schallig HD, Silva F, et al. Cutaneous leishmaniasis in a horse from northern Portugal. *Vet Parasitol*. 2014;200(1):189–92.
  - Koehler K, Stechele M, Hetzel U, Domingo M, Schöhian G, Zahner H, et al. Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 2002;109(1):9–17.
  - Feitosa FLF, Leal J, Mendes LCN, Peiro JR, Perri SHV, VMFd L, et al. Estudo soroprevalência de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2012;49(6):500–2.
  - Freitas JCC, DCS N-P, Lopes Neto BE, GIL S, CRAd A, Braga RR, et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(1):24–9.
  - Almeida AB, Sousa VR, Gasparetto ND, da Silva GF, Figueiredo FB, Dutra V, et al. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76(3):321–4.
  - Cerqueira EJJ, Sherlock I, Gusmão A, Junior B, de Almeida A, Nakatani M. Experimental infection of *Equus asinus* with *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(6):695–701.
  - Lopes AP, Sousa S, Dubey J, Ribeiro AJ, Silvestre R, Cotovio M, et al. Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in horses from the north of Portugal. *Parasit Vectors*. 2013;6(1):178.
  - Barroso PA, Nevot MC, Hoyos CL, Locatelli FM, Lauthier JJ, Ruybal P, et al. Genetic and clinical characterization of canine leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* in northeastern Argentina. *Acta Trop*. 2015;150:218–23.
  - Lima IS, Silva JS, Almeida VA, FGL J, Souza PA, Laranjeira DF, et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. *PLoS One*. 2014;9(2):e87742.
  - Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Bardagi M, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol*. 2006;135(2):181–5.
  - Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet Parasitol*. 2010;174(1–2):37–42.
  - Mahmoud MS, El-Ezz NT, Abdel-Shafy S, Nassar SA, El Namaky AH, Khalil WK, et al. Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):260.
  - Abbehusen MMC, Almeida VdA, Solcá MdS, Pereira LdS, Costa DJ, Gil-Santana L, et al. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Sci Rep*. 2017;7(1):15914.
  - Almeida B, Narciso L, Bosco A, Pereira P, Braga E, Avanço S, et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2013;196(1–2):6–12.
  - Cohen G, Rudnicki M, Hörl WH. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. *Kidney Int Suppl*. 2001;59S48–52.
  - Almeida B, Narciso L, Melo L, Preve P, Bosco A, Lima VMF, et al. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. *Vet J*. 2013;198(3):599–605.
  - Silva ACRA, de Almeida BFM, Soeiro CS, Ferreira WL, de Lima VMF, Ciarlini PC. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. *Can J Vet Res*. 2013;77(2):136–41.
  - Sarkari B, Naraki T, Ghatee MA, Khabisi SA, Davami MH. Visceral leishmaniasis in southwestern Iran: a retrospective clinico-hematological analysis of 380 consecutive hospitalized cases (1999–2014). *PLoS One*. 2016;11(3):e0150406.
  - Torreilha R, Utsunomiya Y, Bosco A, Almeida B, Pereira P, Narciso L, et al. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev Vet Med*. 2016;132:83–7.
  - Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, MdG C, Mayrink W, et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol*. 2006;146(2):303–11.
  - Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.
  - Reznick A, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl. *Methods Enzymol*. 1994;233:357–63.
  - Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A-G, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464–78.
  - Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351–8.
  - Brazil. Law number 11.794/2008. Establish procedures for the scientific use for animals. *Union Official Diary (Brazil Federal Constitution)* s1.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)





### CAPÍTULO III

#### 7 DISCUSSÃO GERAL

Nas Américas, 11 espécies de *Leishmania* dermatrópicas causam doença em humanos e oito espécies acometem animais. A espécie *Leishmania infantum* é o agente etiológico da LV. No Brasil, até o momento, foram identificadas e isoladas sete espécies dermatrópicas e uma visceral (AKHOUNDI *et al.*, 2016; BRASIL, 2007; MAURICIO *et al.*, 1999).

A leishmaniose é investigada no sul do Brasil há mais de uma década, com relatos de casos de LVC nos territórios fronteiriços brasileiro e argentino. No Uruguai, foi descoberto um surto autóctone de LVC em 2015 (SALOMON *et al.*, 2008; DEBONI; BARBOSA; RAMOS, 2011; SATRAGNO *et al.*, 2017). Atualmente, existem registros de casos nos três países da região de fronteira e, no Rio Grande do Sul, os casos estão se expandindo para o centro do estado (CEVS, 2019). Devido ao intenso tráfego de pessoas e animais nessa região de fronteira, faz-se necessário identificar as espécies em circulação e outros hospedeiros mamíferos no ciclo epidemiológico.

A escolha da população de estudo ocorreu devido à necessidade de identificação de possíveis hospedeiros capazes de se infectar com o parasito em regiões endêmicas para LVC. Somada a uma característica regional e cultural, na qual a espécie equina é comumente utilizada em diversas atividades econômicas com intensa circulação na zona urbana e periurbana, além do contato com outros animais, incluindo os reservatórios da leishmaniose e os seres humanos. Em contrapartida, todas as etapas do experimento foram desenvolvidas também com cães, além dos equinos, com intuito de se manter um parâmetro para os resultados encontrados, já que esta espécie é amplamente estudada.

O estudo revelou a infecção por *Leishmania infantum* na espécie equina das regiões periurbanas do município de Uruguaiana, nova área de transmissão da LVC no sul do Brasil, os quais foram expostos ao vetor e habitavam, principalmente, os mesmos locais dos cães infectados. Os resultados encontrados neste trabalho concordaram com os relatos de equinos infectados em diferentes áreas endêmicas em todo o mundo, incluindo o sudeste do Brasil (SOARES *et al.*, 2013). A confirmação da infecção por *Leishmania infantum* em equinos nesta região revelou a urgência e a importância de investigação, levando em consideração que esses animais são usados como meio de transporte (pessoas e carga), que circulam pela cidade a qualquer hora do dia. Por outro lado, os cães, confirmados como reservatórios domésticos, geralmente permanecem restritos a regiões menores da cidade. Eles não circulam por todo perímetro urbano e periurbano como os equinos.

Foram encontradas amostras infectadas por *Leishmania* sp. em cães e equinos por métodos moleculares com dois alvos distintos: as sequências parciais de ITS 2 e kDNA, com a intenção de se obter um diagnóstico mais preciso. As ferramentas moleculares foram eficazes para detectar LVC e a infecção em equinos no município de Uruguaiana, Brasil. Como esperado, foi encontrada uma taxa de infecção maior em cães, em comparação com a espécie equina, uma vez que a região é uma área potencial de transmissão de LVC e o principal reservatório está em contato com vetores e outros mamíferos.

