



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL E
OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELA *Leishmania* spp.
NOS FELINOS DOMÉSTICOS DE UMA REGIÃO
PERIURBANA DISTRITO FEDERAL**

NAYARA BREA MARODIN

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL
BRASÍLIA/DF**

FEVEREIRO/2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL E
OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELA *Leishmania* spp.
NOS FELINOS DOMÉSTICOS DE UMA REGIÃO
PERIURBANA DISTRITO FEDERAL**

NAYARA BREA MARODIN

ORIENTADORA: PROF^a.DR^a.GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 035/2011

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2011

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MARODIN, N.B., Estudo da Avaliação Laboratorial e Ocorrência da infecção por *Leishmania* spp. nos felinos domésticos de uma região periurbana do Distrito Federal. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011,56p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Marodin, Nayara Brea
Estudo da Avaliação Laboratorial e Ocorrência da
infecção pela *Leishmania* spp. nos felinos domésticos
de uma região periurbana do Distrito Federal. / Nayara
Brea Marodin. Orientação de Giane Regina Paludo –
Brasília, 2011. 56p.: II
Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de
Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011

1. *Leishmania* spp. 2. Gatos. 3. Diagnostico. 4. PCR. I.
MARODIN, N.B. II. Título

CDD ou CDU
Agris/FAO



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL E OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO
POR LEISHMANIA SPP. NOS FELINOS DOMÉSTICOS DE UMA REGIÃO
PERIURBANA DO DISTRITO FEDERAL**

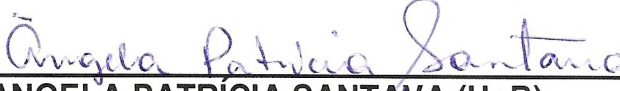
NAYARA BREA MARODIN

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.**

APROVADA POR:



**GIANE REGINA PALUDO (UnB)
(ORIENTADORA)**



**ANGELA PATRÍCIA SANTANA (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)**



**SIMONE PERECMANIS (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

BRASÍLIA, 28 DE FEVEREIRO DE 2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às vítimas da leishmaniose, especialmente os animais.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus que sem ele nada sou.

À minha família, em especial a minha mãe e minha irmã, fonte eterna de amor, apoio, inspiração e fortaleza para mim. Sem elas jamais teria conseguido chegar até aqui.

Ao meu anjo e cachorrinha Melissa (*in memoriam*), pelo companherismo e amor incondicional durante seus 20 anos de vida.

À minha orientadora, professora Giane R. Paludo, pela confiança depositada mesmo sabendo da dificuldade de lidar com o mestrado e um outro emprego, sempre respeitou e me apoiou. Pela disponibilidade de tempo e disposição para me ensinar; pelas idas à Fercal e clínica veterinária para as coletas; por abrir as portas e me apresentar as pessoas certas que me ajudaram no projeto; pelos conselhos e apoio tão importante inclusive na vida pessoal, enfim, este trabalho é fruto de sua dedicação e competência e a convivência que tivemos contribuiu imensamente para me tornar uma profissional mais capacitada e uma pessoa melhor.

Ao médico Cesar Omar Carranza Tamayo, que nos apresentou os agentes comunitários da Fercal, realizou as culturas e forneceu o caminho das pedras em diversas situações, sua tese de doutorado foi bastante útil e permitiu correlacionarmos os dados dos humanos com os dados de gatos.

Aos agentes comunitários da Fercal, pelo trabalho fundamental nas comunidades e pela boa recepção e por dividir conosco sua familiaridade com os integrantes de cada comunidade, o que facilitou muito as nossas visitas.

À toda população da Fercal, pelo apoio ao projeto. Em especial as proprietárias Sylvania e Dona Maria, que confiaram todos os seus gatos sob minha responsabilidade inclusive para os procedimentos de castração que não fizeram parte do projeto e a Dona Ester que financiou a castração de cerca de 30 gatos. Sou muito grata pela confiança e credibilidade depositada por estas 3 mulheres, além da amizade cultivada até hoje.

À minha querida amiga Roberta, por sua preciosa amizade e por me acompanhar em quase todas as idas a Fercal, além da ajuda no processamento das amostras e apoio nas horas difíceis.

À amiga Mari, por compartilhar o interesse no assunto, me fornecendo artigos, me ajudando nas diversas tentativas de seqüenciamento, seu otimismo me inspirou bastante para permanecer firme na caminhada.

À amiga “tia Thais”, pela ajuda nos testes bioquímicos e pelas conselhos tão essenciais, teve grande participação na minha evolução de conhecimentos no laboratório.

À toda Equipe da Clínica Veterinária Empório dos Bichos. As super veterinárias Renata Queiroz, Tati e Silvia forneceram todo o suporte e experiência para as coletas dos tecidos dos gatos positivos. Agradeço também por me apoiar na

castração dos animais visando um controle populacional dos gatos para melhorar a qualidade de vida destes animais.

À Equipe do Laboratório de Patologia Veterinária (FAV/UnB), em especial aos professores Márcio e Luciana, que nos ajudou com a imunohistoquímica, imunocitoquímica, citologia e histologia dos tecidos.

À Equipe do Laboratório do Núcleo de Medicina Tropical (FS/UnB), em especial a técnica Renata que me ajudou nos procedimentos da fase de identificação das espécies e realização da cultura.

À Equipe do antigo Laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia (FAV/UnB), em especial ao Diego, que me tornou uma expert em visualização de bandas em gel de agarose.

À toda Equipe do Laboratório do Patologia Clínica da UnB, uma grande família, não citarei nomes mas a participação das residentes, estagiarias, técnicas e mestrandas que estão atualmente lá ou já saíram do laboratório teve papel muito importante neste projeto, não somente pela contribuição na ajuda nas coletas, processamento das amostras e ensinamentos passados mas também por tornarem o tempo do mestrado muito mais prazeroso devido ao carinho e apoio de todas, jamais esquecerei dos momentos agradáveis que passamos juntas.

Aos colegas de trabalho da Caixa pelo apoio, em especial ao meu chefe Valter.

Às amigas da carinhosa máfia (Alice, Ana, Babu, Bela, Clarinha, Carol, Re, Gabi, Pri, Débis); comunidade secreta (Dinga, Fe, Joana, Katinha e Uana), Flavinha e Lais pela amizade, por me perdoar pelos períodos de ausência durante o projeto e me incentivar e apoiar em todas as horas.

Ao meu namorado Gustavo, que apesar de aparecer em minha vida em um momento tão delicado, final do projeto, me incentivou bastante com seu companheirismo e carinho.

À professora Ângela Patrícia, por aceitar o convite para participação da banca e por disponibilizar seu tempo, compartilhar seu conhecimento e me ajudar nas tentativas de clonagem no laboratório da Biomol. Admiro pela competência e profissionalismo desde a época de graduação, sua confiança depositada e otimismo serviram de motivação para continuar perseverante nos meus sonhos.

À professora Simone Perecmanis, por aceitar o convite para participação da banca mesmo com o imprevisto da ausência da professora Nadia Almosny. Agradeço antecipadamente seu conhecimento e disponibilidade dispensada.

Não podia deixar de colocar aqui os meus sinceros agradecimentos não às pessoas, mas aos seres que tenho profundo respeito e passaram por minha vida neste período e deixaram um pouco deles em mim, não só na minha memória mas a certeza de que há sentimentos verdadeiros que o ser humano está muito longe de conhecer, aos GATOS.

*“As pessoas são irracionais, ilógicas e egocêntricas.
Ame-as MESMO ASSIM.*

*Se você tem sucesso em suas realizações,
ganhará falsos amigos e verdadeiros inimigos.
Tenha sucesso MESMO ASSIM.*

*O bem que você faz será esquecido amanhã.
Faça o bem MESMO ASSIM.*

*A honestidade e a franqueza o tornam vulnerável.
Seja honesto MESMO ASSIM.*

*Aquilo que você levou anos para construir,
pode ser destruído de um dia para o outro.
Construa MESMO ASSIM.*

*Os pobres têm verdadeiramente necessidade de ajuda,
mas alguns deles podem atacá-lo se você os ajudar.
Ajude-os MESMO ASSIM.*

*Se você der ao mundo e aos outros o melhor de si mesmo,
você corre o risco de se machucar.
Dê o que você tem de melhor MESMO ASSIM.*

*Veja você que, no final de tudo
Será você ... e Deus.*

E não você...e as pessoas!”

Madre Tereza de Calcutá

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------|------|
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| CAPÍTULO I..... | 1 |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 3. OBJETIVOS..... | 15 |
| 4. REFERÊNCIAS..... | 16 |
| CAPÍTULO II..... | 21 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 23 |
| 3. RESULTADOS | 32 |
| 4. CONCLUSÃO | 46 |
| 5. REFERÊNCIAS..... | 47 |
| CAPÍTULO III..... | 52 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 52 |
| ANEXOS | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Áreas com transmissão de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil de 2007 a 2009. | 6 |
| Figura 2: Imagem fotográfica do procedimento de punção de linfonodos. | 26 |
| Figura 3: Imagem fotográfica do procedimento de punção de medula óssea. | 27 |
| Figura 4: Imagem fotográfica do procedimento de biópsia de pele. | 27 |
| Figura 5: Imagem fotográfica do procedimento de extração de DNA de sangue. | 28 |
| Figura 6: Gel de agarose 2% resultante da eletroforese da PCR para <i>Leishmania</i> spp. utilizando os oligonucleotídeos LBW1, LBW2 e LFW. | 33 |
| Figura 8: Gel de poliacrilamida 6% resultante da eletroforese da RFLP-PCR com <i>Hae III</i> | 39 |
| Figura 9: Gel de 6% de poliacrilamida resultante da eletroforese da RFLP-PCR com <i>Hae III</i> | 39 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Análise da identificação de espécies de <i>Leishmania</i> spp. por meio de RFLP–PCR com a enzima <i>Hae III</i> | 30 |
| Tabela 2. Características demográficas das comunidades avaliadas e presença de LVH e LF. | 33 |
| Tabela 3. Resultado da PCR das amostras de sangue, linfonodos, medula óssea e pele para <i>Leishmania</i> spp. | 34 |
| Tabela 4. Alterações clínicas entre os grupos positivos e negativos para a infecção por <i>Leishmania</i> spp. | 35 |
| Tabela 5. Análise estatística dos hemogramas completos e das bioquímicas séricas dos animais positivos e negativos da área periurbana do DF. | 36 |
| Tabela 6. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma e da bioquímica sérica apresentados por todos os animais positivos e negativos para a infecção por <i>Leishmania</i> spp. | 37 |

