

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

Orientadora: Prof^ª. Débora da Cruz Payão Pellegrini

Tainã Luís de Souza

Uruguaiana, dezembro de 2015

TAINÃ LUÍS DE SOUZA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^ª. Débora da Cruz Payão Pellegrini

**Uruguaiana
2015**

TAINÃ LUÍS DE SOUZA

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Epidemiologia e Saúde Pública.

Relatório apresentado e defendido em 10 de dezembro de 2015.

Prof. Dra. Débora da Cruz Payão Pellegrini
Orientadora

Prof. Dr. Tiago Gallina Corrêa
Medicina Veterinária / Universidade Federal do Pampa - Unipampa

Prof. Dra. Irina Lübeck
Medicina Veterinária / Universidade Federal do Pampa – Unipampa

Dedico esta conquista aos meus pais, José Luís e Gilvana, meus grandes exemplos e que sempre acreditaram e apoiaram a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

A minha família, meus pais José Luís e Gilvana, e meu irmão Natan, de quem recebi tanto carinho e apoio imensuráveis em todas as situações e por toda minha vida, mas especialmente durante o período de estágio supervisionado.

Aos meus tios João e Marisa, grandes incentivadores desde o começo da graduação; obrigado pela torcida e carinho constantes.

A minha supervisora Fernanda Morgado, minha orientadora de todas as horas e situações. Sempre paciente, mas com a firmeza que me ajudava a ser objetivo nos momentos de dúvidas. Este agradecimento ultrapassa a orientação acadêmica, passa pela amizade, pelos ensinamentos em diferentes esferas e, principalmente, pela confiança depositada em mim que me incentivou a enfrentar a maratona de provas da seleção do mestrado.

Aos pesquisadores Renato Porrozzì, Elisa Cupolillo, Mariana Boité e Patricia Cuervo, pelo apoio, orientação e amizade.

A mestranda Virgínia Andrade, que sempre esteve disposta a contribuir e me ensinar. Sem a sua ajuda durante o período de estágio tudo teria sido bem mais difícil! Além da amizade, sua colaboração e experiência foram essenciais.

Aos colegas do LPL: Bruna, Camila, Carol, Hellen, Lila, Monica, Natália, Nathália, Thaís Fragoso, Thaís Su, Leonardo, Rosane, Eduardo e Selma.

A minha orientadora Prof^ª Débora Pellegrini, pelos conselhos, confiança e indicação que me trouxe até a Fiocruz.

Aos meus queridos professores de graduação, em especial a prof^ª Daniela Brum e o prof. Fábio Leivas, por serem mais que professores, são também amigos, por me incentivarem e passarem seus conhecimentos.

Aos alunos da graduação, grupo PET Veterinária e Laboratório de Epidemiologia, da UNIPAMPA, por toda a amizade e carinho nestes cinco anos e por terem contribuído com minha formação: Karine, Marcelo, Daniele, Carol, Lucas, Pedro, Natan, Isis, Eliana e Danton.

Aos grandes amigos que o Rio de Janeiro me deu: Paulo, Bruna e Marina. Amigos para qualquer hora, dando-me conforto nos momentos de dificuldade e apoiando-me nos momentos de vitória. Obrigado pela confiança!

Aos meus companheiros de república na cidade maravilhosa, Tom, Tiago e Sharton, que me receberam tão bem, sempre me ajudando.

Muito obrigado a todos!

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

“Não há saber mais ou saber menos. Há saberes diferentes.”

Paulo Freire

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA - ÁREA DE EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária no laboratório de pesquisa em leishmaniose (LPL), coleção de leishmania do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) e laboratório de referência nacional para tipagem de leishmania (LRNTL), pertencentes ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no município do Rio de Janeiro, na área de epidemiologia e saúde pública. A maior parte das atividades estavam vinculadas ao projeto denominado “Verificação da expressão de marcadores de exaustão e desorganização esplênica em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados”. As atividades executadas envolveram treinamento em qualidade e biossegurança em laboratório de pesquisa, treinamento em isolamento de células de sangue periférico e acompanhamento da rotina do laboratório, tais como, acompanhamento de necropsias de cães diagnosticados com leishmaniose visceral, participação na coleta de amostras clínicas encaminhadas para os diferentes métodos de diagnóstico e para os trabalhos de pesquisa, preparo de lâminas contendo cortes teciduais congelados de baço de cães infectados, avaliação histopatológica de cortes teciduais de baço de cães infectados, separação de células mononucleares de sangue periférico seguido de congelamento para análises futuras, participação de seminários científicos semanais produzidos pelo laboratório e análise da expressão de RNAm por PCR quantitativo, sob a supervisão da médica veterinária e tecnóloga em saúde pública da Fundação Oswaldo Cruz, Dra. Fernanda Nazaré Morgado e orientação da Prof^ª Dra. Débora da Cruz Payão Pellegrini. O período de estágio ocorreu entre os dias 16 de setembro de 2015 a 07 de dezembro de 2015, perfazendo um total de 450 horas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Imagens dos sinais clínicos observados e aplicados na pontuação por score de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>	22
FIGURA 2	Coleta de tecido de baço em nitrogênio líquido	24
FIGURA 3	Preparo de lâminas histológicas em criostato	24
FIGURA 4	Esquema PCR Quantitativo.....	27
FIGURA 5	Diferentes níveis de organização da polpa branca esplênica de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i>	29
FIGURA 6	Número de animais presentes nos diferentes grupos de acordo com a sintomatologia e sua relação com o grau de organização da polpa branca	29
FIGURA 7	Análise histopatológica do baço de cães naturalmente infectados	30
FIGURA 8	Identificação através de imuno-histoquímica da presença de (A) células CD3+, (B) CTLA-4+, (C) TIM-3+, (D) IL-10+ e (E) IFN- γ + no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i>	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante a realização do estágio curricular supervisionado em medicina veterinária.....	19
--	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 Pontuação por score dos sintomas clínicos observados em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
CCZ	Centro de controle de zoonoses
CD3 ⁺	Cluster de diferenciação 3
CD4 ⁺	Cluster de diferenciação 4
CD8 ⁺	Cluster de diferenciação 8
CLIOC	Coleção de leishmania do Instituto Oswaldo Cruz
CTLA-4	Antígeno associado a linfócito T citotóxico 4
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
ELISA	Ensaio de imun absorção ligado a enzima
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LACEN	Laboratório central de saúde pública
LAG-3	Gene 3 de ativação linfocitária
LAPCLIN	Laboratório de pesquisa clínica em dermatozoonoses em animais domésticos
LPL	Laboratório de pesquisa em leishmaniose
LRNTL	Laboratório de referência nacional para tipagem de leishmania
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
MS	Ministério da saúde

µg	Micrograma
µm	Micrômetro
NNN	Meio de cultura Novy, MacNeal, Nicolle
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PCRq	Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PD-L1	Ligante de morte programada 1
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
rpm	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TIM-3	Domínios de mucina e imunoglobulina de célula T
TR-DPP®	Teste rápido dual path platform Bio-Manguinhos
U	Unidade de atividade enzimática
°C	Grau celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	18
2.1 Treinamento em Qualidade e Biossegurança em Laboratório de Pesquisa	19
2.2 Treinamento em isolamento de células de sangue periférico e baço	20
2.3 Acompanhamento das necropsias de cães diagnosticados com Leishmaniose Visceral e Diagnóstico	21
2.3.1 Aspectos éticos.....	22
2.3.2 Análise histopatológica	23
2.3.3 Imuno-histoquímica	25
2.3.4 Análise da expressão de RNAm de PD-1, PD-L1 e LAG-3 por PCR quantitativo (PCRq).....	26
3 DISCUSSÃO.....	28
3.1 Análise da arquitetura esplênica, sintomatologia e carga parasitária	28
3.2 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina	31
3.3 A Resposta Imune da Leishmaniose Visceral Canina	33
3.4 Treinamento em Qualidade e Biossegurança em Laboratório de Pesquisa	36
4 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO A - Taxonomia da Leishmania	44
ANEXO B - Certificado de conclusão de estágio	45

1 INTRODUÇÃO

O estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária foi realizado no laboratório de pesquisa em leishmaniose, coleção de leishmania do Instituto Oswaldo Cruz e laboratório de referência nacional para tipagem de leishmania, pertencentes ao Instituto Oswaldo Cruz, localizado no Pavilhão Leônidas Deane, Fundação Oswaldo Cruz, no município do Rio de Janeiro.