A taxa de infecção em reservatórios domésticos no estudo foi maior do que a encontrada no país vizinho Uruguai (22%) considerando a mesma espécie (SATRAGNO *et al.*, 2017). Em equinos domiciliados na mesma região de cães positivos, foi observada uma taxa de infecção de 11,6%, semelhante ao observado no Paraná, Brasil, para a infecção por *Leishmania braziliensis* (16,6%) em equinos (TRUPPEL *et al.*, 2014). Os vetores têm preferência alimentar por cães e humanos, mas outras espécies de mamíferos, incluindo equinos, podem representar uma fonte alternativa de alimentos, permitindo que o DNA do protozoário seja detectado no sangue periférico, inferindo a possibilidade de que animais residentes em áreas endêmicas para LVC estão em risco de serem infectados (AFONSO *et al.*, 2012; DA SILVA SALES *et al.*, 2015; MACEDO-SILVA *et al.*, 2014).

A diversidade de espécies de *Leishmania* spp. no sul do Brasil é pouco conhecida, considerando que a classificação de região endêmica no sul é recente, estudos desenvolvidos até o momento relatam que reservatórios domésticos caninos e humanos foram infectados pela espécie *Leishmania infantum* (CEVS, 2017; TARTAROTTI *et al.*, 2011). Até esta pesquisa, nenhuma outra espécie infectante havia sido identificada.

O estudo genético de cepas de *Leishmania*, através do sequenciamento e análise filogenética das amostras positivas, sugere que *Leishmania infantum/ Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani* e *Leishmania major* estão circulando nessa área nas espécies equina e canina. Assim como no sul do Brasil, a infecção em equinos por *Leishmania infantum* já foi detectada na Europa (GAMA *et al.*, 2014; KOEHLER *et al.*, 2002; ROLÃO *et al.*, 2005; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2003).

Sequências de *L. major* também foram identificadas em amostras de cães e equinos. Esta espécie, de países do Velho Mundo, causa leishmaniose cutânea humana (LCH) na Ásia e África e foi identificada a partir de lesões cutâneas de cães pela primeira vez no Iraque (AL-BAJALAN *et al.*, 2018). No Brasil, *Leishmania major-like* recebeu esse nome após a identificação nos isolados do Novo Mundo que tinham um perfil genotípico e fenotípico semelhante ao *L. major* (MOMEN *et al.*, 1985). Este foi o primeiro relato de infecção por

*Leishmania* que encontrou fragmentos de DNA semelhantes a *L. major* nessa região fronteiriça do sul do Brasil.

Os relatos europeus e brasileiros de infecção por *L. infantum* em equinos são restritos à avaliação sorológica e molecular, sem evidências de alterações hematológicas, bioquímicas e de estresse oxidativo nessa espécie. Aqui, foram apresentados os primeiros indícios de que a infecção na espécie equina pode desencadear alterações fisiológicas e clínicas nos hospedeiros. A LVC apresenta várias alterações clínicas inespecíficas, incluindo lesões cutâneas, presentes na maioria dos casos clínicos (MÜLLER *et al.*, 2015), apatia, perda de peso, linfonodos aumentados, hepatomegalia e esplenomegalia (BARROSO *et al.*, 2015). Também foram registrados sinais oculares e tegumentares como alopecia, hipotricose, dermatite esfoliada, úlceras cutâneas e mucocutâneas, cicatrizes com crostas e onicogribose (LIMA *et al.*, 2014).

Os casos aqui descritos mostraram que a maioria dos equinos infectados não apresentava evidências clínicas, embora observaram-se alterações aparentes como: lesões de pele, nódulos e linfadenopatia, em alguns animais infectados, semelhantes às detectadas em cães com LVC das mesmas áreas. Os sinais clínicos de leishmaniose causados por *L. infantum* em equinos foram descritos como sinais temporários, que incluíam nódulos de tamanho variável, às vezes cobertos por epiderme erodida ou ulcerada (KOEHLER *et al.*, 2002; ROLÃO *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2013). Equinos assintomáticos foram relatados no norte de Portugal e na Espanha (FERNÁNDEZ-BELLON *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2013). A ausência de alterações clínicas na infecção equina estava relacionada a uma possível capacidade imunológica de reduzir a carga parasitária ou associada ao padrão de sinais temporários que os animais apresentaram (CERQUEIRA *et al.*, 2003; MÜLLER *et al.*, 2015).

As avaliações do exame clínico e físico não mostraram sinais e alterações nos animais infectados, exceto para a FC que aumentou no grupo infectado, mas não pode ser atribuída apenas à infecção por *L. infantum*, devido à interferência fisiológica causada pelo esforço, que pode possivelmente ocorrer devido ao curto intervalo de tempo entre a espera pelo exame clínico e pelas atividades realizadas por esses animais. As alterações nos índices paramétricos ainda não foram relatadas; portanto, o achado de anormalidade cardíaca, indica a necessidade de se estudar detalhadamente o grupo infectado para investigar se alterações na FC podem predizer infecção por *Leishmania* sp.

Embora existam vários fatores de influência nesses animais, como deficiência nutricional, estresse devido ao trabalho pesado e condições precárias de saúde, foi possível evidenciar algumas mudanças indicativas da infecção em testes hematológicos e bioquímicos.

Os eritrócitos e os hematócritos apresentaram-se diminuídos no grupo infectado dos equinos. Na piroplasmose equina, a qual também é uma doença causada por protozoários (*Theileria equi* e *Babesia caballi*), esses achados foram descritos (MAHMOUD *et al.*, 2016). Dessa forma, a infecção por protozoários em equinos pode apresentar o mesmo padrão de distúrbios hematológicos.

Foi observada uma redução significativa nos neutrófilos no grupo infectado equino concomitante à uremia. Os neutrófilos são as principais células efectoras da imunidade inata de mamíferos; parasitos como *L. infantum* podem modificar o metabolismo oxidativo e causar apoptose de neutrófilos de acordo com o estágio da doença. A diminuição da produção de superóxido e o aumento da apoptose associados à uremia foram observados em casos severos da LVC, (ALMEIDA *et al.*, 2013b) Como pouco se sabe sobre alterações hematológicas na infecção equina, não é possível inferir esses achados a um estágio grave da infecção, como em cães. No entanto, há indicações de que, nesta fase em que os animais foram investigados, a apoptose de neutrófilos poderia explicar essas reduções.