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência da infecção por *Leishmania* spp. em felinos domésticos em uma área endêmica para leishmaniose visceral humana e canina do Distrito Federal (Sobradinho II), caracterizar as principais alterações hematológicas, bioquímicas e clínicas da infecção por *Leishmania* spp. e identificar as espécies que acometem os animais infectados. Foram utilizadas amostras de sangue de 89 gatos domiciliados, sem raça definida (SRD), machos e fêmeas de diferentes idades. Os animais foram submetidos a exame clínico e as amostras foram utilizadas para hemogramas, testes bioquímicos e PCR para identificação dos animais positivos. Foram coletadas 10 amostras de linfonodos, medula óssea e pele de animais positivos, utilizados para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. por meio de técnicas moleculares (PCR e RFLP-PCR), parasitológico, imunohistoquímica, imunocitoquímica e cultivo celular. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos positivos e negativos nos hemogramas e testes bioquímicos. Na PCR, foram identificadas 53 amostras de sangue positivas para *Leishmania* spp. (59,55%). Na PCR de outros tecidos, 9/10 amostras de linfonodos e medula óssea foram positivas e 8/10 dos fragmentos de pele foram positivas. Pelo menos um outro tecido também foi positivo além do sangue e, em 7/10 dos animais todos os tecidos testados foram positivos. Todas as amostras foram negativas para as outras técnicas testadas. Por meio da RFLP-PCR foi identificado infecção por *L. infantum* em amostras de sangue e nos outros tecidos. Os resultados encontrados nos permite concluir que a infecção por *Leishmania* spp. ocorre com alta frequência nos felinos domésticos e pode estar presente em áreas onde não há Leishmaniose Visceral Humana; a espécie *L. infantum* é que acomete os felinos domésticos e pode estar presente em diferentes tecidos; que não há alterações hematológicas, bioquímicas e clínicas significativas quando comparados com os animais negativos.

Palavras chaves: *Leishmania* spp, gatos, diagnóstico e PCR.

ABSTRACT

This report had the objective of verifying the incidence of *Leishmania* spp. in domestic cats in an endemic area for human and canine visceral Leishmaniasis in the Federal District (Sobradinho II), to characterize the main hematological, biochemical and clinical alterations caused by *Leishmania* spp. and to identify the species that attack the infected animals. 89 domestic cats' blood samples were used, mixed breed male and female of various ages. The animals went through clinical examination and the samples were used in hemograms, biochemical tests and PCR for identification of the animals who were positive. 10 samples of linfonodes, marrow bone and skin of positive animals were collected and used for diagnosis of the infection for *Leishmania* spp. using molecular technics (PCR and RFLP-PCR), parasitological, immunohistochemistry, immunocytochemistry and cell culture. No differences were observed ($p > 0,05$) between positive and negative groups in the hemograms and biochemical tests. In the PCR, 53 positive blood samples were identified for *Leishmania* spp. (59,55%). In the PCR for other tissues, 9/10 samples of linfonodes and bone marrow were positive and 8/10 of the skin samples were positive. At least one other tissue was positive besides the blood and in 7/10 of the animals all the tissues tested were positive. All the samples were negative for the other techniques used. Using RFLP-PCR, infection by *L. infantum* was identified in blood samples and in the other tissues. The results allows us to conclude that infection by *Leishmania* spp. has a high incidence in domestic cats and can be present in areas where there is no human visceral leishmaniasis. A type of *L. infantum* is what affects domestic cats and can be present in different tissues and that there are no significant hematological, biochemical and clinical alterations when compared with the negative animals.

Key words: *Leishmania* spp, cats, diagnosis and PCR.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença parasitária crônica de grande importância em saúde pública, considerada zoonose re-emergente no Brasil e em outros locais do mundo, que pode levar até a 98% de mortalidade nos casos humanos não tratados (Schubach et al., 2004; Madeira et al., 2006; Reis et al., 2006). Estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas e pelo menos 2 milhões de novos casos são registrados a cada ano. Ao lado de Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão, o Brasil forma um grupo que responde por 90% dos casos de leishmaniose visceral de todo planeta (WHO, 2010).

O agente etiológico da leishmaniose é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, composto por dois grandes grupos: o grupo das leishmanias viscerais e o grupo das leishmanias tegumentares, sendo que aproximadamente 20 espécies e subespécies infectam o homem. Na leishmaniose tegumentar, as espécies de maior importância no Brasil são a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, a *L. (Viannia) guyanensis* e a *L. (V.) braziliensis*, sendo encontradas também as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L.*

(V.) *shawi*. O grupo da leishmaniose visceral é composto pelas leishmanias do tipo L. (L.) *donovani*, L. (L.) *infantum* e L. (L.) *chagasi* (SVS, 2004).

A principal leishmania no Novo Mundo é comumente a *Leishmania (Leishmania) infantum* e o vetor responsável por sua transmissão é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Slappendel et al., 1990; Moreira et al., 2007) ou o *Lutzomyia cruzi* em algumas áreas do país (SVS, 2004; Moreira et al., 2007).

O padrão de transmissão da leishmaniose tem apresentado alterações. Inicialmente era uma doença com predominância de transmissão em ambientes rurais e periurbanos, mas recentemente têm atingido centros urbanos tais como Belo Horizonte (MG), Campo Grande (MS), Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Araçatuba (SP), Palmas (TO) entre outros (SVS, 2004). A partir de 2005, a capital do país e entorno (Distrito Federal) também passaram a fazer parte desta estatística. Segundo dados do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Brasília foram registrados os primeiros casos autóctones de leishmaniose visceral humana acompanhada por casos caninos na região.

A leishmaniose visceral canina (LVC) está presente em diversos estados do Brasil, os sinais clínicos nos cães são muito variados e inespecíficos, dentre os principais, a linfadenopatia, perda de peso e lesões cutâneas são as mais relatadas (Aguilar et al., 2007). No Distrito Federal, as autoridades públicas descartam surto da doença mas a cada ano há aumento da população canina infectada, de 2009 a 2010, a LVC aumentou de 13% para 18% (Maia, 2011). O cão atua como principal reservatório doméstico do parasita, tendo um papel fundamental na expansão da doença em áreas endêmicas. Essa constatação é sustentada pelo fato da leishmaniose visceral ser mais prevalente na população canina do que na humana e, ainda, devido à infecção no homem ser precedida por casos caninos (Slappendel et al., 1990; Ikeda et al., 2003; SVS., 2004). Porém, considerando a marcada urbanização que a leishmaniose tem apresentado nos últimos anos, o envolvimento de outras espécies precisa ser levado em consideração. No ambiente silvestre as principais fontes de infecção são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e tamanduás (*Tamandua tetradactyla*) (Santa Rosa; Oliveira, 1997; Reis et al., 2005). Até recentemente, os gatos eram considerados hospedeiros acidentais da *Leishmania*, porém fortes evidências têm

estabelecido que os gatos também desempenham importante papel epidemiológico na leishmaniose (Simões-Mattos et al., 2005).

Considerando que o cão não é o único fator de risco responsável pela manutenção da dinâmica de transmissão da leishmaniose visceral, estudos relacionados a outros hospedeiros da *Leishmania* spp, bem como a caracterização da doença nestes hospedeiros precisam ser desenvolvidos. Neste sentido, merece destaque a população de felinos domésticos, considerados um dos principais animais de estimação dos grandes centros, cujo número vem crescendo a cada ano nos lares do Distrito Federal, e que até o presente momento pouco se conhece sobre a sua participação ou não na manutenção da leishmaniose visceral no Distrito Federal.

Devido a escassez de dados na literatura referente a infecção por *Leishmania* spp. em felinos domésticos, utilizaremos os dados da doença em cães e caso haja informações sobre o assunto com relação aos gatos, abordaremos geralmente ao final de cada tópico do referencial teórico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Definição, Taxonomia e Nomenclatura

Leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários pertencentes a família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania* spp, divididos em dois subgêneros baseado em seus complexos filogenéticos: *Leishmania* e *Viannia* (Pereira et al., 2008).

As principais espécies responsáveis pelas formas de leishmaniose cutânea (LC), muco-cutânea (LMC) e difusa (LCD) são: *L.(V) braziliensis*, Viannia, 1911; *L.(V.) peruviana*, Velez, 1913; *L. (V.) panamensis*, Laison & Shaw,1972; *L.(V.) guyanensis*, Floch, 1914; *L. (V.) naiffii*, Lainson et al, 1987; *L.(V.) lainsoni*, Silveira et al., 1987; *L. (V.) shawi*, Shaw et al., 1991; *L (L.) amazonensis*, Laison & Shaw,1972; *L (L.) mexicana*, Biagi, 1953. A leishmaniose visceral é a forma mais severa das leishmanioses e é causada pela *L. (L.) infantum*, Nicole, 1908 e *L. (L.) chagasi*,

Cunha & Chagas,1937 (Pereira et al., 2008). Estudos recentes consideram a *L.(L.) chagasi* como espécie idêntica a *L. (L.) infantum* (Dantas-Torres, 2006). No presente trabalho utilizaremos a nomenclatura *L. (L.) infantum*. ou *L. infantum* como agente etiológico da leishmaniose visceral.

No Brasil, a forma visceral é causada principalmente pela *Leishmania chagasi* (SVS., 2003), enquanto a forma tegumentar pelas espécies: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis*; mais recentemente, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania naiffi* e *Leishmania shawi* foram identificadas como novos agentes da doença (SVS., 2006).

Cinco espécies de *Leishmania* spp. já foram relatadas em felinos: *L.mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. As espécies *L. donovani* e *L. (V.) braziliensis* foram inoculadas experimentalmente em gatos e demonstraram a susceptibilidade da espécie felina (Simões-Mattos et al., 2005).

2.2. Aspectos epidemiológicos e Distribuição Geográfica

As leishmanioses são transmitidas por vetores dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, encontrados no Novo e Velho Mundo, respectivamente (Kenner et al., 1999). No Brasil, o vetor responsável por sua transmissão é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Slappendel et al., 1990; Moreira et al., 2007) ou o *Lutzomia cruzi* em algumas áreas do país (SVS., 2004; Moreira et al., 2007).

2.2.1. No Mundo

2.2.1.1. Leishmaniose em humanos

A leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas do mundo, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que ameaça trezentos e cinquenta milhões de humanos em 88 países. A leishmaniose visceral é considerada como doença negligenciada por acometer predominantemente populações menos favorecidas economicamente e ser objeto de escasso investimento para o desenvolvimento de ferramentas de controle, incluindo drogas para o tratamento específico e teste de diagnóstico. A doença estigmatiza e diminui a capacidade dos indivíduos afetados nos cuidados de si próprios e das suas

famílias, o que promove ou piora o estado de pobreza. Estima-se que doze milhões de pessoas estejam infectadas e há dois milhões de novos casos por ano. Ao lado de Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão, o Brasil forma um grupo que responde por 90% dos casos de leishmaniose visceral de todo planeta.