A coleção de leishmania do Instituto Oswaldo Cruz, foi criada em 1980, com apoio do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz e Organização Mundial da Saúde. A CLIOC atuando como Centro de Recursos Biológicos, dedica-se então à preservação, armazenamento, distribuição, caracterização taxonômica e identificação de leishmania e informação associada, contribuindo assim para o desenvolvimento científico e tecnológico do Brasil. Além de desenvolver projetos de pesquisa específicos, a CLIOC atende a demanda de instituições públicas de pesquisa e ensino ou setores da indústria, prestando serviços especializados como (I) aquisição, identificação específica ou sub-específica de isolados originais depositados ou não no banco; (II) distribuição de cepas de referência, com a finalidade de desenvolver pesquisas científicas ou como apoio aos órgãos responsáveis pela vigilância epidemiológica das leishmanioses no país e no exterior; e (III) treinamento de recursos humanos e consultoria técnico-científica em suas áreas de atuação. O acervo engloba protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae), conforme anexo A, representando as espécies reconhecidas (patógenos e não-patógenos humanos) e genótipos específicos com expressiva representatividade da biodiversidade estudada em leishmanias neotropicais. Organismos geneticamente modificados fazem parte igualmente do seu acervo.

A coleção oferece acesso público ao seu acervo de leishmania, assim como aos dados associados a esses microrganismos (incluindo informações moleculares, fisiológicas e estruturais referente ao material biológico), dando assim sustentação a programas de pesquisa e inovação tecnológica, cujos resultados, entre outros usos na Saúde Pública, serão materializados em estudos epidemiológicos, desenvolvimento de imunobiológicos e de novos medicamentos, permitindo a melhor operação integrada com outros sistemas de informação internacionais, como *Common Access to Biological Resources and Information* e *Global Biodiversity Information Facility*.

A visão do LPL/LRNTL/CLIOC é se tornar um Centro de Recursos Biológicos acreditado e usar seus recursos e experiência para se tornar líder mundial no que se refere a acervo de leishmania, com um número expressivo de cepas de referência e isolados originais, gerenciamento de informação associada ao acervo, facilidade de acesso ao material biológico e informações concernentes.

A leishmaniose visceral constitui um importante problema de saúde pública devido a alta quantidade de indivíduos expostos ao seu agente infeccioso e a alta letalidade quando não tratada (WHO, 2010; ALVAR et al. 2012; BRASIL 2014). É causada por protozoários do Gênero *Leishmania*, sendo a *Leishmania infantum* o agente causal nas Américas (MOMEN et al. 1993; FERREIRA et al. 2012), mais especificamente no Brasil. A infecção ocorre através da picada de insetos vetores do Gênero *Lutzomyia*. No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* tem sido demonstrado como o principal vetor (BRASIL, 2013) e a leishmaniose visceral humana e animal se encontra em plena expansão (TONINI et al. 2012; BARATA et al. 2013).

No ambiente silvestre, a transmissão ocorre entre o vetor, animais reservatórios como marsupiais, edentados e canídeos silvestres, e o homem como hospedeiro acidental (WHO 2010; BRASIL 2014). No ciclo de transmissão urbano, os cães domésticos são considerados reservatórios principais e a detecção de casos caninos precede o surgimento de casos de leishmaniose visceral humana (LIMA et al. 2012; BELO et al. 2013; LAURENTI et al. 2013). O papel de reservatório dos cães domésticos se dá em parte pela alta carga parasitária observada nestes animais, e disponível para o inseto vetor mesmo em pele sadia (MADEIRA et al. 2009; MENEZES et al. 2013,). A perda de controle da carga parasitária tem sido demonstrada há alguns anos e se correlaciona com uma falha na resposta imune observada nestes animais (SARIDOMICHELAKIS, 2009; MAIA e CAMPINO, 2012).

Com relação à resposta imune na leishmaniose visceral canina, tem sido demonstrado de uma forma geral, que a progressão da infecção para doença ativa é caracterizada por uma marcante resposta humoral, depressão de resposta celular contra o parasita, e surgimento de sinais clínicos (MAIA e CAMPINO, 2012). Trabalhos recentes têm correlacionado a progressão da doença com a desorganização da arquitetura esplênica (SANCHEZ et al. 2004; SANTANA et al, 2008), com o aumento da carga parasitária e com a redução na expressão de citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas (NASCIMENTO et al. 2013).

Em relação ao tratamento em cães com leishmaniose, o Ministério da Saúde não recomenda, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito, visto que as tentativas de tratamento da leishmaniose visceral canina, por meio de fármacos tradicionalmente empregadas (antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de

pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol), tem tido baixa eficácia. O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem baixo efeito na infectividade de flebotômíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (BRASIL, 2014).

A LV está em plena expansão no Brasil e os cães domésticos são considerados reservatórios. Neste sentido, a identificação de cães positivos e a retirada destes animais das áreas endêmicas torna-se importante para o controle da doença. O médico veterinário é um dos profissionais responsáveis pela identificação de cães infectados e notificação dos casos às autoridades de saúde pública. Neste contexto, a sensibilização do estudante de medicina veterinária durante a sua graduação torna-se indispensável para a sua formação. Durante o estágio, foi possível se familiarizar com a problemática da expansão Leishmaniose Visceral Humana e Canina no Brasil, assim como receber treinamento para a cultura e identificação de espécies de leishmania, acompanhamento de necropsias, coleta de amostras de baço e quantificação a carga parasitária de cães provenientes do estado do Rio de Janeiro.

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de estágio pôde-se acompanhar as principais atividades que tangem à pesquisa, desenvolvimento tecnológico, inovação e formação de recursos humanos na áreas de eco-epidemiologia molecular das leishmanioses, como treinamento em qualidade e biossegurança em laboratório de pesquisa, treinamento em isolamento de células de sangue periférico e acompanhamento da rotina do laboratório, acompanhamento das necropsias de cães diagnosticados com leishmaniose visceral encaminhados à eutanásia, participação na coleta de amostras clínicas encaminhadas para os diferentes métodos de diagnóstico e trabalhos de pesquisa, preparo de lâminas contendo cortes teciduais congelados de baço de cães infectados e posterior avaliação histopatológica e análise da expressão de RNAm por PCR quantitativo. Para a realização do estágio no Instituto Oswaldo Cruz foi necessário o desenvolvimento de um projeto de pesquisa, previamente analisado pelos pesquisadores do laboratório e secretaria acadêmica do instituto. Desta forma a maioria das atividades estavam vinculadas ao projeto denominado “Verificação da expressão de marcadores de exaustão e desorganização esplênica em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados”. O objetivo do projeto foi analisar qualitativamente e quantitativamente, nos diferentes compartimentos do baço (zona marginal, bainha linfóide periarteriolar e folículo linfóide), a expressão de moléculas de exaustão (PD-1, CTLA-4, TIM-3 e LAG-3), células CD3⁺, IFN- γ e IL-10, assim como avaliar possível correlação entre os dados obtidos e a sintomatologia, a carga parasitária e a organização da polpa branca esplênica. As principais atividades realizadas encontram-se na tabela 1 e descritas a seguir.

TABELA 1: Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante a realização do estágio curricular supervisionado em medicina veterinária.

Atividades	Número	%
Cortes histológicos de baço em criostato	109	26,8%
Imuno-histoquímica	87	21,4%
Separação de PBMC	81	19,9%
Preparo de soluções	66	16,2%
Necropsias de cães e coletas de baço	41	10%
PCR quantitativo (tempo real)	10	2,5%
Discussão de artigos	10	2,5%
Treinamento em cultura celular	02	0,5%
Treinamento em Qualidade e Biossegurança	01	0,2%
Total	407	100%

2.1 Treinamento em Qualidade e Biossegurança em Laboratório de Pesquisa

O Treinamento em Qualidade e Biossegurança em Laboratório de Pesquisa é requisito básico para a realização de estágio no instituto, sendo composto por aulas online, práticas e um teste de conhecimentos, visando oferecer as recomendações mínimas necessárias para o ingresso nos Laboratórios de Pesquisa do IOC, dentro das normas de gestão da biossegurança, qualidade e de proteção ambiental, para que o aluno ou pesquisador possa desenvolver um trabalho com segurança e confiabilidade nos resultados. O conteúdo abordou os seguintes temas: acidentes de Trabalho: atendimento e notificação; Agenda Ambiental na Administração Pública; Bioética e Biossegurança; Boas Práticas de Laboratório; Condutas Laboratoriais; Contenção em Biossegurança: Barreiras primárias e secundárias; Desinfecção e esterilização

em Ambientes Laboratoriais; Gerenciamento de Resíduos; Gestão de Biossegurança no IOC; Riscos Laboratoriais; Transporte de Material Biológico dentro do campus da Fiocruz e Transporte externo de Material Biológico.