Em humanos, a uremia aumenta a taxa de apoptose espontânea de neutrófilos, bem como, leva a uma menor viabilidade espontânea de neutrófilos. Em grupos urêmicos de cães, foram encontradas as mesmas alterações, semelhantes ao observado em nesse estudo, no grupo de equinos infectados (ALMEIDA *et al.*, 2013c; COHEN; RUDNICKI; HÖRL, 2001; SILVA *et al.*, 2013).

Parâmetros hematológicos e bioquímicos desequilibrados são uma característica da LV em seres humanos que podem ser usados como auxílio no diagnóstico e tratamento dessa enfermidade. Na LVC, também foram encontrados marcadores hematológicos, bioquímicos e oxidativos (ALMEIDA *et al.*, 2013; SARKARI *et al.*, 2016; TORRECILHA *et al.*, 2016). Além disso, a propagação da infecção em outras espécies requer investigação científica detalhada para conhecer a dinâmica da doença. Com este estudo, foi iniciada a identificação dessas alterações em equinos na busca de biomarcadores prognósticos capazes de facilitar o diagnóstico, os procedimentos profiláticos e terapêuticos, uma vez que, como nas demais espécies mamíferas, nos equinos existe variação de sinais clínicos ou a possibilidade de ausência dos mesmos.

O estresse oxidativo tem sido atribuído a várias doenças parasitárias nas espécies caninas, incluindo infecções causadas por *L. infantum* (ALMEIDA *et al.*, 2013c; TORRECILHA *et al.*, 2016). Não foi possível identificar alterações nos níveis de marcadores de estresse oxidativo nos grupos analisados, no entanto, essa é uma limitação clara do presente estudo, pois esses parâmetros são difíceis de avaliar quando se trata de amostras de indivíduos não

controlados e, principalmente, quando estão em condições adversas do estado nutricional, hidratação e fisiológico, visto que os animais estudados pertenciam à população de baixa renda e eram na maior parte utilizados para transporte de cargas e de pessoas no perímetro urbano.

A partir dessas descobertas, deve-se avaliar a interação dos equinos com as espécies vetoriais, até o grau de envolvimento na transmissão para outros hospedeiros. Eles também podem atrair os vetores (FEITOSA *et al.*, 2012) e garantir sua manutenção através da alimentação das fêmeas, contribuindo para o aumento da prevalência de *L. infantum*.

Nesta região de fronteira, a qual está instalada a tríade epidemiológica (vetor, agente etiológico e reservatório), a continuidade da investigação da infecção em diferentes hospedeiros é extremamente necessária, assim como, a identificação de espécies patogênicas de *Leishmania*, principalmente levando em consideração o potencial de transmissão da infecção nas fronteiras dos três países, Brasil, Uruguai e Argentina. Os resultados indicaram a suscetibilidade de infecção em equinos domiciliados em áreas endêmicas. Por esse motivo, é muito importante esclarecer o papel desse animal no ciclo de transmissão da doença.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

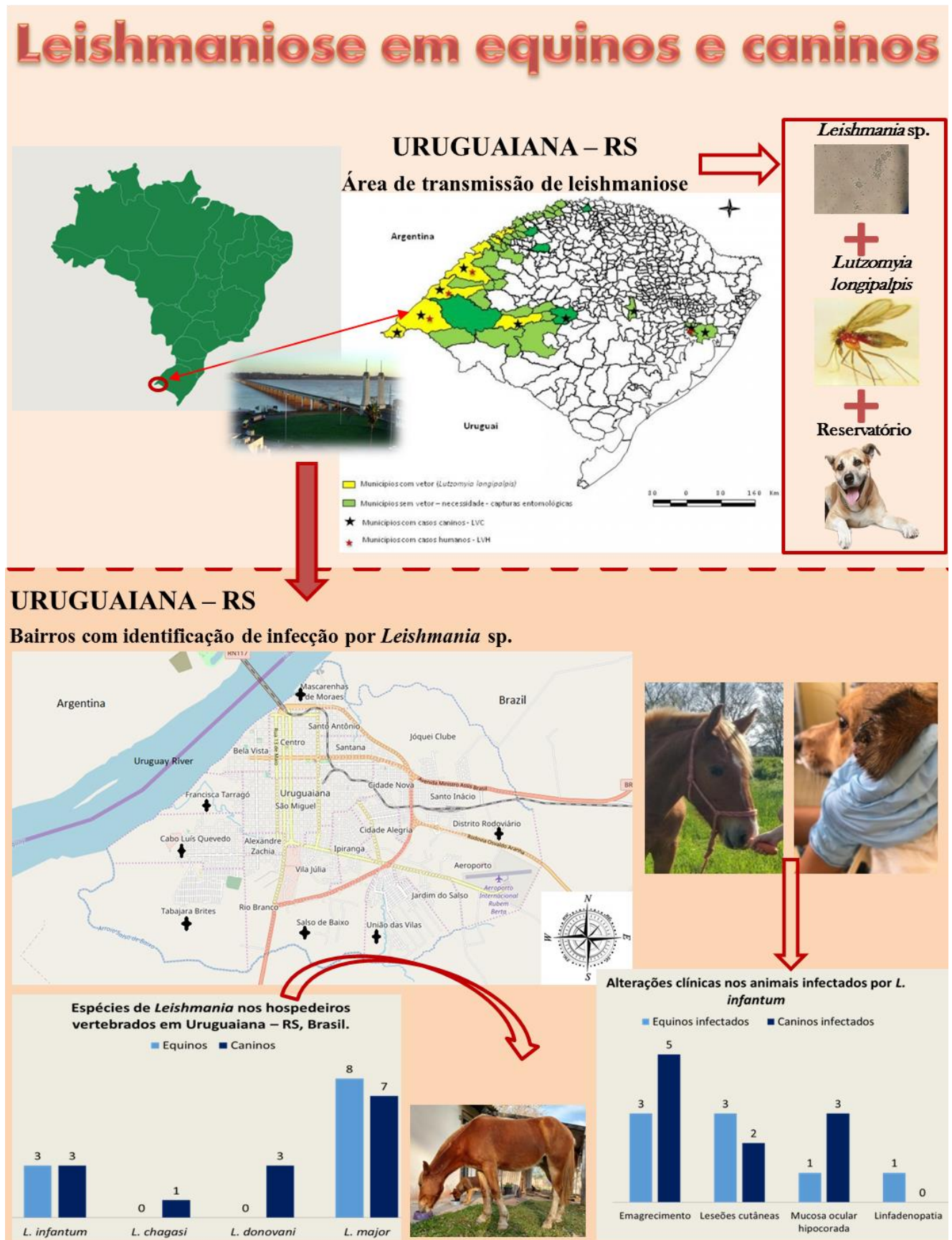
Este estudo permitiu a identificação das espécies do Gênero *Leishmania* circulantes na região da fronteira oeste do Rio Grande do Sul, e comprovou a susceptibilidade dos equinos à infecção em áreas de transmissão de LVC e LVH.