2.2.1.2. Leishmaniose em felinos domésticos

Em 1912 foi diagnosticado o primeiro caso de Leishmaniose felina (LF) por Sergent et al. (1912) na Argélia. Na literatura mundial existem registros de um total de 30 casos até 2005. Destes, 12 (40%) ocorreram no Novo Mundo e 18 (60%) no Velho Mundo. Dentre os detectados no Novo Mundo, um foi na América do Norte e 11 na América do Sul. O Brasil é o detentor do maior número de casos no Novo Mundo, totalizando seis casos (Simões-Mattos et al., 2005).

2.2.2. No Brasil

2.2.2.1. Leishmaniose em humanos

Segundo dados do Ministério da Saúde, de 2003 a 2009 foram registrados 34583 casos humanos de LV no Brasil. Atualmente, há casos distribuídos em 21 Unidades Federativas, atingindo as cinco regiões brasileiras. (SVS, 2010).

Inicialmente era uma doença com predominância de transmissão em ambientes rurais e periurbanos, mas recentemente têm atingido centros urbanos tais como Belo Horizonte (MG), Campo Grande (MS), Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Araçatuba (SP), Palmas (TO) entre outros (SVS, 2004). A Figura 1, mostra as áreas com transmissão de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil de 2007 a 2009.

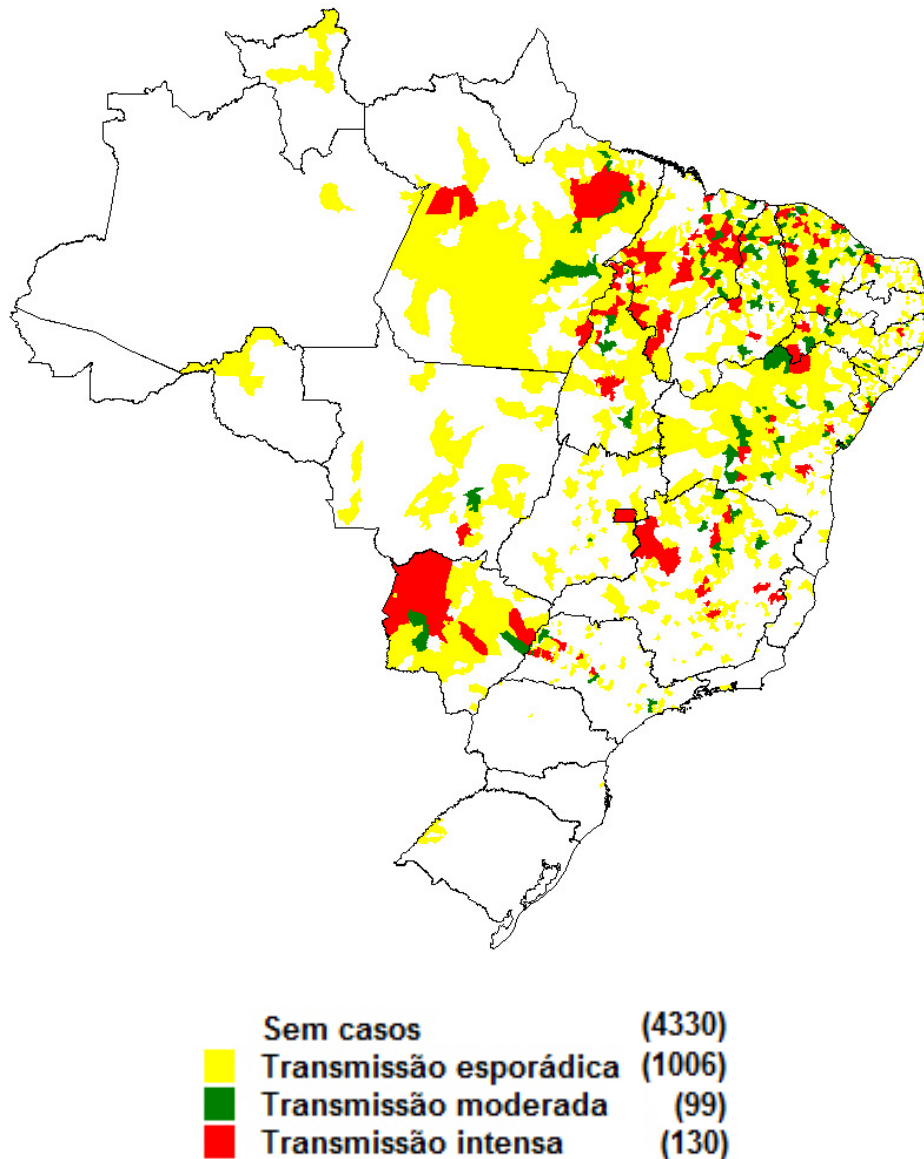


Figura 1: Áreas com transmissão de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil de 2007 a 2009.

Fonte:http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561

2.2.2.2. Leishmaniose em felinos domésticos

Os primeiros casos de LF relatados na literatura no Brasil foram em 2003 nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, em ambos os casos, os animais apresentaram nódulos na região facial, porém portavam espécies diferentes de leishmania, *L. infantum* e *L. braziliensis*, respectivamente (Schubach et al.,2003; Savani et al.,2003). No ano seguinte, foram relatados casos de LF nos estados de

Mato Grosso e Minas Gerais, as espécies encontradas foram *L. amazonensis* e *L. panamensis*, respectivamente (Souza et al., 2005; Passos et al., 2003).

2.2.3. No Distrito Federal

No Distrito federal a LV constitui um grave problema de Saúde pública. Em setembro de 2005 quatro brasilienses se infectaram, desde então a capital do país e entorno (Distrito Federal) que antes eram considerados livres da enfermidade, passaram a fazer parte da estatística de casos de LV com os primeiros casos autóctones de leishmaniose visceral canina acompanhando os casos humanos. Em novembro de 2006, uma menina de seis anos, moradora da Vila Rabelo II, Sobradinho, Brasília-DF morreu em razão da doença (Rodrigues & Goulart., 2006). Em 2009 foram confirmados 60 casos humanos que segundo as autoridades públicas, 54 destes foram de pessoas infectadas em outras regiões. De janeiro a agosto de 2010 a situação piorou, foram 25 novos casos e duas mortes de pessoas que conforme a Secretaria de Saúde do DF se infectaram em Minas Gerais e Paraíba. No mesmo período, 1830 exames sorológicos foram realizados nos cães das áreas consideradas endêmicas (Sobradinho, Fercal e Lago Norte), cerca de 311 animais foram considerados positivos. Dados recentes citam que de 2009 a 2010, a leishmaniose visceral canina aumentou de 13% para 18% (Maia, 2011).

Atualmente, Brasília é classificada pela Secretaria de Vigilância Sanitária como área de transmissão intensa, ou seja, que apresenta média maior ou igual a 4,4 casos nos últimos três anos (SVS, 2010).

2.3. Transmissão

No Brasil, a principal via de transmissão é por meio da picada dos vetores *L. longipalpis* ou *L. cruzi* infectados pela *Leishmania chagasi* (SVS., 2003), porém outras vias alternativas têm sido discutidas, como a ingestão de carrapatos e pulgas infectadas (Coutinho et al., 2005; Ferreira et al., 2009), venérea (Silva et al., 2009), transplacentária (Dubey et al., 2005; Masucci et al., 2003; Rosypal et al., 2005) e transfusão sanguínea (Freitas et al., 2006).

2.4. Ciclo Biológico

A leishmaniose visceral comporta-se como uma zoonose com três elementos envolvidos no ciclo de transmissão: o agente, *L. infantum*; os vetores, inseto do gênero *Lutzomyia*; e os reservatórios, mamíferos e marsupiais. Os humanos seriam hospedeiros acidentais susceptíveis à infecção.

2.4.1. Agente etiológico

Os protozoários do gênero *Leishmania* são microorganismos unicelulares, caracterizados pela presença de um DNA mitocondrial, condensado em uma organela chamada de cinetoplasto. O ciclo de vida é dimórfico, compreendendo a forma flagelada ou promastigota que é encontrada na via digestiva dos flebotomos e a forma aflagelada (amastigosta) encontrada nos fagolisossomos dos macrófagos nos hospedeiros vertebrados.

2.4.2. Vetor

Os flebotomíneos, assim como muitos outros dípteros hematófagos, necessitam de suprimentos de carboidratos que, na natureza, adquirem diretamente da seiva de plantas, néctar e frutas maduras. Para as fêmeas, esses requerimentos são utilizados como complemento por meio da alimentação sangüínea. A hematofagia é um hábito exclusivo das fêmeas, que necessitam do sangue tão somente para a maturação dos ovários e o obtém sugando diversos vertebrados (mamíferos, aves, répteis e anfíbios) (Dias et al., 2003). Estes vetores estão presentes em áreas urbanas e periurbanas, podendo ser encontrados em peridomicílios, granjas, pocilgas, canis, paiois, entre outros ambientes (SVS., 2003).

2.4.3. Reservatórios

O cão atua como principal reservatório doméstico do parasita, tendo um papel fundamental na expansão da doença em áreas endêmicas (Slappendel et al., 1990; Ikeda et al., 2003; SVS, 2004). No ambiente silvestre as principais fontes de infecção são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e tamanduás (*Tamandua tetradactyla*) (Santa Rosa & Oliveira, 1997, Reis et al., 2005). Para Lappin (2006), humanos e gatos são hospedeiros acidentais,

porém fortes evidências têm estabelecido que os gatos desempenham importante papel epidemiológico na leishmaniose.

Promastigotas flageladas desenvolvem-se no flebotómíneo e são inoculadas no hospedeiro vertebrado durante sua alimentação. O protozoário multiplica-se no intestino do vetor e torna-se infectante entre 8 a 20 dias após o início do processo (Desjeux et al., 2004). Ao realizar o repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado, o vetor infectado inocula as formas promastigotas infectantes (promastigotas metacíclicas), que são fagocitadas por macrófagos e se disseminam no corpo (Banuls et al., 2007). Após um período de incubação que pode variar de 1 mês a 7 anos, a forma amastigota (aflagelada) e lesões cutâneas se desenvolvem; os flebotómíneos são infectados durante a alimentação (Jones et al., 2000). Há autores que citam que o período de incubação em cães varia de 2 a 12 meses, podendo chegar a 25 meses, sob condições experimentais (Oliveira et al., 1993). Por meio da reprodução de infecções experimentais em gatos, verificou-se que os sinais clínicos podem aparecer na décima primeira semana em 92,3% dos gatos avaliados após inoculação do parasita (Simões-Mattos et al., 2005).