Este treinamento está inserido no Programa de Capacitação Profissional do IOC, e foi elaborado de forma a atender o foco no desenvolvimento institucional, através do investimento educacional dos profissionais, tendo por definição que profissional é toda pessoa que desenvolve atividades laboratoriais no âmbito do IOC, independente de seu vínculo (incluindo servidor, terceirizado e/ou bolsista) e a abordagem e alinhamento de conteúdos programáticos compatíveis às atividades exercidas no IOC, permitindo a aquisição/incorporação de informações e conhecimentos relacionados à política do IOC referente à gestão da Qualidade, Biossegurança e gestão Ambiental.

2.2 Treinamento em isolamento de células de sangue periférico e baço

O treinamento foi realizado através do acompanhamento da técnica realizada por alunos da pós-graduação, após o aprendizado pode-se desenvolver o isolamento de células paulatinamente. Para o desenvolvimento do isolamento e separação de PBMC, as células foram separadas após centrifugação em Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, Sigma) durante 20 minutos, 20 °C a 2.400 rpm. Realizou-se o recolhimento do anel de células mononucleares com uma pipeta de Pasteur, que foram submetidas a duas lavagens em PBS (Sigma, USA) por 10 minutos, 2.000 rpm à 4 °C. Por fim, as células foram congeladas em soro fetal bovino (SFB - Hyclone) e 10% DMSO (Sigma, USA), 1 hora -20 °C, 2 horas -80 °C, e em seguida armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

As células do baço foram isoladas após maceração do fragmento de tecido em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% SFB (Hyclone), 10 mm HEPES, 1.5 mm L-glutamina e antibióticos (200 U/ml penicilina e 200 µg/mL estreptomicina). Após maceração, a suspensão de células foi decantada por 5 minutos em banho de gelo, e o sobrenadante

submetido a duas lavagens por 10 minutos, 2.000 rpm à 4 °C. As células separadas foram congeladas como descrito acima até o momento do uso.

2.3 Acompanhamento das necropsias de cães diagnosticados com Leishmaniose Visceral e Diagnóstico

Cães provenientes do município de Barra Mansa, no estado do Rio de Janeiro, com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral e encaminhados para a eutanásia compulsória no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da FIOCRUZ, onde a eutanásia foi realizada pelos médicos veterinários do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, utilizando 1,0% (1,0 mg/Kg) de Thiopental (Thiopentax®, Cristália) intravenoso. Após a detecção de ausência de reflexo córneo, induzido por anestesia profunda, administrou-se 10 mL de iodeto de potássio 19,1% (Isofarma) intravenoso. O material a ser avaliado foi obtido durante a necropsia dos animais, momento em que foram coletadas as amostras do baço e sangue periférico, assim como os dados clínicos.

A avaliação clínica foi realizada por dois médicos veterinários e pelos estagiários, considerando os 8 típicos sinais clínicos da LVC: dermatite, onicogribose, conjuntivite, emagrecimento, alopecia, linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia (Figura 1). Cada sinal clínico foi avaliado em uma escala variando de 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) a 3 (grave) pontos segundo Quinnell et al. (2001). A classificação final foi dada pela soma dos pontos obtidos, podendo o animal ser assintomático (0 a 2 pontos), oligossintomático (3 a 6) e polissintomático (7 a 18), representado no quadro 1.



FIGURA 1 - Imagens dos sinais clínicos observados e aplicados na pontuação por score de Cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. (A) Onicogrifose, (B) Dermatite, (C) Alopecia, (D) Emagrecimento, (E) Ceratoconjutivite, (F) Linfadenopatia. Fonte: Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos INI – Fiocruz.

QUADRO 1 - Pontuação por score dos sintomas clínicos observados em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Fonte: Quinell et al., 2001.

Classificação dos animais naturalmente infectados	
Score Clínico	
Assintomático	0 a 2
Oligossintomático	3 a 6
Polissintomático	A partir de 7

2.3.1 Aspectos éticos

As amostras biológicas utilizadas foram oriundas de necropsias realizadas pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-

DERMZOO – INI - FIOCRUZ) de cães diagnosticados como leishmaniose visceral e encaminhados para a eutanásia. Não houve experimentação animal e, portanto, não havendo necessidade de encaminhamento para avaliação ética segundo orientação do Comitê de Ética em Uso de Animais da FIOCRUZ.

2.3.2 Análise histopatológica

Fragmentos teciduais do baço foram coletados durante o acompanhamento das necropsias, acondicionados durante 24 horas em freezer -30 °C, seguido de armazenamento em nitrogênio líquido (Figura 2) e posteriormente fixados em solução tamponada de formol 10% (Merck) e inseridos em parafina. Cortes com 5 µm de espessura foram afixados em lâminas de microscopia e corados com hematoxilina e eosina para posterior análise em microscópio óptico (Zeiss), representado na Figura 3. Organização do tecido linfóide esplênico da polpa branca, zona marginal e polpa vermelha foram analisados como descrito por Santana et al. (2008). Os parâmetros avaliados foram: periesplenite (ausência, pouco, médio, intensa), presença de granulomas (ausência, pouco, médio, intenso) e grau de organização da polpa branca. Neste último caso foi considerada organizada a polpa branca que apresentou bainha periarteriolar, centro germinativo, zona do manto e zona marginal distintos. Pouco desorganizada, aquela com alguma mudança hiperplásica ou hipoplásica levando a perda de definição de alguma das regiões da polpa branca. Moderadamente desorganizadas, aquelas com polpa branca evidente, porém suas regiões são pouco individualizadas ou indistintas. Intensa desorganização quando a estrutura folicular foi pouco distinguível da polpa vermelha e da área de células T. Realizou-se a quantificação do número de folículos linfóides e número de granulomas por mm² de tecido.



FIGURA 2 - Coleta de tecido de baço em nitrogênio líquido. Fonte: Arquivo Pessoal.



FIGURA 3 - Preparo de lâminas histológicas em criostato. Fonte: Arquivo Pessoal.

2.3.3 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica tem como função reconhecer antígenos e assim identificar e classificar células de interesse para diagnóstico e/ou pesquisa. A visualização do complexo antígeno-anticorpo é possível através do acréscimo de um fluorocromo conjugado ao anticorpo, que pode então ser observado ao microscópio óptico, ou alternativamente uma enzima, cujo produto de reação também pode ser visualizado.

Para a imuno-histoquímica indireta, utilizou-se cortes de baço com 5 µm de espessura, que foram fixados com acetona P.A. (Merck) em lâminas silanizadas (Dako, Carpinteria, CA, EUA). A técnica foi realizada como descrito por Morgado et al. (2010). Posteriormente hidratou-se em PBS durante 10 minutos, seguido da inibição da peroxidase endógena com solução contendo peróxido de hidrogênio (Dako) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram submetidos a duas lavagens em PBS durante 5 minutos cada. Para a inibição de ligações inespecíficas os cortes passaram a incubação em solução contendo 0,4% BSA por 20 minutos a temperatura ambiente. O excesso de solução de bloqueio foi descartado e posteriormente adicionados os anticorpos primários para detecção de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ (Dako), citocinas (IFN-γ, IL-10) (Serotec); proliferação (Ki-67) (eBioscience); marcadores de exaustão CTLA-4 e TIM-3 (Abcam); e anti-*Leishmania infantum* de coelho por 18 horas à 4 °C. O controle da reação foi realizado pela supressão do anticorpo primário em pelo menos um dos cortes teciduais. Ao término da incubação, realizou-se 2 lavagens em solução PBS, 5 minutos cada, seguido de incubação com o anticorpo secundário biotilado (Dako) por 25 minutos, e mais 2 lavagens com PBS. Os cortes passaram então a incubação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase por 25 minutos. Após 2 lavagens com PBS, passou-se a revelação com o kit AEC (Invitrogen). Após a visualização da marcação em microscópio óptico, a reação foi interrompida com água tipo II, e feita a contra coloração com hematoxilina de Meyer (Sigma) seguido da montagem em Faramount medium (Dako). Os cortes foram avaliados em microscópio óptico, e os resultados expressos em percentual de células positivas ou percentual de campos marcados dependendo da molécula avaliada. Avaliou-se no mínimo 500 células ou 20 campos em aumento 400X.