As espécies *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania major* foram identificadas nas análises moleculares. *L. infantum* e *L. chagasi*, ambas do complexo *L. donovani* e caracterizadas como sinonímias, são as espécies causadoras da leishmaniose visceral, enfermidade notificada em humanos e cães no município de Uruguaiana e nos países fronteiriços. Já, a espécie *L. major* ainda não havia sido identificada e caracterizada em animais hospedeiros e vetores na região. A identificação de cepas da espécie *L. major* requer investigação aprofundada para a comprovação da possibilidade de infecção por esta espécie causadora de formas cutâneas. Os resultados da análise filogenética, aqui relatados, incitam a necessidade de dar seguimento à caracterização das cepas encontradas.

A comparação da infecção entre as espécies canina e equina identificou maior prevalência em cães, embora nos equinos a taxa de infecção tenha sido semelhante aos resultados de regiões endêmicas do país. Este foi o primeiro estudo que relacionou a infecção por *Leishmania* spp. e as alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e de estresse oxidativo com o intuito de estabelecimento de padrões clínicos e laboratoriais para a infecção e a evolução da doença em equinos. As manifestações clínicas corroboraram com os achados em cães das mesmas áreas de estudo, as alterações hematológicas foram identificadas em ambas as espécies e nos equinos somente houve uma alteração bioquímica evidenciada. Não foram observadas alterações de estresse oxidativo entre os animais infectados.

Estes relatos foram o início da constatação de que a região é forte candidata a se tornar uma área endêmica para LV, apesar do pouco tempo de instalação do vetor e de notificações de casos caninos e humanos. Os achados expõem a urgência do desenvolvimento de outros estudos para identificação das possíveis espécies hospedeiras e do seu papel no ciclo biológico, incluindo, especialmente, a pesquisa de hábitos alimentares dos vetores encontrados na região. Os equinos infectados por *Leishmania infantum* residentes em áreas de transmissão podem desempenhar um papel importante no ciclo epidemiológico da leishmaniose no sul do Brasil e, conseqüentemente, indicar um grande risco de saúde pública. A ampliação dos conhecimentos sobre os hospedeiros permitirá o aprimoramento de medidas de controle e prevenção da infecção.

Figura 15 - Leishmaniose em equinos e caninos no município de Uruguaiana - RS.



Fonte: A Autora

## PERSPECTIVAS PARA O ESTUDO

Nesta sessão estão listadas algumas das perspectivas, a partir dos resultados obtidos neste estudo.

- Realizar acompanhamento mensal dos animais infectados avaliando estado clínico, hematológico e bioquímico ao longo do período de infecção;
  
- Continuar a investigação do dano oxidativo em biomoléculas de animais naturalmente infectados com *Leishmania* sp. com um número maior de animais e controle das condições de coleta.
  
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) nos eritrócitos dos animais;
  
- Utilizar outras técnicas de caracterização molecular das cepas infectantes;
  
- Capturar os vetores nos domicílios;
  
- Avaliar os hábitos alimentares de vetores encontrados na região para identificação de novos hospedeiros;



## REFERÊNCIAS GERAIS

- AFONSO, M. M. d. S. *et al.* **Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in northeastern Brazil.** Journal of Tropical Medicine, v. 2012, 2012. DOI:<https://doi.org/10.1155/2012/858657>
- AKHOUNDI, M. *et al.* ***Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis.** Molecular aspects of medicine, v. 57, p. 1-29, 2017. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- AKHOUNDI, M. *et al.* **A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies.** PLoS neglected tropical diseases, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004770>
- AL-BAJALAN, M. M. *et al.* **First identification of *L. major* in a dog in an endemic area of human cutaneous leishmaniasis in Iraq: molecular and phylogenetic studies.** Parasitology research, v. 117, n. 2, p. 585-590, 2018. DOI:<https://doi.org/10.1007/s00436-017-5704-7>
- ALFONZO, J.D.; THIEMANN, O.; SIMPSON, L.X. **The mechanism of U insertion/deletion RNA editing in kinetoplastid mitochondria.** Nucl. Acids Res. v. 25, 3751e3759, 1997.
- ALMEIDA, A. B. *et al.* **Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples.** Diagnostic microbiology and infectious disease, v. 76, n. 3, p. 321-324, 2013a. DOI:<https://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.017>
- ALMEIDA, B. *et al.* **Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis.** Veterinary parasitology, v. 196, n. 1-2, p. 6-12, 2013b. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.016>
- ALMEIDA, B. *et al.* **Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs.** The Veterinary Journal, v. 198, n. 3, p. 599-605, 2013c. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.024>
- ALVAR, J. *et al.* **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** PLoS one, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. **Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997.** Cadernos de Saúde Pública, v. 20, p. 259-265, 2004.
- ASHFORD, R. W. **Leishmaniasis reservoirs and their significance in control.** Clinics in dermatology, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

- BARCELLOS, C. *et al.* **Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 18, n. 3, p. 285-304, 2009.
- BARROSO, P. A. *et al.* **Genetic and clinical characterization of canine leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* in northeastern Argentina.** Acta tropica, v. 150, p. 218-223, 2015. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.007>
- BIGELI, J. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, W. P. d.; TELES, N. M. M. **Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45, n. 1, p. 18-23, 2012. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000100005>
- BORGES, D. A. *et al.* **First Record of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) on the Trinational Frontier (Brazil–Peru–Bolivia) of South-Western Amazonia.** Journal of medical entomology, v. 54, n. 5, p. 1425-1429, 2017.
- BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana.** Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil: 71 p. 2007.
- BRASIL. **Lei procedimentos para o uso científico de animais.** Lei n. 11794, Diário Oficial da União (DOU): 8 de outubro de 2008.
- BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Ministério da Saúde - Divisão de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil: 122 p. 2014.
- BRASIL. **Portaria de consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre os sistemas e os subsistemas do Sistema Único de Saúde.** Diário Oficial da União. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasília - DF: BRASIL. Portaria de Consolidação nº4 2017.
- BRITTO, C. F. P. C; PITA-PEREIRA, D. **Diagnóstico Molecular de *Leishmania spp.* em Flebótomos Provenientes de Áreas de Ocorrência de Leishmaniose.** In: CONCEIÇÃO-SILVA, F. (Ed.). Leishmanioses do Continente Americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. cap. 13, p.512. ISBN 978-85-7541-439-2.
- CARDOSO, L. *et al.* **Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA.** Veterinary parasitology, v. 174, n. 1-2, p. 37-42, 2010. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.022>
- CARINI, A.; PARANHOS, U. **Identification de l'‘Ulcera de Bauru’ avec le bouton d'orient.** Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, v. 2, n. 5, p. 255-257, 1909a.
- CARINI, A.; PARANHOS, U. **Identificação das úlceras de Bauru ao botão do oriente.** Revista Médica de São Paulo, n. 6, p. 111-116, 1909b.
- CASTRO-PINTO, D. B.; FABRINO, D. L.; LEON, L. **A importância de Radicais Livres durante a infecção por protozoários do Gênero *Leishmania*.** 1. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Editora FIOCRUZ, 2014. 512.