2.5. Sinais clínicos

Baseado nos sinais clínicos apresentados por cães com leishmaniose, Mancianti et al (1998) sugeriram a classificação destes animais em 3 grupos: assintomáticos, sem sinais clínicos da infecção por *Leishmania*; oligossintomáticos, apresentando linfadenopatia, perda de peso e/ou alopecia; e sintomáticos, mostrando todos ou alguns dos severos sinais clínicos da infecção, incluindo lesões cutâneas, onicogribose, ceratoconjuntivite entre outros (Costa-Val et al., 2006).

A manifestação clínica da leishmaniose inclui sinais inespecíficos como febre irregular por longo período, perda de peso progressiva e caquexia (Ikeda-Garcia et al., 2006).

Cães infectados geralmente desenvolvem a leishmaniose visceral. Os felinos em geral estão subclínicamente infectados. Uma fase subclínica da infecção pode persistir por meses a anos. Perda de peso em face à um apetite normal a aumentado, poliúria, polidipsia, desgaste muscular, depressão, vômito, diarreia, tosse, epistaxe, espirro e melena são alterações clínicas comuns. Esplenomegalia,

linfadenopatia, alopecia facial, febre, rinite, dermatite, sons pulmonares aumentados, icterícia, articulações edemaciadas e doloridas, uveíte e conjuntivite são sinais comumente identificados no exame clínico (Lappin .,2006).

Habitualmente a leishmaniose visceral em animais é observada como moléstia debilitante crônica. Em algumas situações pode ser obtida uma historia de úlceras cutâneas persistentes que cicatrizam lentamente (Jones et al, 2000). As úlceras causadas pela *Leishmania Viannia* são geralmente mais agressivas e podem ser recorrentes mesmo após tratamento (Passos et al., 2000) (Volpini et al., 2003).

As manifestações cutâneas da leishmaniose nos cães variam consideravelmente. Comumente observa-se uma dermatite esfoliativa não pruriginosa na região facial e e patas. Nódulos, erosões, crostas e ulceras podem desenvolver-se na pele. As lesões pustulares são excepcionais. Frequentemente, observa-se ulceração na ponta das orelhas, despigmentação, erosão e ulceração no focinho, unhas quebradiças, paroníquia, atrofia muscular e linfadenopatia. Grandes caspas esbranquiçadas podem estar presentes em áreas de alopecia (Willense, 1998; Lappin.,2006).

Segundo Simões-Mattos et al. (2005), dentre os casos clínicos de Leishmaniose felina(LF) descritos na literatura, 86,7% exibiram manifestações cutâneas, sendo que em 50% dos animais, este foi o único sinal observado; linfadenopatia foi observado em 20% dos casos e em 10% houve visceromegalia associada a manifestações cutâneas. As manifestações cutâneas também foram observadas na maioria dos casos de infecção por espécies viscerotrópicas. Os nódulos (39,5%) e as úlceras (31,6%) foram as lesões mais predominantes, seguidas por dermatite inespecífica (18,5%) e lesões vegetativas e pápulas, ambas com mesma frequência (5,2%). Assim, as manifestações clínicas observadas na LF parecem ser similares àquelas que ocorrem em cães e humanos. A cabeça (75%), e em particular, o nariz (48%), as orelhas (26%) e região ocular (18,6%), foram as regiões mais afetada. Tal fato pode estar relacionado à capacidade dos flebotomíneos em picar áreas com menor quantidade de pêlos (Bonfante-Garrido et al., 1996).

2.6. Patologia clínica

Nos cães, as principais anormalidades descritas nos exames laboratoriais incluem hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, proteinúria, aumento das atividades enzimáticas hepáticas, trombocitopenia, azotemia, linfopenia e leucocitose com desvio a esquerda. A hiperglobulinemia é usualmente policlonal, mas pode ocorrer gamopatia monoclonal de IgG. Pode ocorrer poliartrite neutrofílica em alguns caninos como manifestação de uma reação de hipersensibilidade do tipo III (Lappin,2006). Devido a deposição de imunocomplexos nos rins, pode ocorrer glomerulonefrite e nefrite intersticial, levando a insuficiência renal (Garcia et al., 2006).

2.6.1. Alterações hematológicas

As alterações laboratoriais da leishmaniose visceral canina são inespecíficas. A principal e mais freqüente alteração hematológica é a anemia (Garcia et al., 2006), observada em cerca de 50 a 70% dos pacientes como do tipo normocítica, normocrômica e não-regenerativa (Costa-Val et al.,2006). As possíveis causas da anemia apresentada por animais com leishmaniose estão: perda de sangue devido a epistaxe e úlceras de pele; hemólise; inflamação generalizada; insuficiência renal e hipoplasia ou aplasia da medula óssea. O seqüestro de eritrócitos no baço leva a diminuição da permeabilidade das células e alterações nos receptores de ligação dos eritrócitos, contribuindo para diminuição da fluidez da membrana, resultando em anemia nestes animais (Costa Val et al.,2006; Garcia et al., 2006),. Trombocitopenia e diminuição no tempo de coagulação podem estar presentes devido a supressão da medula óssea (Barrouin-Melo et al., 2004).

A pancitopenia foi um dos achados descrito por Marcos et al. (2009) em um gato infectado com *L.infantum*.

2.6.2. Alterações bioquímicas

A mais freqüente alteração bioquímica encontrada na leishmaniose visceral é a hiperglobulinemia face a hipoalbuminemia devido a nefropatia com perda de proteína ou mesmo hepatopatia, e má nutrição (Garcia et al., 2006). Outros autores citam que a hipergamaglobulinemia ocorre devido à excessiva produção de

anticorpos, que também é responsável por alguns sinais clínicos, como poliartrite e nefrite provocados pela deposição de imunocomplexos (Costa Val et al., 2006).

2.7. Anatomia patológica

As lesões da leishmaniose caracterizam-se por infiltração maciça de vários sistemas do organismo com enormes macrófagos, cujo citoplasma está repleto de leishmanias. A arquitetura do baço e linfonodos, que são particularmente afetados, pode estar completamente obscurecida por estas células fagocitárias. Habitualmente também estão presentes grandes quantidades de plasmócitos. Os achados macroscópicos consistem de: emaciação intensa; linfonodos, baço, e fígado aumentados; às vezes, palidez nas mucosas e superfícies serosas; medula óssea vermelha amolecida; e úlceras intestinais. Alguma fibrose pode acompanhar os infiltrados. Pode estar presente uma glomerulonefrite devido aos complexos imunes (Jones et al. 2000).

2.8. Patogenia

As leishmanias quando são inoculadas na pele do hospedeiro pelos flebótomos, invadem os macrófagos e neles se multiplicam.

Após a inoculação do parasita no cão, os animais resistentes à infecção promovem a ativação de células TCD4+Th1, produzindo principalmente as citocinas, interferon gama (IFN γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucinas (IL) 2 e 12, que ativam macrófagos para destruírem as formas amastigotas. Há evidências que as células TCD8 citotóxicas também estejam envolvidas na resistência à doença. Inversamente nos animais que desenvolvem sinais clínicos, há uma supressão de células TCD4+Th1 e ativação de células TCD4+Th2, produzindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que promovem a proliferação de células B e a consequente produção de grande quantidade de anticorpos (Pinelli et al., 1994;). Entretanto, esses anticorpos não são protetores e muitas vezes são maléficos por formarem imunocomplexos que podem se depositar na membrana basal de vários órgãos (Slappendel, 1988; Martinez-Moreno et al., 1995). As citocinas produzidas pelas células T auxiliares, dependendo do tipo de resposta imunológica do hospedeiro, podem ativar mecanismos efetores particulares, que resultam tanto na proteção imunológica quanto na exarcebação da doença (Pinneli et al., 1994).

O organismo intracelular induz a resposta imune resultando em gamopatias policlonais (e ocasionalmente monoclonais); proliferação de macrófagos, histiócitos e linfócitos em órgãos linforreticulares. São também frequentes a formação de imunocomplexos ocasionando glomerulonefrites e poliartrites (Jones et al., 2000).

As propriedades do parasita e a competência imunológica do hospedeiro para direcionar a resposta imune para o tipo humoral ou celular irão definir o curso clínico da doença (Genaro., 1993; Pinelli et al., 1994).

2.9. Diagnóstico

O correto e precoce diagnóstico e caracterização do parasita é fundamental para avaliação do prognóstico e prescrição de tratamento apropriado para os pacientes infectados com Leishmanias (Bensoussan et al., 2006).

Os métodos diagnósticos para leishmanioses consistem em: diagnósticos sorológicos (ELISA e imunofluorescência); diagnósticos parasitológicos como a visualização direta dos parasitas em esfregaços corados com Giemsa, culturas *in vitro* e imunohistoquímica; e diagnósticos moleculares por meio da identificação do DNA do parasita através de técnicas como a Reação em Cadeia Polimerase (PCR).

Os testes tradicionais têm sido considerados inadequados para a discriminação das espécies, por isso, métodos imunológicos como intradermorreação ou determinação de anticorpos monoclonais têm sido desenvolvidos, no entanto, existe limitação de reações cruzadas com espécies filogenéticas similares (Gomes et al., 2007).

2.9.1. Sorológico

A maioria das técnicas sorológicas são consideradas rápidas e práticas, possuem variável sensibilidade e baixa especificidade levando a resultados falsos positivos. Anticorpos contra *Leishmania* em cães podem ser detectados no soro, títulos de IgG se desenvolvem de 14 a 28 dias após a infecção e declinam de 45 a 80 dias após o tratamento. Há relatos de reação cruzada entre *Leishmania* spp. e patógenos como *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis* e *Babesia* sp. (Ferreira et al., 2007; Lappin, 2006).

2.9.2. Cultura

A cultura é raramente feita nos exames de rotina (Gomes et al., 2007). As diferentes espécies de leishmanias não possuem a mesma característica de crescimento em cultivo. A contaminação é um desafio constante e a variação da eficácia entre as diferentes formulações de crescimentos médios podem dificultar a utilização desta técnica (Bensoussan et al., 2006).

Um estudo avaliou os órgãos em que normalmente é possível cultivar o parasita, sendo considerados o baço e fígado como os órgãos preferenciais para a multiplicação da leishmania. Nestes órgãos, cerca de 77,1% do crescimento ocorreu na primeira semana (Maia et al., 2007).

2.9.3. Parasitológico

Apesar de serem descritas várias espécies e subespécies de *Leishmania*, as seções histológicas não permitem a diferenciação entre essas variantes (Jones et al., 2000).