2.3.4 Análise da expressão de RNAm de PD-1, PD-L1 e LAG-3 por PCR quantitativo (PCRq)

Após o acompanhamento e instruções sobre PCR quantitativo (Figura 4), o RNA total foi extraído de 50-100mg de tecido de baço utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen). Realizou-se o tratamento com DNase (Ambion) para a eliminação de qualquer DNA genômico contaminante na amostra. Para a síntese do DNAc, 1,0 µg de RNA submeteu-se a transcriptase reversa na presença de oligo (d) T primers de acordo com as recomendações do kit High Capacity (ThermoFisher). A reação de transcrição reversa foi realizada em duplicata, e controle da contaminação com DNA realizou-se através de tubos de reações sem a enzima transcriptase reversa. Para a PCRq foram preparados tubos em triplicata contendo 300 nM de primers. Os primers usados foram os descritos por Prina et al. (2007). Utilizou-se 1xSYBR GREEN máster mix (Applied Biosystems) e 4 µL de DNAc em volume final de 20 µL. Utilizou-se 10 minutos à 95°C de ativação, seguido de 40 ciclos de desnaturação e anelamento/extensão (95 °C por 10 segundos e 58 °C por 1 minuto) em termociclador Step One Plus (Applied Biosystems). A análise dos resultados de quantificação foi realizada de acordo com o descrito por Cavalcanti e colaboradores (2015).

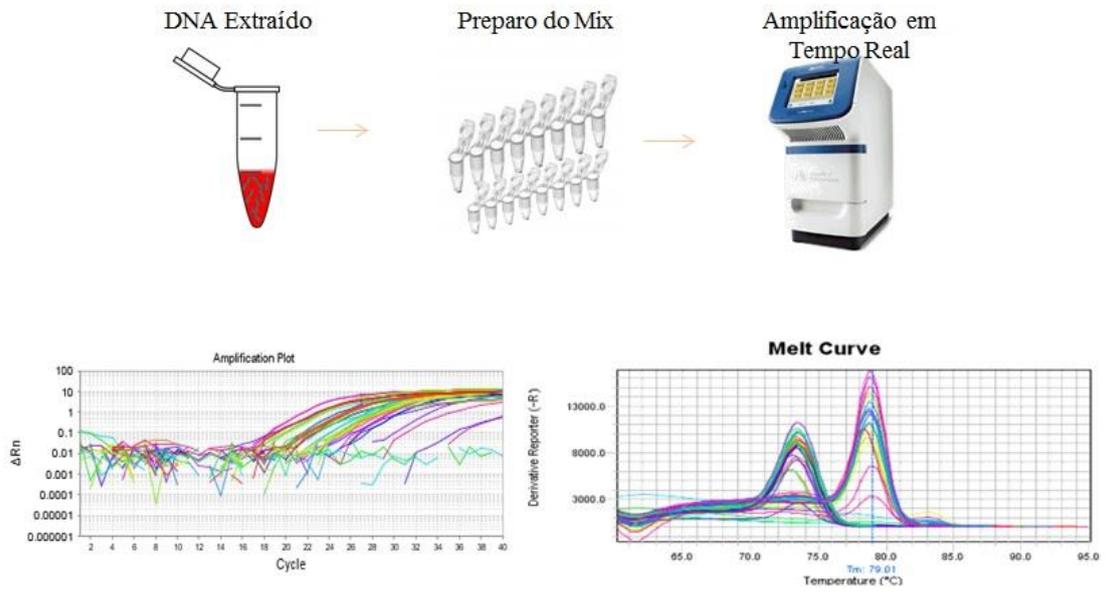


FIGURA 4 - Esquema PCR Quantitativo. Fonte: LPL, 2015.

3 DISCUSSÃO

3.1 Análise da arquitetura esplênica, sintomatologia e carga parasitária

As análises e resultados descritos abaixo fazem parte do projeto intitulado “Verificação da expressão de marcadores de exaustão e desorganização esplênica em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados”, assim como da rotina do LPL e CLIOC e foram desenvolvidos e/ou acompanhados durante o estágio supervisionado.

Durante o período de estágio 41 animais com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral canina foram encaminhados para eutanásia e posteriormente acompanhados durante a necropsia. De acordo com a sintomatologia, os animais foram divididos em: assintomáticos (n=13); oligossintomáticos (n=15); polissintomáticos (n=13). Em relação a organização da polpa branca esplênica observamos três animais contendo polpa branca organizada, oito animais pouco desorganizados, quinze apresentando média desorganização e quinze intensamente desorganizados (Figura 5). Os resultados obtidos estão expostos na figura 6.

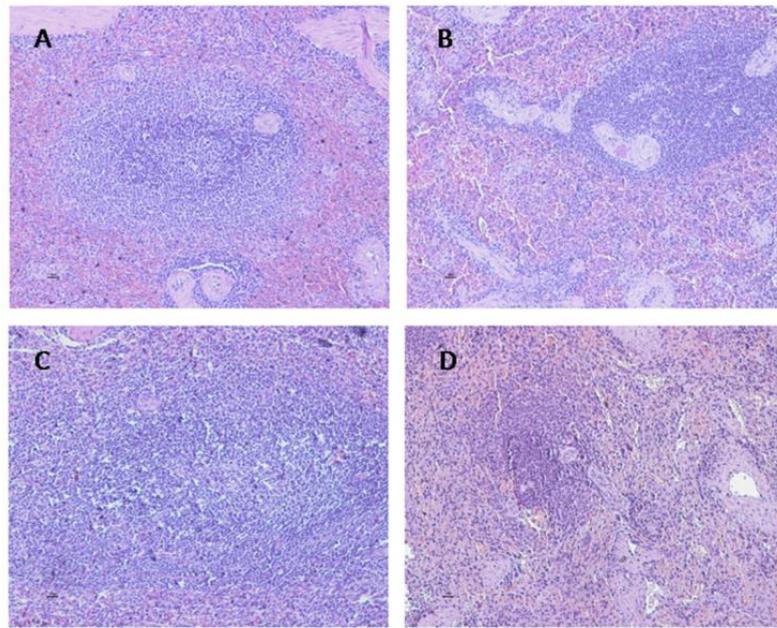


FIGURA 5 - Diferentes níveis de organização da polpa branca esplênica de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. (A) Polpa branca organizada, (B) pouco desorganizada, (C) média desorganização e (D) intensa desorganização. Aumento 100x. Hematoxilina e eosina. Fonte: Arquivo pessoal.