CDC. **Lyfe Cicle**. Washington, DC: Centers of Disease Control and Prevention 2018.

CECCARELLI, M. *et al.* **Detection and characterization of *Leishmania (Leishmania) and Leishmania (Viannia)* by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA.** PLoS One, v. 9, n. 2, p. e88845, 2014.

CEMEK, M. *et al.* **Protective roles of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: A comparative study.** Pesticide biochemistry and physiology, v. 96, n. 3, p. 113-118, 2010.

CERQUEIRA, E. J. L. *et al.* **Experimental infection of *Equus asinus* with *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36, n. 6, p. 695-701, 2003. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000600009>

CEVS. **Nota Técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira oeste do Estado Rio Grande do Sul com a Argentina.** Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul - Porto Alegre: Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul. 1 2010.

CEVS. **Situação epidemiológica da leishmaniose visceral no Rio Grande Do Sul - NOTA INFORMATIVA.** Secretaria Estadual de Saúde - Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Porto Alegre: Centro Estadual de Vigilância em Saúde: 1-4 p. 2017.

CEVS. **Situação epidemiológica da leishmaniose visceral no Rio Grande Do Sul. Dados Preliminares Sinan Net 2019.** Secretaria Estadual de Saúde - Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Porto Alegre: Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Disponível em: <<https://cevs.rs.gov.br/lvh-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em: 12 de outubro de 2019.

CHAPPUIS, F. *et al.* **Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?** Nature reviews microbiology, v. 5, n. 11supp, p. S7, 2007.

CHEN, C.-J. *et al.* **A screening platform for compounds with potential immunoregulatory activities using human cord blood mononuclear cells.** Combinatorial chemistry & high throughput screening, v. 9, n. 10, p. 777-784, 2006.

CIARAMELLA, P. *et al.* **A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*.** Veterinary record, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997. DOI:<http://dx.doi.org/10.1136/vr.141.21.539>

CIARLINI, P. C. *et al.* **Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol.** Ciência Animal Brasileira, p. 369-375, 2010.

COHEN, G.; RUDNICKI, M.; HÖRL, W. H. **Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils.** Kidney International, v. 59, p. S48-S52, 2001. DOI:<https://10.1046/j.1523-1755.2001.59780048.x>

CORTES, S. *et al.* **PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* sl-specific kinetoplastid primers.**

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)00002-6](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)00002-6)

CORTES, S. J. d. C. **Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal**. 2008. 163 (Tese de Doutorado em Ciências Biomédicas). Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

COSTA, T. A. C. *et al.* **Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, p. 213-217, 2010.

COUGHLAN, S. *et al.* **The genome of *Leishmania adleri* from a mammalian host highlights chromosome fission in *Sauroleishmania***. Scientific reports, v. 7, p. 43747, 2017.

COURTENAY, O. *et al.* **Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 90, n. 5, p. 498-502, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(96\)90293X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(96)90293X)

COUTINHO, M. T. Z. *et al.* **Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis**. Veterinary parasitology, v. 128, n. 1, p. 149-155, 2005. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.011>

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. **Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?** Veterinary parasitology, v. 147, n. 3-4, p. 320-325, 2007. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.008>

CUPOLILLO, E.; BOITÉ, M. C.; PORROZZI, R. **Considerações sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania***. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F. (Ed.). Leishmanioses do Continente Americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. cap. 2, p.512. ISBN 978-85-7541-439-2.

CUPOLILLO, E. *et al.* **A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum***. Parasitology today, v. 16, n. 4, p. 142-144, 2000.

CURI, N. H. d. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. **Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, n. 1, p. 99-101, 2006. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000100019>

DA SILVA SALES, K. G. *et al.* **Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR**. Parasites & vectors, v. 8, n. 1, p. 230, 2015. DOI:<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0840-3>

DE ARAÚJO, V. A. L. *et al.* **Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum***. Parasitology, v. 140, n. 4, p. 455-460, 2013. DOI:<https://doi.org/10.1017/S0031182012001886>

DE OLIVEIRA, A. G. *et al.* **Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an**

**endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil.** Acta Tropica, v. 107, n. 3, p. 238-241, 2008. DOI:<https://doi:10.1016/j.actatropica.2008.06.002>

DEBONI, S. C.; BARBOSA, M.; RAMOS, R. R. **Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul.** *Boletim Epidemiológico*. Porto Alegre: Centro Estadual de Vigilância em Saúde 13 2011.

DESJEUX, P. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives.** Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

EL TAI, N. *et al.* **Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 94, n. 5, p. 575-579, 2000. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90093-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90093-2)

EL TAI, N. O. *et al.* ***Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing.** Experimental parasitology, v. 97, n. 1, p. 35-44, 2001. DOI:<https://dx.doi.org/10.1006/expr.2001.4592>

ESCOBAR, T. A. *et al.* **Applications of polymerase chain reaction for the detection of equine *Leishmania* sp. infection.** Semina: Ciênc. Agrár., v.1, n. 1 NO PRELO., 2020.

ESCOBAR, T. A. *et al.* **Risk factors associated to canine visceral leishmaniasis in Uruguaiana city, Brazil.** Semina: Ciências Agrárias, v. 39, n. 1, p. 211-219, 2018. DOI:<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n1p211>

EVANS, P.; HALLIWELL, B. **Micronutrients: oxidant/antioxidant status.** British journal of nutrition, v. 85, n. S2, p. S67-S74, 2001.

FEITOSA, F. L. F. *et al.* **Estudo soroprevalenciológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, p. 500-502, 2012. DOI:<http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v49i6p500-502>

FERNÁNDEZ-BELLON, H. *et al.* **Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain.** Veterinary parasitology, v. 135, n. 2, p. 181-185, 2006. DOI:<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.007>

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, p. 61-68, 1997.