Nas preparações coradas por Romanovsky, esses organismos apresentam um citoplasma azul-pálido contendo, nas proximidades da extremidade posterior, um núcleo avermelhado com um cariossoma central que se cora mais intensamente. Na região do núcleo, encontramos um corpo em forma de bastonete e com uma cor violeta-escura, o cinetoplasto, que contém o corpo parabasal e o blefaroplasto em forma de pinta (Jones et al., 2000).

2.9.4. Molecular

A PCR é a técnica de diagnóstico mais adequada para casos onde um pequeno número de organismos está presente na amostra, pois pode ser detectado pouco mais de 10 organismos individuais de células de leishmanias utilizando oligonucleotídeos adequados (Pereira et al., 2008).

A identificação da espécie por meio de técnicas moleculares é ainda realizada principalmente por *Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis* (RFLP-PCR) (Volpini et al., 2003).

A PCR de linfonodos é utilizada como primeira opção de diagnóstico e acompanhamento terapêutico, outra opção seria a PCR de medula óssea para cães sem reatividade de linfonodos. Em casos em que o aspirado não é possível, ou por razões econômicas ou porque não é feito em grande escala, sugere-se utilização do soro para imunofluorescência (IFAT) ou contraímuno eletroforese (CIE) de sangue total ou no filtro de papel para complementar os testes sorológicos (Maia et al., 2007).

2.9.5. Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico não é considerado como uma técnica de diagnóstico de rotina pois requer suporte laboratorial para a infecção dos mosquitos. Entretanto, esta técnica pode ser utilizada para responder algumas questões epidemiológicas, especialmente relacionadas a condição clínica do animal associado ao grau de infectividade até mesmo após tratamento (Costa-Val et al.; 2006).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- Verificar a ocorrência da infecção por *Leishmania* spp. em felinos domésticos em uma área endêmica para leishmaniose visceral humana e canina do Distrito Federal (Sobradinho II);
- Caracterizar as principais alterações hematológicas, bioquímicas e clínicas da infecção por *Leishmania* spp. nos animais infectados;
- Identificar as espécies de *Leishmania* spp. que acometem os felinos domésticos na região estudada.

4. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D. V. V.; COSTA, R. L. G.; JULIAO, F. S.; SANTOS, W. L. C.; BARROUIN-MELO, S. M. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagassi* em uma área endêmica nos estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, p. 283-294, 2007.
- BENSOUSSAN, E.; NASEREDDIN, A.; JONAS, F.; SCHNUR, F. L.; JAFFE, L. C. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1435-1439, 2006.
- BONFANTE-GARRIDO, R.; VALDIVIA, O.; TORREALBA, J.; GARCÍA, M. T.; GARÓFALO, M. M.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVARADO, J.; COPULILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI-JUNIOR, G. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. **Revista Científica FCV-LUZ**, v. 6, 187-190, 1996.
- COSTA-VAL, P. A.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, F. N.; MICHALICK, M. S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, N. M. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 636-643, 2007.
- COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.
- DANTAS-TORRES, F. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 101(8):929-30, 2006.
- DESJEUX, P. Leishmaniosis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, 27: 305-318, 2004.
- DUBEY, J. P.; ROSYPAL, A. C.; PIERCE, V.; SCHEINBERG, S. N.; LINDSAY, D. S. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, p. 1266-1269, 2005.

- DIAS, F. O. P.; LOROSA, E.S; REBELO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, p. 1373-1380, Rio de Janeiro, 2003.
- DISH, J. et al. Detection of circulation leishmania chagasi DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 391-395, 2003.
- FERREIRA, E. C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. F. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine leishmaniasis in presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 235 - 241, 2007.
- FERREIRA, M.G.P.A.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.; LIMA, V.M.F. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 150-154, 2009.
- FREITAS, E.; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p.159-167, 2006.
- GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. 202f. **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
- GOMES,S.H.A.; FERREIRA,R.M.I.; LIMA,R.S.L.; CUNHA,A.E.; GARCIA,S.A.; ARAUJO,L.F.M.; PEREIRA-CHIOCCOLA,V.L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p.234-241, 2006.
- IKEDA, F.A.; CIARLINE, P.C. et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, 47: 42-48, 2003.
- IKEDA-GARCIA,A.F.; LOPES,S.R.; CIARLINI,C.P.; MARQUES,J.F.; LIMA,F.M.V.; PERRI,V.H.S.; FEITOSA,M.M. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Research in Veterinary Science**, v.83, p.105-108, 2007.
- JONES, C.T., HUNT, R.D., KING, N.W. Moléstias causadas por protozoários. In: JONES, C.T., HUNT, R.D., KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6.Ed. São Paulo: Manole, p. 599-600, 2000.

- LAPPIN, R.M. Doenças Infecciosas. In: NELSON,W.R, COUTO,G.C. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3.Ed. Rio de Janeiro: Mosby, p.1265-1266, 2006.
- MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; PEREIRA, S.A.; FIGUEIREDO, F.B.; BAPTISTA, C.; LEAL, C.A.; MELO, C.X; CONFORT, E.M.; MARZOCHI, M.C.A. Post mortem parasitological evaluation of dogs sororeactive for Leishmania from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 138: 366-370, 2006.
- MAIA,C.; RAMADA,J.; CRISTOVÃO,M.J.; GONÇALVES,L.; CAMPINO,L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **The Veterinary Journal**, Short Communication, 2007.
- MAIA, F. Leishmaniose assusta moradores do DF. **Correio Braziliense**. Brasilia, 8 de fevereiro de 2011. Caderno Saúde, p.33.
- MANCIANTI,F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control: 1. Evolution of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 82, p. 566-567, 1998.
- MARCOS, R.; SANTOS, M.; MALHAO, F.; PEREIRA, R.; FERNADES, C. A.; MONTENEGRO, L.; ROCCABIANCA, P. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, n.2, p. 201-202, 2009.
- MASUCCI, M.; DE MAJO, M.; CONTARINO, R. B.; BORRUTO, G.; VITALE, F.;PENNISI, M. G. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 771–774, 2003.
- MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENT, M.D.. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, 145: 245-252, 2007.
- NERI, M. Por uma droga menos tóxica. **Correio Braziliense**. Brasilia, 19 de setembro de 2010. Caderno Cidades, p.25.
- OLIVEIRA, G. G. S.; SANTORO, F.; SADIGUSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 243-248, 1993.

- PASSOS, MA.V.; LASMAR,B.E.; GONTIJO, MF.C.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural Infection of a Domestic Cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, V. 91, p. 19-20, 1996.
- PEREIRA, A.F.E.; THOMAZ-SOCCOL,V.; LIMA,C.H.; THOMAZ-SOCCOL,A.; CASTRO,A.E.; MULINARI-BRENNER,F.; QUEIROZ-TELLES,F.; LUZ,E. Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Parana state of southern Brazil. **Experimental Dermatology**, v.17, p.1024-1030, 2008.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DELREAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 229-235, 1994.
- REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, 81:68-75, 2006.
- RODRIGUES, G., GOULART, G. Começa caça a cães doentes. **Correio Braziliense**. Brasília, 16 de Novembro de 2006. Caderno Cidades, p.28.
- ROSPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **The Journal of Parasitology**, v.91, p. 970 - 972, 2005.
- SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, 11: 24-28, 1997.
- SAVANI, E.S.M.M.; CAMARGO, M.C.G.O.; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G.; D'ÁURIA, S.R.N.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. The first record in the Américas of a autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 120: 229-233, 2004.
- SCHUBACH, T.M.P., FIGUEIREDO, F.B., PEREIRA, S.A., MADEIRA, M.F., SANTOS, I.B., ANDRADE, M.V., CUZZI, T., MARZOCHI, M.C.A., SCHUBACH, A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with

- Leishmania (Viannia) braziliensis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 98: 165-167, 2004.
- SERGEANT, E.; SERGEANT, E.; LOMBAARD, J.; QUILICHINI, M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bulletin de Société de Pathologie Exotique**, v. 5, p. 93-98, 1912.
- SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55-59, 2009.
- SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.; BEVILAQUA, C.M.L.; PRATA-JÚNIOR, R.C.; HOLANDA, C.M.; RONDON, F.C.M.; BASTOS, K.M.S.; COELHO, Z.C.B.; BARRAL, A.; POMPEU, M.M.L. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, 127: 199-208, 2005.
- SLAPPENDEL, R.J.; GREENE, C.E.. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. (Ed.) **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 769-777, 1990.
- SOUZA, I.A.; BARROS, S.M.E.; ISHIKAWA, E.; ILHA, N.M.I.; MARIN, B.R.G.; NUNES, B.L.V. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 41-45, 2005.
- SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Editora MS, 1.ed., Brasília, 2004. 120p.
- SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 136p.
- SVS, Leishmaniose visceral. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561
- VOLPINI, C.A.; PASSOS, A.M.V.; OLIVEIRA, C.G.; ROMANHA, J.A. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, p. 31-37, 2003.
- WHO. Leishmaniasis, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- WILLENSE, T.; Doenças virais e por protozoários. In: **Dermatologia clínica de cães e gatos**. 2 Ed. São Paulo: Manole, p. 42-43, 1998.

CAPÍTULO II

ESTUDO DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL E OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELA LEISHMANIA SPP. NOS FELINOS DOMÉSTICOS DE UMA REGIÃO PERIURBANA DO DISTRITO FEDERAL

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma das principais zoonoses da atualidade, causada pelo protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, composto por dois grandes grupos: o das leishmanias viscerais e o das leishmanias tegumentares, sendo que aproximadamente 20 espécies e subespécies infectam o homem. (Desjeux, 2004). A forma infectante do parasita corresponde à forma promastigota desenvolvida no trato intestinal dos mosquitos do gênero *Phlebotomus*, que são os vetores biológicos transmissores da doença aos animais e à espécie humana (Jones et al., 2000).

Sendo a Leishmaniose uma doença sistêmica de curso crônico e implicação viscerocutânea, apresenta grande variabilidade clínica (Lappin., 2006). O

diagnóstico deve ser o mais precoce possível e a terapêutica instituída rigorosamente cumprida (Bensoussan et al., 2006).

O crescente aumento de cães e humanos infectados no Distrito Federal vem gerando preocupações em profissionais que atuam junto a órgãos de Saúde Pública, em clínicos veterinários de pequenos animais e também na população residente em áreas de risco, como Sobradinho, Fercal e Lago Norte (Neri., 2010). Nesse contexto e sabendo que em outras regiões endêmicas no Brasil como Belo Horizonte mesmo após medidas de eutanásia de cães infectados não foi possível o controle efetivo da doença, a aplicação de medidas de controle mais adequadas e a investigação do envolvimento de outras espécies no ciclo de vida destes parasitas precisam ser desenvolvidas.