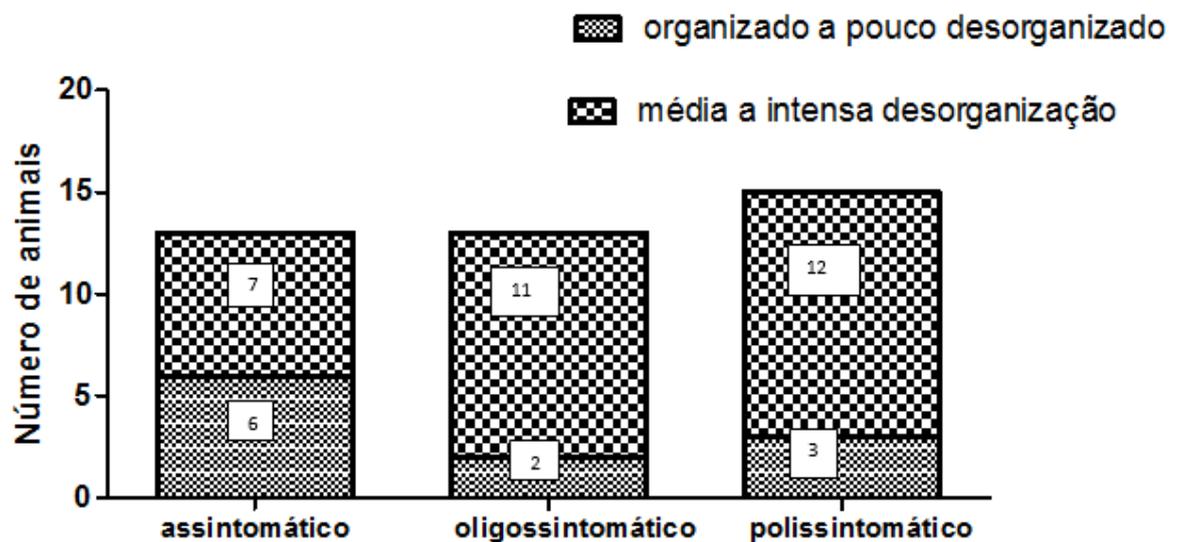


FIGURA 6 - Número de animais presentes nos diferentes grupos de acordo com a sintomatologia e sua relação com o grau de organização da polpa branca.

Foram quantificados os folículos de células B por área de tecido, tendo sido observada a redução destes de acordo com o grau de desorganização da polpa. Observou-se também uma

tendência de associação entre a presença de sinais clínicos e a desorganização da polpa branca esplênica.

Extraíu-se o DNA de fragmentos de baço e a quantificação da carga parasitária de todos os animais. Não foram observadas correlações entre a carga parasitária e a sintomatologia, assim como entre a carga parasitária e a organização da polpa branca esplênica. Porém, detectou-se diferença significativa na carga parasitária quando comparamos os animais que apresentavam granulomas com aqueles que não apresentavam granulomas (Figura 7A-B).

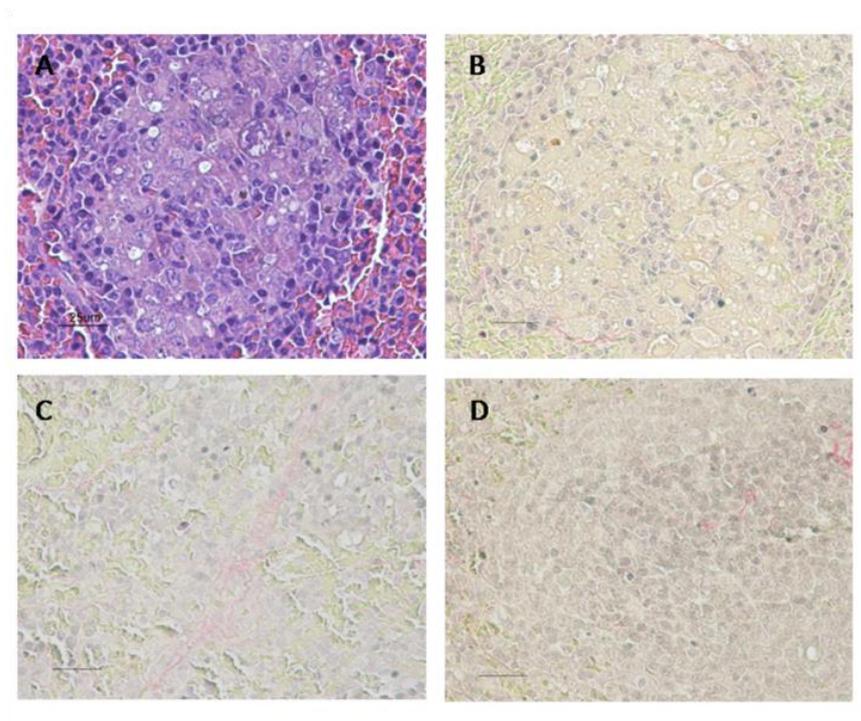


FIGURA 7 - Análise histopatológica do baço de cães naturalmente infectados. (A) Granuloma (HE), (B) granuloma e colágeno, (C) colágeno na polpa vermelha e (D) colágeno na polpa branca. Aumento 400x. A - hematoxilina e eosina; B-D - vermelho de picrosirius. Fonte: Arquivo pessoal.

A expressão de colágeno total variou de 0,1 a 9,4% de área marcada (Mediana 2,28%) (Figura 7 B-D). Não observamos correlações significativas entre a expressão de colágeno total (picrosirius) e a sintomatologia, assim como com a organização do baço, a presença de granulomas e a carga parasitária.

Através da técnica de imuno-histoquímica, foram detectados os marcadores de exaustão TIM-3 e CTLA-4, além da expressão de linfócitos CD-3 e citocinas (IFN- γ e IL-10), expostos na figura 8.

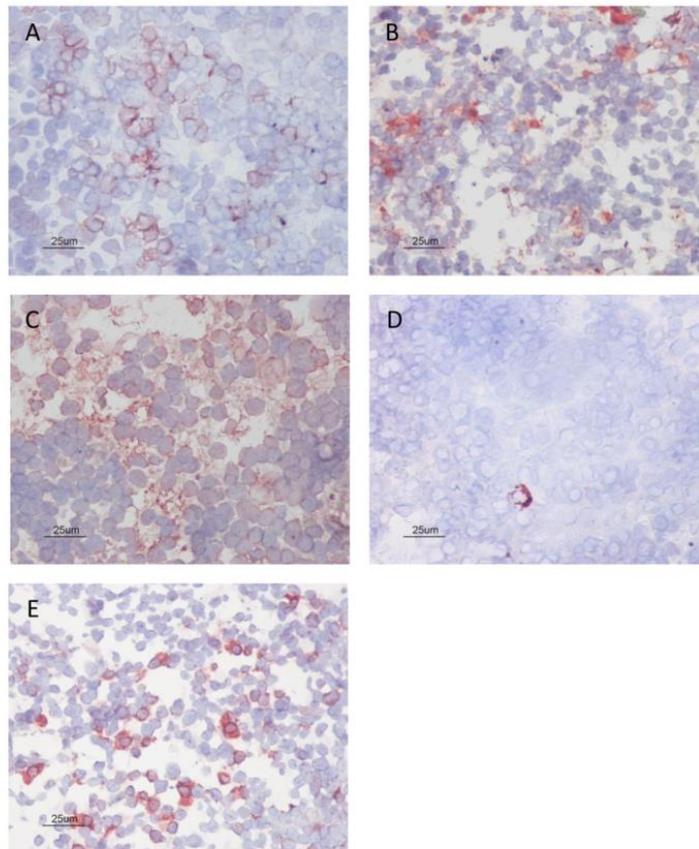


FIGURA 8 - Identificação através de imuno-histoquímica da presença de (A) células CD3⁺, (B) CTLA-4⁺, (C) TIM-3⁺, (D) IL-10⁺ e (E) IFN-γ⁺ no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Fonte: Arquivo pessoal.

3.2 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

No passado, para inquéritos em saúde pública os exames disponíveis para diagnóstico sorológico eram a RIFI e o ELISA, que expressam os níveis de anticorpos circulantes. A RIFI tem sido utilizada amplamente para o diagnóstico de várias doenças parasitárias, podendo apresentar reações cruzadas principalmente com a leishmaniose tegumentar americana e a doença de Chagas. O resultado é considerado sororreagente quando apresenta título igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:40. O ELISA constitui-se na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de leishmania obtidos pela cultura *in vitro*. O antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos, como o controle do

teste e das amostras são posteriormente adicionados. A presença de anticorpos específicos se fixará aos antígenos no soro. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos, produzindo um produto com coloração que poderá ser quantificado por espectrofotometria. O resultado é considerado sororreagente a partir da apresentação do valor da densidade ótica igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte (Cut-Off) do resultado do controle negativo. Os exames sorológicos devem ser realizados nos laboratórios centrais estaduais (LACENs) ou nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) municipais (BRASIL, 2014).