FRANCO, A. M. *et al.* **Minicircle kDNA microheterogeneity in *Endotrypanum* indicate diversity within this genus.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, n. 2, p. 189-191, 2000. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000200009>

GALARDO, A. K. R. *et al.* **Primeira ocorrência de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Estado do Amapá,**

**Brasil.** Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota), v. 3, n. 2, p. 179-183, 2013.

GAMA, A. *et al.* **Cutaneous leishmaniosis in a horse from northern Portugal.** Veterinary parasitology, v. 200, n. 1, p. 189-192, 2014.

DOI:<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.005>

GAO, C.-h. *et al.* **Survey of wild and domestic mammals for infection with *Leishmania infantum* following an outbreak of desert zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, People's Republic of China.** PloS one, v. 10, n. 7, p. e0132493, 2015.

DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132493>

GOMES, A. H. d. S. **Contribuição da reação da polimerase em cadeia no diagnóstico e às ações de vigilância epidemiológica das leishmanioses tegumentar e visceral no Estado de São Paulo.** 2008. 117 ( Tese de Doutorado em Ciências). Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Saúde de São Paulo, São Paulo.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. d. **Leishmaniose tegumentar americana.** Rev Soc Bras Med Trop, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. **Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?** British journal of pharmacology, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HAN, S. *et al.* **Epidemiological survey of sheep as potential hosts for *Leishmania* in China.** BMC veterinary research, v. 14, n. 1, p. 378, 2018.

DOI:<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1701-z>

HARHAY, M. O. *et al.* **Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil.** Trends in parasitology, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>

INIESTA, L. *et al.* **Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v. 9, n. 5, p. 1137-1141, 2002.

DOI:<https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.1137-1141.2002>

JERALDO, V. d. L. S. *et al.* **Sandfly fauna in an area endemic for visceral leishmaniasis in Aracaju, State of Sergipe, Northeast Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45, n. 3, p. 318-322, 2012.

KOEHLER, K. *et al.* **Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*.** Veterinary Parasitology, v. 109, n. 1, p. 9-17, 2002.

DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00246-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00246-7)

KOUAM, M. K. *et al.* **A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors.** Veterinary Parasitology, v. 170, n. 1, p. 170-175, 2010.

KOUTINAS, A.; KOUTINAS, C. **Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*.** Veterinary pathology, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

KUHLS, K. *et al.* **Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex.** *Microbes and Infection*, v. 7, n. 11-12, p. 1224-1234, 2005. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.009>

KUHLS, K. *et al.* **Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

KUHLS, K. *et al.* **Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis.** *Microbes and Infection*, v. 9, n. 3, p. 334-343, 2007. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.12.009>

LACHAUD, L. *et al.* **Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis.** *Journal of clinical microbiology*, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. ***Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. **Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. **Neutrophil granulocytes—Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?** *Trends in microbiology*, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003.

LE FICHOUX, Y. *et al.* **Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France.** *Journal of clinical microbiology*, v. 37, n. 6, p. 1953-1957, 1999.

LIMA, A. C. V. M. d. R. **Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil”** 2010. 146 ( Tese de Doutorado em Ciências). Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LIMA, E.; ABDALLA, D. S. P. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, I. S. *et al.* **Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp.** *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e87742, 2014. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087742>

LOMBARDI, M. C. *et al.* **Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by polymerase chain reaction in wild mammals.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 12, p. 1243-1246, 2014. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014001200017>

LOPES, A. P. *et al.* **Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in horses from the north of Portugal.** Parasites & vectors, v. 6, n. 1, p. 178, 2013. DOI:<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-178>

LUKEŠ, J. *et al.* **Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007. DOI:<https://doi.org/10.1073/pnas.0703678104>

LUKEŠ, J. *et al.* **Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure.** Eukaryotic cell, v. 1, n. 4, p. 495-502, 2002. DOI:<https://dx.doi.org/10.1128/EC.1.4.495-502.2002>

LUKEŠ, J.; HASHIMI, H.; ZÍKOV, A. **Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates.** Curr. Genet. v. 48, 277e299, 2005..

MACEDO-SILVA, V. P. *et al.* **Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae).** Journal of medical entomology, v. 51, n. 1, p. 237-244, 2014. DOI:<https://doi.org/10.1603/ME12131>

MAHMOUD, M. S. *et al.* **Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches.** Parasites & vectors, v. 9, n. 1, p. 260, 2016.

MAHMUD, I. C. *et al.* **Epidemiological aspects of the first human autochthonous visceral leishmaniosis cases in Porto Alegre, Brazil.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 23, n. 2, p. 124-129, 2019. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.04.004>

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* **Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges.** Cadernos de Saúde Pública, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200024>

MAIA, C.; CAMPINO, L. **Biomarkers Associated With *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs.** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 8, n. 302, 2018. DOI:10.3389/fcimb.2018.00302

MALTA, M. C. C. *et al.* **Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil.** Veterinary parasitology, v. 169, n. 1, p. 193-197, 2010.

MAROLI, M. *et al.* **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, 2013. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>

MATOS, H. J. d. *et al.* **Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças.** Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 6, n. 1, p. 65-68, 2015. DOI:<http://dx.doi.org/10.5123/S217662232015000100007>

MAURICIO, I. L. *et al.* **Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex.** Parasitology, v. 119, n. 3, p. 237-246, 1999.



MAZZA, S. **Leishmaniasis cutánea en el caballo y nueva observación de la misma en el perro.** Boletín del Instituto de Clínica y Quirujia, v. 3, p. 462-4, 1927.

MELLO FILHO, A.; HOFFMANN, M.; MENEGHINI, R. **Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron.** Biochemical Journal, v. 218, n. 1, p. 273-275, 1984.

MICHALSKY, É. M. *et al.* **Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotômíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, p. 58-62, 2011.  
DOI:<https://dx.doi.org/10.1590/S003786822011000100014>

MILLÁN, J. *et al.* **An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain).** Transboundary and emerging diseases, v. 58, n. 4, p. 352-357, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01212.x>

MOMEN, H. *et al.* **Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*.** The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 34, n. 6, p. 1076-1084, 1985. DOI:<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.1076>

MOREIRA, F. L. **Schematic representation of *Trypanosomatids*.** 1, F. Cambridge, USA: Nature Education 2010.