O cão atua como principal reservatório doméstico do parasita, tendo um papel fundamental na expansão da doença em áreas endêmicas (Slappendel et al., 1990; Ikeda et al., 2003; SVS., 2004). Até recentemente, os gatos eram considerados hospedeiros acidentais da *Leishmania* spp., porém fortes evidências têm estabelecido que os gatos também desempenham importante papel epidemiológico na leishmaniose.

A infecção natural de um gato doméstico por *Leishmania* spp. teve sua primeira descrição em 1912, na Argélia, em um animal de quatro meses de idade, que convivia com um cão e uma criança, portadores de leishmaniose visceral (Sergent et al., 1912). Desde então, a literatura mundial tem diversos registros da infecção por *Leishmania* spp. nos felinos domésticos. Em 2005, Simões-Mattos et al. (2005) conseguiram reproduzir a infecção experimentalmente por meio da inoculação por *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. (Viannia) braziliensis*, evidenciando a suscetibilidade da espécie felina. Apesar desta descoberta, os gatos não são considerados, até o momento, um reservatório importante da doença e existem discordâncias na literatura com relação à susceptibilidade dos felídeos domésticos à infecção por *Leishmania* spp. (Kirkpatrick et al., 1984., Vita et al., 2005.; Simões-Mattos et al., 2005). Acredita-se que gatos infectados possuam certo grau de resistência natural à enfermidade (Pennisi., 2002; Mancianti., 2004), certos autores citam que esta espécie apresenta normalmente uma forma subclínica da doença (Lappin., 2006), porém há poucos dados na literatura quanto as alterações

laboratoriais (hemograma e bioquímica sérica) e técnicas de diagnóstico adequadas para identificar a presença de infecção por *Leishmania* spp. na espécie felina.

Dos casos esporádicos de LF relatados no Brasil, um dos únicos sintomas citados foi a presença de nódulos e lesões na região da face (Schubach et al.,2003; Savani et al.,2003). Não houve predileção de uma espécie de leishmania para os gatos, foram encontradas as espécies: *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. panamensis* (Schubach et al.,2003; Savani et al.,2003; Passos et al., 2003; Souza et al.,2005).

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência da infecção por *Leishmania* spp. em felinos domésticos, caracterizar as principais alterações hematológicas, bioquímicas e clínicas da infecção por meio de técnicas laboratoriais e identificar as espécies de leishmanias que acometem os gatos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob protocolo nº 47.168/2009.

O lugar do estudo correspondeu às comunidades identificadas conjuntamente com o nome de Fercal, localizadas na área rural da região administrativa de Sobradinho II, Distrito Federal. Trata-se de várias comunidades que se encontram separadas por área de mata residual, chácaras ou morros. A região está localizada em uma área montanhosa, rica em vegetação e nascentes de rios e foi sendo ocupada progressivamente nos últimos 54 anos, e começou ao redor de uma fábrica de calcário, “Fábrica de Fertilizantes e Calcário Fercal” que deu o nome à região, em 1956. A população estimada pela administração local é de 10 mil habitantes. Das treze comunidades, cinco delas apresentaram casos de leishmaniose visceral humana (Carranza-Tamayo, 2010).

Todos os proprietários foram devidamente esclarecidos quanto ao experimento e autorizaram, mediante assinatura do termo de consentimento (Duas etapas – Anexo 1 e 2), a inclusão de seus animais neste estudo.

Foram utilizadas amostras de sangue de gatos oriundos de 5 comunidades: Engenho Velho, Bananal, Alto da Bela Vista, Rua do Mato e Curvas. Todos os gatos eram domiciliados, sem raça definida (SRD), machos e fêmeas de diferentes idades.

Oitenta e nove gatos foram submetidos a exame clínico inicial e posteriormente foram colhidas amostras de sangue venoso por punção da veia cefálica ou jugular. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos com e sem EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e armazenadas em caixas térmicas durante o seu transporte até o laboratório de Patologia Clínica Veterinária (FAV/UnB).

Após a identificação dos animais positivos por meio da Reação da polimerase em cadeia (PCR) das amostras de sangue, foram coletadas 10 amostras de linfonodos, medula óssea e pele de 10 animais positivos. Após prévia autorização do proprietário, os animais foram levados a uma clínica particular onde foram anestesiados conforme o seguinte protocolo anestésico: cetamina (Vetnil®, 10%) na dose de 15mg/kg e cloridrato de xilazina (Rompun®, 2%) na dose de 1mg/kg, ambos via intramuscular.

Os aspirados de medula óssea, linfonodos e fragmentos de pele foram utilizados para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. por meio das seguintes técnicas: molecular, composta por PCR e digestão enzimática, também chamada de *Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis* (RFLP-PCR); parasitológico, baseado na citologia da medula óssea e linfonodos, e histologia dos fragmentos de pele; imunohistoquímica; imunocitoquímica e cultivo celular.

2.1. Análise Hematológica

No laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB, parte das amostras com EDTA foram processadas em até 4 horas para a realização de hemogramas. Foi utilizado um contador semi-automático de células para uso veterinário (modelo CELM - CC550) para a determinação do

número de hemácias, de leucócitos e a concentração de hemoglobina. Os valores do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) foram determinadas por cálculo. O hematócrito (VG) foi determinado pela técnica do microhematócrito. As proteínas plasmáticas totais foram determinadas com o auxílio do refratômetro. Foram ainda preparados esfregaços de sangue total corados com panótico para a realização do diferencial leucocitário, observação morfológica das células sangüíneas e pesquisa de hemoparasitas. As plaquetas foram diluídas em solução de Brecher (oxalato de amônio a 1%) e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

O restante das amostras com EDTA foi congelado para posterior extração do DNA e realização da PCR.

Das amostras sem anticoagulante, foi obtido o soro para a determinação das concentrações séricas das proteínas totais (PT), albumina, globulinas, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia e creatinina, utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest ®) e leitura em um analisador bioquímico semi-automático (Bio2000 – Bioplus).

O modelo da ficha de tabulação dos dados referente aos hemogramas e exames bioquímicos está apresentado nos Anexos 3 e 4, respectivamente.

2.2. Exame físico

Os animais foram submetidos ao exame físico em que foram verificados os seguintes parâmetros clínicos: coloração da mucosa ocular, tempo de preenchimento capilar (TPC), hidratação, pulso, frequência cardíaca, frequência respiratória e reatividade dos linfonodos submandibulares. A observação do aspecto geral dos animais foi realizada visando a identificação de anormalidades, tais como: presença de ectoparasitas, lesões de pele, etc. Os proprietários também foram questionados se havia alguma queixa digna de nota. Todos os dados foram registrados em uma planilha (Anexo 5).

2.3. Colheita de aspirado de medula óssea, linfonodos e pele

2.3.1. Punção de linfonodos:

Foram palpados os linfonodos dos animais e os que estavam reativos foram puncionados com auxílio de uma agulha 25x0,8 mm acoplada a uma seringa de 10 mL com solução fisiológica estéril (Figura 2). Na ausência de reatividade, os linfonodos submandibulares foram os de escolha para a punção.



Figura 2: Imagem fotográfica do procedimento de punção de linfonodos.

2.3.2. Punção de medula óssea:

Os animais foram colocados em decúbito dorsal, de forma que o esterno ficasse protuberante e de fácil acesso para punção. Em seguida, com auxílio de uma agulha 40x1,2 milímetros (mm) acoplada a uma seringa de 10 mililitros (mL) foi puncionado cerca de 0,5 mL de aspirado medular (Figura 3).



Figura 3: Imagem fotográfica do procedimento de punção de medula óssea.

2.3.3. Biópsia de pele:

Inicialmente, foi realizada a assepsia das faces internas das orelhas, região onde comumente é encontrado o parasita. Em seguida, com um *punch* estéril, foram coletados dois fragmentos de pele de aproximadamente 2 mm de diâmetro de uma das orelhas (Figura 4).



Figura 4: Imagem fotográfica do procedimento de biópsia de pele.

2.4. Diagnóstico Molecular (PCR e RFLP-PCR):

O DNA do parasita foi extraído das amostras utilizando kits comerciais para extração de DNA. A presença do DNA do parasita nas amostras foi confirmada por meio da técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR).

2.4.1. Extração do DNA

O DNA foi extraído, a partir das amostras de sangue com EDTA no laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular com a utilização de kits comerciais (QIAamp DNA blood mini kit - Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante, conforme Figura 5.

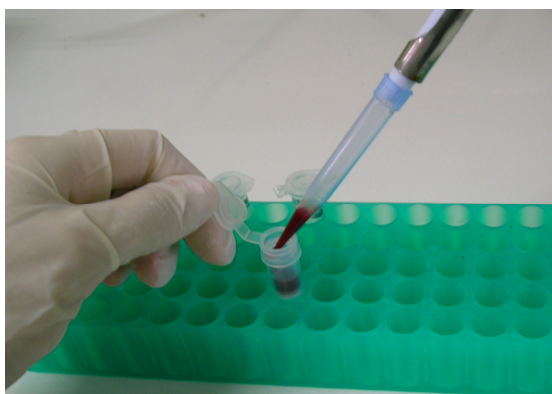


Figura 5: Imagem fotográfica do procedimento de extração de DNA de sangue.

O DNA do aspirado de medula óssea, linfonodos e pele foram extraídos com a utilização de kits comerciais específico para tecidos (ilustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin kit – GE Healthcare®), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento da realização da PCR.

2.4.2. PCR

Todas as reações foram realizadas no Microbiologia e Patologia Molecular da UnB. Em todas as reações foram utilizados controles negativos e positivos para avaliar a ocorrência de contaminação de reagentes e a sensibilidade da reação, respectivamente. Como controle negativo, foi utilizada água e como controle positivo

foi utilizado DNA de um animal naturalmente infectado com o *Leishmania* spp. No início da padronização da reação, utilizou-se, além da água, amostra de DNA de um gato hígido como controle negativo para avaliar a especificidade da mesma. Para evitar contaminação com produtos de PCR, a extração, a amplificação e a eletroforese dos produtos amplificados, foram realizadas em diferentes locais. Todas as reações foram realizadas no mesmo termociclador (Biorad®).