Atualmente, os métodos de diagnóstico sorológico da LVC recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral para os órgãos de saúde pública no Brasil são o teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP) como triagem e o Elisa como confirmatório, utilizados na rotina e nos inquéritos de cães em municípios onde já houve registro da doença. Os lotes de TR-DPP e Elisa, produzidos pelo laboratório da Bio-Manguinhos Fiocruz-RJ, além de passarem por controle de qualidade da própria fundação, antes de serem disponibilizados ao Ministério da Saúde, são enviados ao Laboratório de Referência Nacional e passam por rigorosos testes de qualidade. Lotes com sensibilidade e especificidade inferior a 90% não são liberados para o uso em inquéritos de saúde pública, diferentemente dos kits diagnósticos utilizados pela rede privada que não passam por um intenso controle de qualidade externo (DONATO, 2013).

O isolamento em meio de cultura é considerado padrão ouro no diagnóstico, pois atua confirmando o diagnóstico clínico e também preserva o parasito isolado para o uso em outras pesquisas, como identificação de espécies de leishmania por técnicas de biologia celular e molecular (VEGA-LÓPEZ, 2003; IHALAMULLA; RAJAPAKSA e KARUNAWEERA, 2005).

Em diversos meios de cultura, o parasito cresce relativamente bem, principalmente à temperatura ambiente (GONTIJO e CARVALHO, 2003). Os meios mais empregados para o isolamento de amostras são bifásicos, compostos por uma fase sólida de ágar sangue e uma líquida dispostos em tubo de vidro (IHALAMULLA; RAJAPAKSA e KARUNAWEERA, 2005). O meio geralmente empregado para isolamento é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle - NNN, acrescido de meio líquido Schneider, suplementado com soro fetal bovino (GONTIJO E CARVALHO, 2003).

A demonstração de cultivo e demonstração direta dos parasitos nas lesões de pacientes são difíceis por diversas razões, como o tamanho limitado da amostra (aspirados ou biópsias)

que podem ser obtidos, o pequeno número de parasitos presentes e especialmente a contaminação secundária por fungos e bactérias (PALOMINO; GUERRA e LUMBRERAS, 1983).

A positividade aumenta quando são realizados cuidados técnicos na coleta, tais como desinfecção prévia da lesão, acondicionamento do material a ser analisado em solução salina com antibiótico, transporte sob refrigeração e processamento da amostra em condições assépticas. Essas medidas reduzem a possibilidade de contaminação, que reduzem o crescimento da leishmania e conseqüentemente prejudicam a possibilidade de isolamento (DACRUZ e PIRMEZ, 2005). A persistência de contaminação de culturas, não somente por bactérias, mas também por fungos prejudica o isolamento de protozoários patogênicos (OKOT-KOTBER, 1985), sendo a contaminação por fungos comum em material obtido de lesões de pacientes (KIMBER et al., 1981). No caso de material obtido de mucosas o isolamento parasitário é muito difícil devido aos contaminantes provenientes da microbiota do paciente. É desejável obter uma cultura que permita o crescimento do protozoário, mas iniba e retarde o crescimento de bactérias e fungos, que são os principais contaminantes, permitindo dessa forma o isolamento dos parasitos (PALOMINO; GUERRA e LUMBRERAS, 1983).

Para reduzir o índice de contaminação secundária das culturas, o que inviabiliza o exame, são acrescentados na cultura antibióticos como benzilpenicilina e estreptomicina (PALOMINO; GUERRA e LUMBRERAS, 1983), porém a escolha da concentração destes fármacos para o cultivo de protozoários tem sido empírico e necessita de padronização e mais estudos para o uso correto (MÄSER et al., 2002). Muitas soluções de antifúngicos e antibióticos não são estáveis e não podem ser estocadas por longos períodos, dessa forma, o conhecimento da estabilidade e viabilidade dessas drogas que são adicionadas aos meios, é de extrema importância, por outro lado, devem se buscar concentrações que sejam ideais, de modo que tais substâncias não provoquem alterações no isolamento e crescimento do parasito (PALOMINO; GUERRA e LUMBRERAS, 1983).

3.3 A Resposta Imune da Leishmaniose Visceral Canina

O cão tem sido alvo de diversos estudos sobre a leishmaniose visceral, não só por apresentar um quadro clínico semelhante ao do humano doente, mas por ter um importante

papel como reservatório da doença. Esse hospedeiro animal apresenta variações quanto à manifestação clínica, podendo apresentar-se assintomático, oligossintomático ou polissintomático. No período de estágio, observou-se que a maioria dos animais (n=30) apresentava média ou intensa desorganização da polpa branca esplênica, e que esta desorganização se dava progressivamente pela diminuição do número de folículos de células B por área de tecido. Além disso, foi evidenciada uma tendência na associação entre a desorganização da polpa branca esplênica e a intensidade dos sinais clínicos, o que corrobora os dados da literatura (SANTANA et al 2008).

Por outro lado, não se observou correlação entre a presença de sinais clínicos e a carga parasitária, provavelmente porque outros fatores influenciam no surgimento de sintomas, por exemplo a condição de nutrição, estresse e co-infecções.

Santana et al (2008) verificaram a presença de granulomas apenas nos animais que apresentavam isolamento de parasitas em cultura de amostras de baço e sugeriram que a presença de granulomas no baço poderiam refletir a falha no controle da carga parasitária. Durante o período de estágio, granulomas foram detectados no baço de apenas 6 animais entre os 41 avaliados. Nestes animais a carga parasitária foi significativamente maior. A baixa frequência de granulomas no baço destes cães, assim como a sua presença nos animais que apresentaram maiores cargas parasitárias sugere uma deficiência de resposta efetiva compartimentalizada, uma vez que no fígado a frequência de granulomas foi maior (dado não mostrado). Este dado reforça a hipótese de que o baço funcionaria como um órgão de persistência parasitária onde a formação do granuloma ocorreria apenas quando o estímulo/carga parasitária fosse mais intensa, e mesmo diante disto a resposta seria ineficaz e haveria falha no controle da carga parasitária.

Não houve correlações entre a intensidade de colágeno e a carga parasitária, a sintomatologia e a organização da polpa branca esplênica. Este resultado pode ser explicado pela alta probabilidade destes animais estarem em uma fase inicial de infecção, uma vez que a expressão de colágeno foi baixa (menor que 10%) e normalmente tende a ser alta em infecções mais avançadas (SILVA et al 2013). Ratificando a hipótese de infecção recente, as medidas de diagnóstico e retirada dos animais infectados das áreas endêmicas no Rio de Janeiro tem sido realizada rotineiramente em colaboração entre o CCZ-RJ e o LAPCLIN-DERMZOO-INI-FIOCRUZ. Assim, no Rio de Janeiro os animais infectados têm se mantido por pouco tempo na área endêmica, sendo eutanasiados em fase inicial de infecção. Este dado também descarta a hipótese inicial de que a deposição de colágeno seria uma das causas de desorganização do baço, uma vez que não observamos diferenças entre os grupos em relação a deposição do

colágeno, porém foi possível observar os diferentes níveis de desorganização da polpa branca, assim como a expressão dos marcadores de exaustão TIM-3 e CTLA-4. Por outro lado, ainda é cedo para qualquer análise ou conclusão devido ao pequeno número de cães avaliados.

Com relação à resposta imune a leishmaniose visceral canina, tem sido demonstrado de uma forma geral, que a progressão da infecção para doença ativa é caracterizada por uma marcante resposta humoral, depressão de resposta celular contra o parasita, e surgimento de sinais clínicos (MAIA e CAMPINO, 2012). Trabalhos recentes têm correlacionado a progressão da doença com a desorganização da arquitetura esplênica (SANCHEZ et al. 2004; SANTANA et al. 2008; SILVA et al. 2013.), com o aumento da carga parasitária e com a redução na expressão de citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas (NASCIMENTO et al. 2013).