MUKHTAR, M. M. *et al.* **Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 94, n. 1, p. 33-36, 2000.  
DOI:[https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90429-2](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90429-2)

MÜLLER, N. *et al.* **Quantitative PCR for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis from formalin-fixed and paraffin-embedded skin sections.** Molecular and cellular probes, v. 29, n. 6, p. 507-510, 2015. DOI:<https://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2015.09.008>

MÜLLER, N. *et al.* **Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe.** Veterinary parasitology, v. 166, n. 3, p. 346-351, 2009.  
DOI:<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.001>

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. **Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view.** Clinical microbiology reviews, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.  
DOI:<https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.293-305.2005>

OPAS. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas** Organização Pan-Americana da Saúde. Washington, DC: Organização Pan-Americana da Saúde, p.1-8. 2019. Disponível em: < <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?ua=1> >. Acesso em 12 jul 2019.

OTRANTO, D. *et al.* **Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment.** Veterinary Parasitology, v. 236, p. 144-151, 2017.

OTRANTO, D. *et al.* **Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic.** Clin. Vaccine Immunol., v. 16, n. 3, p. 337-343, 2009. DOI:<https://doi.org/10.1128/CVI.00268-08>

PAHO. **Leishmaniasis. Epidemiological Report of the Americas** Pan American Health Organization. Washington, DC: 2017 Pan American Health Organization, p.1-8. 2017a. Disponível em: <[http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34112/leishmaniasis\\_report\\_5\\_eng.pdf?ua=1](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34112/leishmaniasis_report_5_eng.pdf?ua=1)>. Acesso em 20 jul 2017.

PAHO. **Neglected Infectious Disease: Leishmaniasis.** Pan American Health Organization. Washington D.C.,: Pan American Health Organization, p.1. 2017b. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-cha-leishmaniasis-factsheet-work.pdf>>. Acesso em 17 sep 2017.

PAIXÃO-MARQUES, M. d. S. *et al.* **First isolation of *Leishmania infantum* by blood culture in bovines from endemic area for canine visceral leishmaniasis.** Parasitology, p. 1-3, 2019. DOI:<https://doi.org/10.1017/S003118201900008>

PALTRINIERI, S. *et al.* **Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis.** Veterinary clinical pathology, v. 45, n. 4, p. 552-578, 2016.

PALTRINIERI, S. *et al.* **Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs.** Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PANDEY, K. *et al.* **Molecular detection of *Leishmania* parasites from whole bodies of sandflies collected in Nepal.** Parasitology research, v. 103, n. 2, p. 293-297, 2008. DOI:<https://dx.doi.org/10.1007/s00436-008-0967-7>

PAPADOGIANNAKIS, E. *et al.* **Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece.** Zoonoses and public health, v. 57, n. 7-8, 2010. DOI:<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1863-2378.2009.01264.x>

PAZ, G. F. *et al.* **Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis.** Parasitology research, v. 106, n. 2, p. 523-528, 2010. DOI:<https://doi.org/10.1007/s00436-009-1697-1>

PENNISI, M.-G. *et al.* **LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis.** Parasites & vectors, v. 8, n. 1, p. 302, 2015. DOI:<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0909-z>

PITA-PEREIRA, D. *et al.* **SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis.** Parasites & vectors, v. 5, n. 1, p. 5-15, 2012. DOI:<https://dx.doi.org/doi.org/10.1186/1756-3305-5-15>

QUEIROZ, N. M. G. P. d. *et al.* **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 19, p. 32-38, 2010. DOI:<http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01901006>.

RAY, D. **Conserved sequence blocks in kinetoplast DNA minicircles from diverse species of trypanosomes.** *Mol. Cell Biol.* v.9, 1365e1367, 1989.

REIS, A. B. *et al.* **Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*.** *Clinical & Experimental Immunology*, v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006.

REUSS, S. M. *et al.* **Autochthonous *Leishmania siamensis* in horse, Florida, USA.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 9, p. 1545-1547, 2012.  
DOI:<https://dx.doi.org/10.3201/eid1809.120184>

ROHOUSOVA, I. *et al.* **Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia.** *Parasites & vectors*, v. 8, n. 360, 2015.  
DOI:<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0976-1>

ROLÃO, N. *et al.* **Equine infection with *Leishmania* in Portugal.** *Parasite*, v. 12, n. 2, p. 183-186, 2005. DOI:<https://doi.org/10.1051/parasite/2005122183>

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. **Hospedeiros e Reservatórios de *Leishmania* sp. e sua importância na manutenção dos ciclos de transmissão nos ambientes silvestre e sinantrópico.** In: CONCEIÇÃO-SILVA, F. e ALVES, C. R. (Ed.). *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014a. p.512.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. **Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas.** *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014b. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>

ROSAS FILHO, M. d. S.; SILVEIRA, F. T. **Epidemiologia, clínica e imunologia da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de leishmaniose visceral no Pará.** *Revista Paraense de Medicina*, v. 21, n. 3, p. 7-18, 2007.

SALOMÓN, O. D. *et al.* ***Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 3, p. 381-382, 2011. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000300023>

SALOMÓN, O. D.; ORELLANO, P. W. ***Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 475-476, 2005.  
DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000500005>

SALOMÓN, O. D. *et al.* **Distribución de vectores de leishmaniasis visceral en la provincia de corrientes, 2008.** *Medicina (Buenos Aires)*, v. 69, n. 6, p. 625-630, 2009.

SALOMON, O. D. *et al.* **First visceral leishmaniasis focus in Argentina.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 1, p. 109-111, 2008.  
DOI:<https://dx.doi.org/10.1590/S007402762008000100018>

SALOMÓN, O. D. *et al.* **Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniosis visceral en Argentina.** *Medicina (Buenos Aires)*, p. 174-178, 2001.

SANT'ANNA, M. R. *et al.* **Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper.** *Acta tropica*, v. 107, n. 3, p. 230-237, 2008.  
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.003>

SANTIAGO, M. E. B. *et al.* **An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil).** *Veterinary Parasitology*, v. 150, n. 4, p. 283-290, 2007.

SANTOS, E. d.; SILVA, F. D. d.; SOUZA, G. D. **Vigilância Entomológica.** Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Porto Alegre: Secretaria Estadual de Saúde. 13: 6-8 p. 2011.

SARKARI, B. *et al.* **Visceral leishmaniasis in southwestern Iran: A retrospective clinico-hematological analysis of 380 consecutive hospitalized cases (1999–2014).** *PloS one*, v. 11, n. 3, p. e0150406, 2016. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150406>

SATRAGNO, D. *et al.* **Autochthonous outbreak and expansion of canine visceral leishmaniasis, Uruguay.** *Emerging infectious diseases*, v. 23, n. 3, p. 536, 2017.  
DOI:<http://doi.org/10.3201/eid2303.160377>

SCHÖNIAN, G. *et al.* **Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 2, p. 217-224, 2001. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90173-7](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90173-7)

SERARSLAN, G.; YILMAZ, H.; SÖĞÜT, S. **Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis.** *Clinical and Experimental Dermatology: Experimental dermatology*, v. 30, n. 3, p. 267-271, 2005.