2.4.3. Identificação das amostras positivas para *Leishmania* spp.

Foram utilizados 3 oligonucleotídeos (LFW: GGG TAG GGG CGT TCT GCG AA e uma mistura de 1:1 de oligonucleotídeos LBW1: GGC CCACTA TAT TAC ACC AAC CCC/LBW2: CCG CCC CTATTT TAC ACC AAC CCC) que anelam no gene da molécula do minicírculo do kDNA do parasita da *Leishmania* spp., resultando em um produto de 120 pares de bases (pb) (Dish et al., 2003). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 6 pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da Taq platinum, 2,0mM (3,3) de MgCl₂, 0,4mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 U (1,2 u) de Taq platinum DNA polymerase e 2,0µl do DNA da amostra, para um volume final de 25µl. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos repetitivos de 30 seg em 94°C, 30 segundos em 63°C e 10 segundos em 72°C, seguidos de 5 minutos de extensão final em 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

2.4.4. Identificação da espécie de *Leishmania* (RFLP–PCR)

Para caracterização molecular das amostras amplificadas com os oligonucleotídeos LBW1, LBW2 e LFW, os produtos da PCR foram submetidos à RFLP–PCR, utilizando a enzima Hae III, semelhante ao protocolo descrito por Volpini et al. (2003) e Andrade et al. (2006). A enzima é obtida da bactéria *Haemophilus aegyptius* e cliva o DNA nos sítios 3'-CC↑GG-5' e 3'-CC↑GG-5'. O seguinte protocolo foi realizado: 5 µl de produto amplificado da PCR foi utilizado para digestão com 0,5 µl (1UI) da enzima Hae III (Invitrogen®), utilizando tampão apropriado de enzima, ajustados para um volume final de 15 µl. As misturas foram incubadas em banho Maria a 37°C por 3 horas. Após término da incubação os

produtos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corados com nitrato de prata e visualizados no negatoscópio. Os produtos digeridos foram analisados conforme tabela 1.

Tabela 1. Análise da identificação de espécies de *Leishmania* spp. por meio de RFLP-PCR com a enzima *Hae III* (Volpini et al., 2003; Andrade et al., 2006)

| ESPÉCIE | FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO |
|------------------------|-------------------------|
| <i>L. amazonensis</i> | 120bp* |
| <i>L. braziliensis</i> | 80 e 40bp |
| <i>L. chagasi</i> | 120, 80, 60 e 40bp |

*Não digere.

2.4.4. Avaliação da qualidade da extração do DNA.

As amostras que se apresentaram negativas na PCR foram submetidas a uma segunda reação para testar a qualidade da extração do DNA e reduzir a quantidade de falsos negativos devido à presença de inibidores da PCR. Para isto foram utilizados os oligonucleotídeos GAPDH-F (CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T) e GAPDH-R (CCA AAG TTG TCA TGG ATGACC) que anelam em uma sequência específica do gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e resulta em um produto de 400 pb. Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1X Taq polimerase buffer, 2,5mM de MgCl₂, 0,4mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,8U de Taq platinum DNA polymerase e 2,0µl do DNA da amostra, em um volume final de 25µl. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por 2 minutos. Produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

2.5. Diagnóstico parasitológico da leishmaniose:

Foram realizados esfregaços a partir da punção de linfonodos e medula óssea corados pelo método de Romanowsky. Nos esfregaços citológicos foi realizada a pesquisa do parasita que consistiu na pesquisa de formas amastigotas do parasita.

Parte das biópsias de pele foram acondicionadas em solução contendo formol a 10%. Estas amostras foram submetidas à blocagem, impregnadas em parafina, em seguida, submetidas a cortes histológicos em micrótomo para posterior preparação das lâminas para coloração com HE. As lâminas foram analisadas visando a pesquisa das formas amastigotas da *Leishmania* spp. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Patologia, FAV/UnB.

2.6. Diagnóstico imunocitoquímico e imunohistoquímico da leishmaniose:

Para o diagnóstico imunocitoquímico, foi utilizado o kit comercial (NovaCasta Lab®) e o protocolo de Tafuri et al (2004). Esfregaços a partir da punção de linfonodos e medula óssea foram fixados em acetona PA e acondicionados a -20°C. O passo seguinte foi a recuperação antigênica com Protease (Sigma®) por 15 minutos à temperatura ambiente, seguida do bloqueio da peroxidase endógena (Peroxidase Block Novacasta Lab®) por 5 minutos em temperatura ambiente e lavagem das lâminas com água destilada. Posteriormente, foi realizado bloqueio de proteínas inespecíficas com solução bloqueadora (Protein Block Novacasta Lab®) por 5 minutos, seguida de lavagem e finalizado com a incubação com anticorpos primários policlonais de cão (diluição de 1:200 em PBS) por *overnight* à 4°C. No dia seguinte, foi realizada a lavagem e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos com os anticorpos secundários (Post Primary Block Novacasta Lab®). Feita nova lavagem, o polímero do kit foi adicionado e permaneceu nas lâminas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após estes procedimentos, as lâminas foram coradas com solução DAB e contracoradas com hematoxilina. As lâminas foram montadas em bálsamo neutro e analisadas.

Para o diagnóstico imunohistoquímico, foi feita a impregnação em parafina, seguida de desparafinização e hidratação dos cortes histológicos dos fragmentos de pele. Em seguida, utilizou-se o mesmo protocolo da imunocitoquímica anteriormente citado. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Patologia, FAV/UnB.

2.8. Cultura:

Numa câmara de fluxo laminar previamente descontaminada com álcool e radiação UV, foram colocados os materiais a serem inoculados junto com aos meios

de cultura. Os aspirados foram inseridos em meio de transporte contendo RPMI 1640 1X com L-glutamina (Gibco®) e soro fetal bovino 20% inativado. Para os aspirados (medula óssea e linfonodos), foram inseridos 0,2 mL em cada tubo de cultura, mediante punção da tampa dos meios de cultura previamente limpos com álcool. Os tubos de cultura corresponderam aos meios Novy-McNeall-Nicole modificados, compostos por ágar sangue de coelho com gentamicina 100 ug/ml. O tempo de observação total foi de 30 dias, com avaliações a cada 48 horas. A incubação foi realizada em uma câmara Fanem 347 CD à 24 °C. Esta etapa foi realizada no Centro de Medicina Tropical, FS/UnB.

2.11. Análise estatística.

A análise estatística foi realizada por meio do programa SAS 9.1. As amostras foram separadas em animais positivos e negativos (G1 e G2) para a infecção por *Leishmania* spp., de acordo com as comunidades da Fercal (Sobradinho II).

As variáveis, VG, número de hemácias, VCM, CHCM, número de leucócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, PPT, número de plaquetas, ALT, FA, uréia, creatinina, proteína total sérica, albumina, globulina, razão A/G foram comparados, nos diferentes grupos (G1 e G2) por meio do PROC GLM, utilizando-se o teste paramétrico de Duncan, com intervalo de confiança de 95% com o objetivo de verificar diferenças estatísticas entre os grupos.

A análise dos resultados do PCR de sangue, aspirado de medula óssea e linfonodos foram avaliados baseados na frequência. O mesmo método foi utilizado para a análise das alterações clínicas.

3. RESULTADOS

3.1. PCR

3.1.1. Amostras de sangue

Na PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos LBW1, LBW2 e LFW (Figura 6) foram identificadas 53 amostras positivas para *Leishmania* spp. (59,55%) do total de 89 gatos testados.

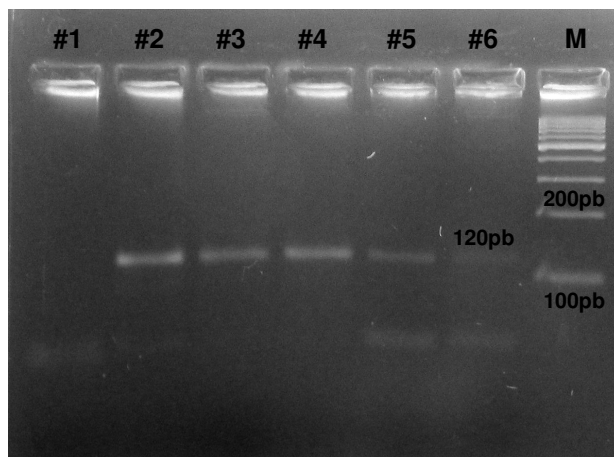


Figura 6: Gel de agarose 2% resultante da eletroforese da PCR para *Leishmania* spp. utilizando os oligonucleotídeos LBW1, LBW2 e LFW. Legenda: #1: controle negativo; #2: controle positivo; #3 a #6: animais positivos e M: Marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen®).

A ocorrência de animais infectados com leishmaniose felina (LF) por comunidade avaliada no presente estudo foi confrontada com os dados obtidos por Carranza-Tamayo (2010) que pesquisou a ocorrência de leishmaniose visceral humana (LVH) por comunidade na mesma região (tabela 2).

Tabela 2. Características demográficas das comunidades avaliadas e presença de LVH e LF.

| Comunidade | Número de famílias | População estimada | Casos de LVH** | Casos de LF* | Ocorrência de LF* |
|-----------------|--------------------|--------------------|----------------|--------------|----------------------|
| Alto Bela Vista | 190 | 720 | Não | Sim | 42/53 (79,5%) |
| Bananal | 349 | 1281 | Sim | Sim | 2/53 (3,7%) |
| Curvas | 172 | 627 | Sim | Sim | 5/53 (9,4%) |
| Engenho Velho | 381 | 1529 | Sim | Sim | 2/53 (3,7%) |
| Rua do Mato | 120 | 529 | Não | Sim | 2/53 (3,7%) |

* LF: Infecção por *Leishmania* spp. em gatos.

** LVH: Leishmaniose Visceral Humana.

Na PCR das 36 amostras negativas, quando se utilizou os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R para avaliar a qualidade da extração, 100% das amostras foram positivas para a sequência específica do gene da enzima gliceraldeído 3-

fosfato desidrogenase, demonstrando que a extração resultou em quantidade de DNA adequada e sem a presença de inibidores da PCR.

3.1.1.2. Amostras de linfonodos, medula óssea e pele

Após a identificação dos animais positivos por meio da PCR de amostras de sangue, foram coletadas amostras de linfonodos, medula óssea e pele de 10 animais positivos e realizada nova PCR para *Leishmania* spp. (tabela 3). Nesta PCR, 9 (90%) amostras de linfonodos e medula óssea foram positivas, porém, apenas 8 (80%) dos fragmentos de pele foram positivas. Merece destaque que pelo menos um outro tecido também foi positivo além do sangue e, em 70% dos animais todos os tecidos testados foram positivos.

Tabela 3. Resultado da PCR das amostras de sangue, linfonodos, medula óssea e pele para *Leishmania* spp.

| Identificação | Sangue | Linfonodos | Medula óssea | Pele |
|---------------|--------|------------|--------------|------|
| Animal 1 | + | + | + | - |
| Animal 2 | + | + | + | + |
| Animal 3 | + | - | + | + |
| Animal 4 | + | + | - | - |
| Animal 5 | + | + | + | + |
| Animal 6 | + | + | + | + |
| Animal 7 | + | + | + | + |
| Animal 8 | + | + | + | + |
| Animal 9 | + | + | + | + |
| Animal 10 | + | + | + | + |

3.2. Alterações clínicas

As alterações clínicas mais freqüentes foram linfadenopatia focal (12/89), mucosas hipocoradas (9/89) e desidratação (5/89).