Barber et al. (2006), estudando o modelo de infecção viral crônica, observaram que o processo de exaustão imunológica se manifestava nos estágios iniciais de infecção e cursava com o aumento da expressão da molécula de superfície PD-1 induzida pelo patógeno. A expressão de PD-1 é induzida por estímulo antigênico repetido em linfócitos T e B, e por isso este estado de não responsividade é denominado exaustão (EICHBAUM 2011; RODRIGUES et al. 2014). Seu ligante, PD-L1, é constitutivamente expresso pelos linfócitos B, T, macrófagos e células dendríticas no baço (EICHBAUM, 2011). A ativação do PD-1 induz apoptose, inibe proliferação celular e produção de citocinas (JOSHI et al. 2009). Barber et al. (2006) ainda demonstraram que a exaustão podia ser revertida *in vivo e in vitro*, pela administração de anticorpos específicos para seu ligante (PD-L1) levando à recuperação da capacidade proliferativa pelas células CD8⁺, secreção de citocinas, eliminação de células infectadas e redução da carga viral. A expressão de PD-1 e/ou CTLA-4 por células CD8 de sangue periférico e baço já foi demonstrada em indivíduos/pessoas com Leishmaniose Visceral (GAUTAM et al. 2013) e em camundongos experimentalmente infectados com *L. donovani* (JOSHI et al. 2009; MURPHY et al. 1998.). A administração de anticorpos bloqueadores de CTLA-4 *in vivo* levava ao aumento da frequência de células produtoras de IFN- γ e IL-4 no fígado e baço dos animais, assim como acelerava o desenvolvimento de resposta granulomatosa hepática associado a redução da carga parasitária (MURPHY et al. 1998). Joshi et al (2009) observaram que o surgimento de células CD8⁺ com perfil de exaustão era acompanhado de redução de citocinas inflamatórias. Ainda foi demonstrado que o bloqueio destes receptores não influenciava a produção de IFN- γ , porém, no modelo murino experimental, o bloqueio de PD-L1 (B7-H1) levou ao controle da carga parasitária mesmo com as citocinas inalteradas. Na avaliação de células esplênicas de pacientes com leishmaniose visceral, os bloqueios isolados das vias PD-

1/PD-L1 ou CTLA-4 não alteraram a produção de IFN- γ e nem a sobrevivência parasitária *in vitro* (GAUTAM et al. 2013).

Recentemente, Esch et al. (2013) utilizando cães com leishmaniose visceral, observaram a expressão de PD-1 em células CD4 e CD8 de sangue periférico. Estas células apresentavam capacidade reduzida de proliferação celular, assim como expressão de IFN- γ . Verificaram também que o bloqueio da via *in vitro* com PD-L1 recuperava em parte as funções efetoras da célula T, como por exemplo, a capacidade de proliferação celular e a expressão de intermediários reativos de oxigênio, mas não de expressão de citocinas. Como consequência a carga parasitária pôde, pelo menos em parte, ser controlada pelos monócitos *in vitro*. Tem sido demonstrado no modelo murino de infecção experimental que a resposta imune na leishmaniose visceral é órgão-dependente: no fígado a infecção é autolimitada, porém no baço são mantidas amastigotas detectáveis por toda a vida do animal, sendo considerado, portanto um órgão reservatório para o parasita (KAYE et al. 2004). Dado semelhante tem sido observado em cães naturalmente infectados: enquanto no fígado é possível a observação de reação granulomatosa, no baço a formação de granulomas é ausente ou tardia (SANCHEZ et al. 2004).

3.4 Treinamento em Qualidade e Biossegurança em Laboratório de Pesquisa

O elevado número dos profissionais da área de saúde que estão submetidos a diversas situações de riscos biológicos, químicos e físicos nos ambientes de estudo e trabalho, torna-se o treinamento em biossegurança fundamental. É de extrema importância para que o estagiário desenvolva suas práticas laboratoriais com mais segurança e conhecimento. Conforme Aprile e Barone (2006), as empresas e centros de pesquisa para a consecução de patamares de qualidade, produtividade e competitividade, necessitam contar com profissionais preparados e qualificados, abrindo o debate para a responsabilidade tanto por essa formação, se da escola, da empresa ou do próprio aluno ou funcionário, como também a incorporação de novos requisitos profissionais, apoiado numa educação básica e na ampliação de conhecimentos de biossegurança.

Nesse sentido, insere-se a educação profissional, que objetiva a formação, qualificação e habilitação do profissional, orientada aos problemas mais relevantes da sociedade. Os profissionais devem desenvolver e promover competências no campo da tomada de decisões e

habilidades para avaliar, sistematizar e decidir a conduta mais apropriada, essa realidade afeta também os trabalhadores do setor terciário, seguimento que envolve a prestação de serviços às empresas e aos consumidores finais e, principalmente, aqueles que desenvolvem atividades na área da saúde, como por exemplo aqueles que trabalham com realização de consultas, exames diagnósticos, cirurgias, aplicação de medicamentos, entre outras e, onde a biossegurança insere-se como temática obrigatória, devido aos riscos, exigindo uma constante qualificação profissional (FEUERWERKER, 2003).

Segundo Neves e colaboradores (2006), educar é envolver o indivíduo em sua totalidade, considerando as variáveis da cultura e história de cada um. Desta forma, em relação à biossegurança, entendida como ação educativa que tem como objetivo prevenir acidentes na área de saúde, os autores afirmam que a ela não deve ser resumida a treino e introjeção de normas, visto que essa compreensão coloca importantes implicações à saúde do trabalhador, uma vez que considera os agentes como sujeitos da aprendizagem. Nesse sentido, é de extrema importância destacar que, mais do que normatizar, é preciso comprometimento de uma organização/empresa/instituição com a formação do seus alunos e/ou funcionários para que os espaços e as práticas atendam aos requisitos necessários para a redução dos riscos.

Portanto, conhecer e entender os processos de ensino da biossegurança é um relevante instrumento estratégico-pedagógico, para diminuir a defasagem atual entre o ambiente da escola e o do trabalho, no que se refere à biossegurança. Este fato influencia, a formação profissional e acadêmica nessa área e com impactos significativos no mercado de trabalho atual (COSTA, 2005).

4 CONCLUSÕES

Apesar dos intensos estudos já realizados, muito pouco ainda se sabe sobre possíveis fatores que podem estar envolvidos na evolução das leishmanioses para a cura clínica e a proteção contra recidivas e reinfecções. As leishmanioses permanecem como uma das doenças parasitárias de grande impacto para a humanidade. Pode-se afirmar que ainda há muitas questões não respondidas, e pensar sobre elas, além de ser um bom exercício, é acima de tudo uma necessidade. Estudos sistemáticos avaliando vários aspectos (clínicos e laboratoriais) poderiam trazer subsídios para o conhecimento da dinâmica do processo infeccioso.

Após a realização do estágio supervisionado realizado no laboratório de pesquisa em leishmaniose, coleção de leishmania do Instituto Oswaldo Cruz e laboratório de referência nacional para tipagem de leishmania, pertencentes ao Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, pode-se afirmar que os objetivos e perspectivas foram superados, pois durante este período foi possível acompanhar a execução de pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação nas áreas de eco-epidemiologia molecular, diagnóstico e acervo de leishmanioses, colocando assim em prática os conhecimentos adquiridos durante a formação acadêmica. Além disso, a convivência direta com a pesquisa científica permitiu uma formação mais crítica na área, gerando um interesse ainda maior pela mesma e a certeza do caminho a ser seguido após a finalização do curso. Assim, o estágio proporcionou um crescimento acadêmico, profissional e pessoal como futuro Médico Veterinário.

REFERÊNCIAS

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, v. 7, p. 1-12, 2012.

APRILE, M. R.; BARONE, R. E. M. Educação profissional no Brasil e opções metodológicas de pesquisa: elementos para o debate. **Boletim Técnico do Senac**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 57-67, 2006.

BARATA, R.A. et al.. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 45-51, 2013.

BARBER, D. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, v. 439, p. 682-689, 2006.

BELO, V.S. et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 2182- 2186, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1ª ed. 5ª reimpressão. Brasília: Ministério da Saúde, 2014

BRAZIL, RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 46-49, 2013.

CAVALCANTI, A.S. et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. **PLoS One**, v. 10, p. 251 a 256, 2015

COSTA, M. A. F. Construção do conhecimento em saúde: o ensino de biossegurança em cursos de nível médio na Fundação Oswaldo Cruz. **Tese (Doutorado em Ensino de Biociências em Saúde) - Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2005.

DACRUZ, A.M; PIRMEZ, C. Leishmaniose tegumentar americana. In: COURA, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 1. ed. Cap. 52. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

DONATO, L.R. et al. Vigilância e controle de reservatórios da leishmaniose visceral no Brasil: aspectos técnicos e jurídicos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 11, n. 2, p. 18-23, 2013.

EICHBAUM, Q. PD-1 signaling in HIV and chronic viral infection--potential for therapeutic intervention? **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3971-3980, 2011.