SES. **Nota Técnica conjunta nº 01/2014 - CEVS-IPB-LACEN- SES/RS: Leishmaniose visceral no Estado do Rio Grande do Sul.** Secretaria de Saúde, Porto Alegre: Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul, 2014.

SHERLOCK, I. A. **Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.  
DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761996000600003>

SILVA, A. C. R. A. *et al.* **Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease.** *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 77, n. 2, p. 136-141, 2013.

SILVA, C. G. *et al.* **Ultraestrutura de Parasitos do Gênero *Leishmania*.** In: CONCEIÇÃO-SILVA, F. (Ed.). *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. p.512.

SILVA, J. P. d. *et al.* **Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 4, p. 480-484, 2012.  
DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S003786822012005000009>

- SILVA, R. C. *et al.* **Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers.** *Veterinary Quarterly*, v. 37, n. 1, p. 23-30, 2017. DOI:<https://dx.doi.org/10.1080/01652176.2016.1252073>
- SIMPSON, L. **The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution.** *Annual Reviews in Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 363-380, 1987. DOI:<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002051>
- SOARES, I. R. **Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes para *Leishmania* sp. no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.** 2012. 133 (Dissertação de Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SOARES, I. R. *et al.* **First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** *Veterinary parasitology*, v. 197, n. 3, p. 665-669, 2013.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* **Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs.** *Journal of comparative pathology*, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00063-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00063-X)
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* **Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis.** *Veterinary parasitology*, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* **Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain.** *Equine veterinary journal*, v. 35, n. 3, p. 320-323, 2003. DOI:<https://doi.org/10.2746/042516403776148336>
- SOUZA, G. D.; SANTOS, E. d.; ANDRADE FILHO, J. D. **The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 8, p. 1181-1182, 2009. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000800017>
- STUART, K.D. *et al.* 2005. **Complex management: RnA editing in trypanosomes.** *Trends biochem. Sci.* 30, 97e1052005, 2005.
- TARTAROTTI, A. L. *et al.* **Vigilância de Reservatórios Caninos.** CEVS/SES-RS. Porto Alegre: Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS/SES-RS) 13: 3-6 p. 2011.
- TEMPONE, A. J.; PITALUGA, A. N.; TRAUB-CSEKÖ, Y. M. **Aspectos Moleculares da Interação Flebotomíneo-*Leishmania*** In: CONCEIÇÃO-SILVA, F. (Ed.). *Leishmanioses do Continente Americano.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. p.512.
- TORRECILHA, R. *et al.* **Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis.** *Preventive*

veterinary medicine, v. 132, p. 83-87, 2016.  
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.08.006>

TRUPPEL, J. H. *et al.* **Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas?** PloS one, v. 9, n. 4, p. e93731,  
2014. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093731>

VALKO, M. *et al.* **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** The international journal of biochemistry & cell biology, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN ASSCHE, T. *et al.* ***Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology.** Free Radical Biology and Medicine, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

VEDOVELLO FILHO, D. *et al.* **American Cutaneous Leishmaniasis in Horses from Endemic Areas in the North-Central Mesoregion of Paraná State, Brazil.** Zoonoses and public health, v. 55, n. 3, p. 149-155, 2008.

WERNECK, G. L. **Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil.** Cad. saúde pública, v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.  
DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102311X2010000400001>

WHO. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.**, World Health Organization. Geneva: 22-26 march 2010  
World Health Organization, p.186. 2010. Disponível em:  
<<https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>>. Acesso em 12 jul 2017.

WONG, C. M. *et al.* **Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation.** Antioxidants & redox signaling, v. 12, n. 3, p. 393-404, 2010

**ANEXO A – Protocolo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética em Uso Animal.**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

**Pró-Reitoria de Pesquisa**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

---

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO  
DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: **016/2016**

Título: **Caracterização molecular, clínica e bioquímica da  
leishmaniose em equinos, caninos e felinos**

Data da aprovação: **01.06.2016**

Período de vigência do projeto: 01.06.2019

Pesquisador: Vanusa Manfredini

Campus: **Uruguiana**

Telefone: 55 84075737

E-mail: [vanusamanfredini@unipampa.edu.br](mailto:vanusamanfredini@unipampa.edu.br)

**Prof. Dr. Vanusa Manfredini**  
**Coordenadora CEUA/UNIPAMPA**

**ANEXO B** – Carta de Aceite do Artigo Científico 2, submetido e aprovado para publicação no Periódico *BMC Veterinary Research – Springer Nature*.

11/10/2019

View Letter

**Date:** 20 Sep 2019  
**To:** "Taiane Acunha Escobar" taianeescobar@hotmail.com  
**From:** "BMC Veterinary Research Editorial Office" henry.tuvisipontillasii@springernature.com  
**Subject:** Decision on your Submission to BMC Veterinary Research - BVET-D-19-00343R5

BVET-D-19-00343R5

Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations in a canine visceral leishmaniasis transmission area  
 Taiane Acunha Escobar, PhD student; Gabriela Döwich, Bachelor; Thália Pacheco dos Santos, undergraduate student;  
 Luisa Zuravski, PhD student; Cláudia Acosta Duarte, PhD; Irina Lübeck, PhD; Vanusa Manfredini, PhD  
 BMC Veterinary Research

Dear Mrs. Escobar,

I am pleased to inform you that your manuscript "Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations in a canine visceral leishmaniasis transmission area" (BVET-D-19-00343R5) has been accepted for publication in BMC Veterinary Research.

If any final comments have been submitted from our reviewers or editors, these can be found at the foot of this email for your consideration.

Before publication, our production team will also check the format of your manuscript to ensure that it conforms to the standards of the journal. They will be in touch shortly to request any necessary changes, or to confirm that none are needed.

Please do not hesitate to contact us if you have any questions regarding your manuscript and I hope that you will consider BMC Veterinary Research again in the future.

If you wish to co-submit a data note to be published in BMC Research Notes (<https://bmcrsnotes.biomedcentral.com/about/introducing-data-notes>) you can do so by visiting our submission portal <http://www.editorialmanager.com/resn/>. Data notes support open data (<https://www.springernature.com/gp/open-research/open-data>) and help authors to comply with funder policies on data sharing. Please note that this additional service is entirely optional.

Best wishes,

Sarah Gray  
 BMC Veterinary Research  
<https://bmcvetres.biomedcentral.com/>

Comments:

\*\*\*\*\*  
 ---

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/bvet/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.