ESCH, K.J. et al. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **Journal of Immunology**, v. 191, p. 5542-5550, 2013.

FERREIRA, G. et al. The genetic structure of *Leishmania infantum* populations in Brazil and its possible association with the transmission cycle of visceral leishmaniasis. **PloS One**, v. 7, p. 362-368, 2012.

FEUERWERKER, L. C. M. Educação dos profissionais de saúde hoje: problemas, desafios, perspectivas e as propostas do Ministério da Saúde. **Revista da ABENO**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 24-27, 2003.

GAUTAM, S. et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, p. 290-299, 2014.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

IHALAMULLA, R.L.; RAJAPAKSA, U.S.; KARUNAWEEERA, N.D. Microculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions – Sri lankan experience. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**, v. 99, n. 6, p. 571-575, 2005.

JOSHI, T. et al. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8⁺ T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. **PlosPathogens**, v. 5, p. 431-436. 2009.

KAYE, P.M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological reviews**, v. 201, p.239-253, 2004.

KIMBER, C.D. et al. Control of yeast contamination with 5- fluorocytosine in the in vitro cultivation of *Leishmania* spp. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**, v. 75, n. 4, p. 453- 454, 1981.

LAURENTI, M.D., et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p.296-300, 2013.

LIMA, I.D. et al. *Leishmania infantum* chagasi in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, p. 99-107, 2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 541-571, 2012.

MADEIRA, M.F. et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**, v. 87, p.260-262, 2009.

MÄSER, P. et al. An anti-contamination cocktail for the in vitro isolation and cultivation of parasit protozoa. **Parasitology Research**, v. 88, p. 172-174, 2002.

MENEZES, R.C. et al. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p. 206-211, 2013.

MOMEN, H. et al. Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. **Biology Research**, v.26, p. 249-255, 1993.

MORGADO, F.N. et al. Signs of an in situ inflammatory reaction in scars of human American tegumentary leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.32, p.285-295., 2010.

MURPHY, M.L. et al. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. **The Journal of Immunology**, v.161, p. 4153-4160, 1998.

NASCIMENTO, M. et al. Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 153, p. 202-208, 2013.

NEVES, T. P. As contribuições da ergologia para a compreensão da biossegurança como processo educativo: perspectivas para a saúde ambiental e do trabalhador. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 367-375, 2009.

OKERMAN, L.; HENDE, J.V.; ZUTTER, L.D. Stability of frozen stock solutions of beta-ictam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. **Analytica chimica acta**, v. 586, p. 284-288, 2007.

OKOT-KOTBER, B.M. A rapid chromatographic method for elimination of fungal contamination in in vitro cultures of leishmania spp. **Parasitology**, v. 91, p. 1-7, 1985.

PALOMINO, J.C.; GUERRA, H.; LUMBRERAS, H. A Selective liquid Medium for Primary Isolation of South American Leishmanias. **Tropenmed Parasitol**, v.34, p. 229-232, 1983.

PRINA, E. et al. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1307-1315, 2007.

QUINNELL, R.J. et al. Tissue Cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.183, p. 1421-1424, 2001.

RODRIGUES, V. et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, p. 256-260, 2014.

SANCHEZ, M.A. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70. p. 618-624, 2004.

SANTANA, C.C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, p.515-524, 2008.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 471-489, 2009.

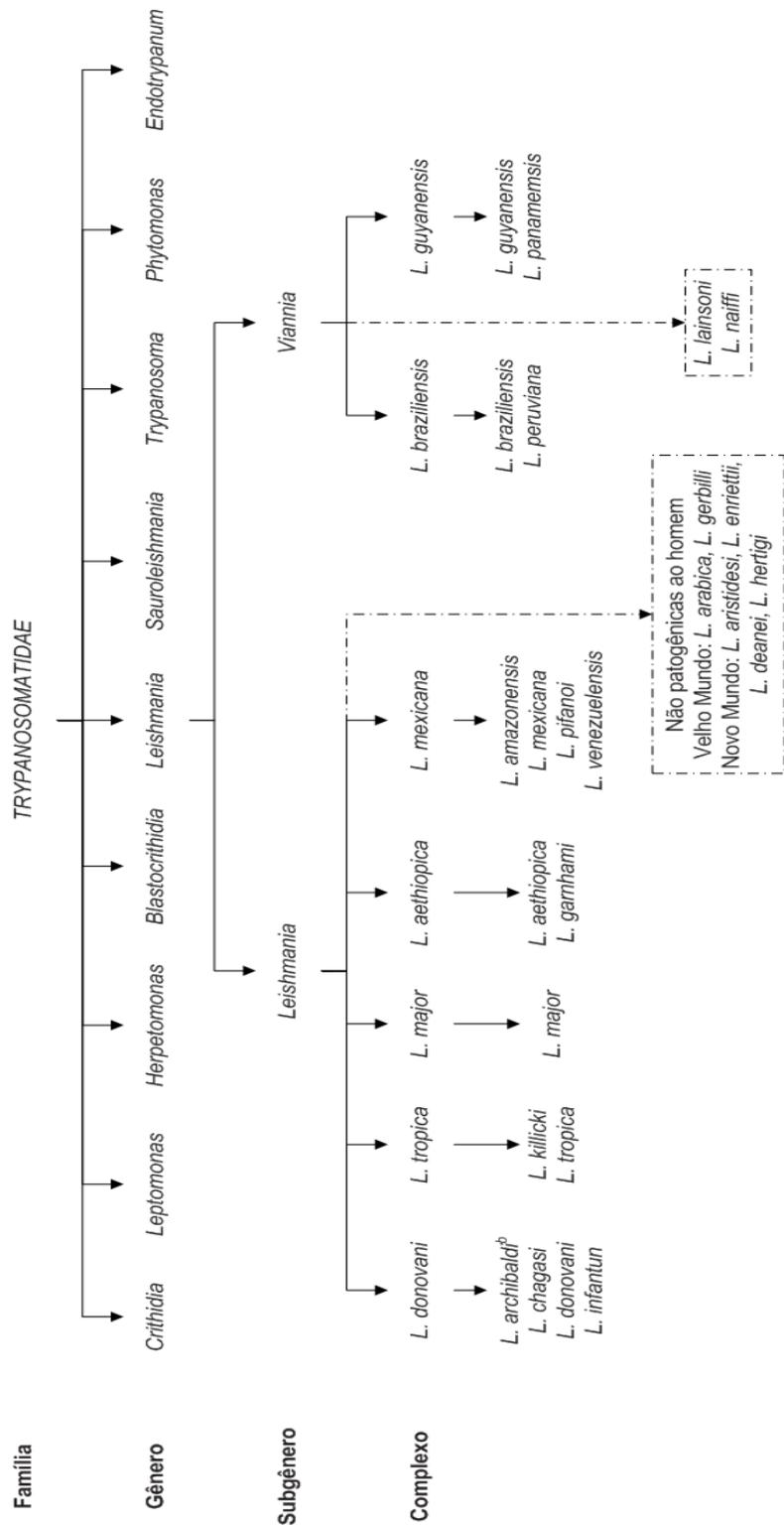
SILVA, L.C. et al.. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, p. 133-143, 2013.

TONINI, M., et al. First description of autochthonous canine visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 754-760, 2012.

VEGA-LOPEZ, F. Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of The Leishmaniases**. WHO technical report series, n. 949, 2010.

ANEXO A – Taxonomia da Leishmania



Fonte: LPL, 2015

ANEXO B – Certificado de Conclusão de Estágio



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

CERTIFICADO



Certificamos que TAINÁ LUÍS DE SOUZA, estudante do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pampa, realizou atividades como estágio curricular supervisionado no Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (LPL), Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) e Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania* (LRNTL), pertencentes ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no período de 16/09/2015 a 07/12/2015, cumprindo uma carga horária semanal de 40 horas, perfazendo um total de 450 horas em atividades teóricas e práticas.

Rio de Janeiro, 02 de dezembro de 2015.

Fernanda Nazaré Morgado

Dra. Fernanda Nazaré Morgado
Supervisora de Estágio

Renato Porrozzi

Renato Porrozzi
Pesquisador
Chefe do Lab. de Pesq. em Leishmaniose
SIAPE: 1991724-IOC/FIOCRUZ

Dr. Renato Porrozzi de Almeida
Chefe do Laboratório