A distribuição das alterações clínicas entre os grupos de animais positivos e negativos está apresentada na tabela 4:

Tabela 4. Alterações clínicas entre os grupos positivos e negativos para a infecção por *Leishmania* spp.

| Alterações clínicas | Positivos | Negativos | Total |
|----------------------------|------------------|------------------|--------------|
| Linfoadenopatia focal | 6 (11%) | 6 (16%) | 12 (13%) |
| Mucosas hipocoradas | 4 (7%) | 5 (13%) | 9 (10%) |
| Desidratação | 0 | 5 (13%) | 5 (5%) |
| Total | 53 | 36 | 89 |

Conforme registros da anamnese geral e queixa dos proprietários, 2 animais pertencentes ao grupo de animais positivos (3%) apresentaram lesão ulcerada na boca e lesões ulceradas nas extremidades das orelhas. Em relação ao grupo negativo, a principal alteração constatada em 7 animais (19%) foi a presença de ectoparasitas, especialmente pulicidiose.

3.3. Hematologia e Bioquímica sérica

Não houve alteração significativa entre os grupos de animais positivos e negativos para a infecção por *Leishmania* spp em nenhum parâmetro hematológico e bioquímico avaliado (Tabela 5). As diferenças observadas foram apenas decorrentes da comunidade ou da interação entre grupo e comunidade.

Tabela 5. Análise estatística dos hemogramas completos e das bioquímicas séricas dos animais positivos e negativos da área periurbana do DF.

| | POSXNEG | Média | R2 | Coef. de variação | Valores de Referência | Grupo | Local | Grupo x Local |
|-------------------|----------------------------------|--------|------|--------------------|-------------------------|-------|-------|---------------|
| Hemograma | VG (%) | 29,14 | 0,65 | 17,13 | 24-45 ¹ | NS | *** | * |
| | Hemácias (x10 ⁶ /μL) | 7,94 | 0,52 | 22,56 | 5,0-10 ¹ | NS | *** | NS |
| | Hemoglobina (g/dL) | 11,31 | 0,53 | 22,38 | 8-15 ¹ | NS | *** | NS |
| | VCM (fl) | 35,84 | 0,79 | 11,38 | 39-55 ¹ | NS | *** | NS |
| | CHCM (%) | 37,67 | 0,57 | 19,21 | 30-36 ¹ | NS | *** | NS |
| | HCM (pg) | 21,21 | 0,06 | 302,76 | 13-17 ¹ | NS | NS | NS |
| | Plaquetas (x10 ³ /μL) | 160,85 | 0,10 | 135,15 | 200-600 ¹ | NS | NS | NS |
| | PPT (g/dL) | 7,20 | 0,09 | 16,99 | 6,0-8,8 ¹ | NS | *** | NS |
| | Leucócitos (/μL) | 13924 | 0,24 | 46,79 | 5500-19500 ¹ | NS | NS | NS |
| | Bastonetes (/μL) | 2094 | 0,40 | 124,39 | 0-300 ¹ | NS | NS | NS |
| | Neutrófilos (/μL) | 4286 | 0,28 | 61,76 | 3500-7500 ¹ | NS | *** | NS |
| | Linfócitos(/μL) | 1740 | 0,33 | 108,27 | 1500-7000 ¹ | NS | ** | NS |
| | Eosinófilos (/μL) | 580 | 0,38 | 59,27 | 0-1500 ¹ | NS | NS | NS |
| | Monócitos(/μL) | 985 | 0,40 | 82,79 | 0-800 ¹ | NS | NS | NS |
| Basófilos (/μL) | 0,26 | 0,06 | 0,29 | Raros ¹ | NS | ** | NS | |
| Bioquímica Sérica | Uréia (mg/dL) | 45,14 | 0,41 | 30,53 | 42,8-64,2 ² | NS | ** | NS |
| | Creatinina (mg/dL) | 0,86 | 0,39 | 38,75 | 0,8-1,8 ² | NS | ** | NS |
| | ALT (UI/L) | 52,03 | 0,35 | 100,23 | 6-83 ² | NS | * | NS |
| | FA (UI/L) | 27,01 | 0,44 | 61,90 | 25-93 ² | NS | * | NS |
| | PT sérica (g/dL) | 7,33 | 0,68 | 15,25 | 5,4-7,8 ² | NS | *** | NS |
| | Albumina (g/dL) | 2,05 | 0,65 | 18,18 | 2,1-3,3 ² | NS | *** | NS |
| | Globulina (g/dL) | 5,27 | 0,54 | 21,28 | 2,6-5,1 ² | NS | *** | NS |
| | Razão A/G | 0,40 | 0,30 | 35,68 | 0,45-1,19 ² | NS | NS | NS |

Onde p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***, POSITIVOS X NEGATIVOS , Não Significativos (NS), Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média(CHCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase(AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993¹ e Kaneko, 1997².

Na tabela 6 estão apresentados os valores médios e desvio padrão do hemograma e bioquímica sérica dos animais dos grupos positivos e negativos.

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma e da bioquímica sérica apresentados por todos os animais positivos e negativos para a infecção por *Leishmania* ssp.

| | Parâmetro | POSITIVOS | NEGATIVOS | Valores de referência |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Hemograma | VG (%) | 28,77±11,65 ^a | 29,00±5,95 ^a | 24-45 ¹ |
| | Hemácias (x10 ⁶ /μL) | 7,70±3,15 ^a | 7,69±1,49 ^a | 5,0-10 ¹ |
| | Hemoglobina (g/dL) | 10,02±4,96 ^a | 11,12±1,69 ^a | 8-15 ¹ |
| | VCM (fl) | 33,25±12,53 ^a | 37,65±1,93 ^a | 39-55 ¹ |
| | CHCM (%) | 31,10±14,55 ^a | 38,87±5,06 ^a | 30-36 ¹ |
| | HCM (pg) | 11,59±5,39 ^a | 14,57±1,28 ^a | 13-17 ¹ |
| | Plaquetas (x10 ³ /μL) | 331,00±236,13 ^a | 370,00±216,59 ^a | 200-600 ¹ |
| | PPT (g/dL) | 6,35±2,52 ^b | 7,04±0,29 ^a | 6,0-8,8 ¹ |
| | Leucócitos(/μL) | 10700±5343 ^a | 9840±1,63 ^a | 5500-19500 ¹ |
| | Bastonetes (/μL) | 16±37 ^a | 20±44 ^a | 0-300 ¹ |
| | Neutrófilos(/μL) | 6297±3414 ^a | 5447±1968 ^a | 3500-7500 ¹ |
| | Linfócitos(/μL) | 3654±3029 ^a | 3439±902 ^a | 1500-7000 ¹ |
| | Eosinófilos(/μL) | 603±364 ^a | 472±249 ^a | 0-1500 ¹ |
| | Monócitos(/μL) | 181±135 ^a | 379±214 ^a | 0-800 ¹ |
| | Basófilos (/μL) | 0,11±0,33 ^a | 0,00±0,00 ^a | Raros ¹ |
| Bioquímica Sérica | Uréia (mg/dL) | 39,88±23,47 ^a | 40,20±7,49 ^a | 42,8-64,2 |
| | Creatinina (mg/dL) | 0,91±0,41 ^a | 0,86±0,13 ^a | 0,8-1,8 ² |
| | ALT (UI/L) | 49,44±41,91 ^a | 42,80±37,58 ^a | 6-83 ² |
| | FA (UI/L) | 19,66±19,75 ^a | 29,20±12,07 ^a | 25-93 ² |
| | PT sérica (g/dL) | 6,73±2,75 ^b | 7,42±1,08 ^a | 5,4-7,8 ² |
| | Albumina (g/dL) | 1,92±1,87 ^a | 1,88±0,41 ^a | 2,1-3,3 ² |
| | Globulina (g/dL) | 4,81±2,09 ^a | 5,53±1,04 ^a | 2,6-5,1 ² |
| | Razão A/G | 0,37±0,19 ^a | 0,35±0,13 ^a | 0,45-1,19 ² |

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ($p < 0,05$) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média(CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase(AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993¹ e Kaneko, 1997².

3.4. Exame Parasitológico

A citologia de linfonodos e medula óssea de 10 animais positivos para *Leishmania spp* na amostra de sangue não revelou a presença de nenhuma forma amastigota do parasita nas amostras analisadas.

No exame parasitológico da biopsia de pele de 6 animais positivos para *Leishmania spp* na amostra de sangue não foram encontradas formas amastigotas em nenhuma amostra analisada.

3.5. Imunohistoquímica e imunocitoquímica

Todas as amostras, tanto pela técnica de imunocitoquímica (10 amostras) quanto pela imunohistoquímica (6 amostras) foram negativas para *Leishmania spp*.

3.6. Cultura

Foi realizado a cultura de 4 amostras de linfonodos e destas, 2 (50%) apresentaram contaminação e 2 (50%) foram negativas.

Das 10 amostras de medula óssea, todas foram negativas para a cultura.

3.7. RFLP-PCR

Foi realizado a RFLP-PCR de 9 amostras, dentre elas, 6 eram amostras de sangue de gatos de diferentes comunidades da Fercal e 3 eram amostras de pele, medula óssea e linfonodos de um mesmo animal positivo. Inserimos também a amostra de um cão positivo para *Leishmania spp*. na PCR e com todos os sinais clínicos de *Leishmania infantum*, visando termos um controle positivo para tal espécie. As Figuras 8 e 9 apresentam os resultados da RFLP-PCR:

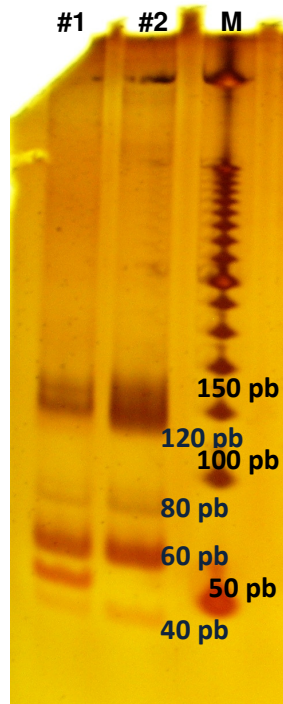


Figura 8: Gel de poliacrilamida 6% resultante da eletroforese da RFLP-PCR com *Hae III*. Legenda: #1: controle positivo para *L.infantum*; #2: amostra de pele com *L.infantum* com fragmentos de restrição de 40, 60 e 80bp; M: Marcador de peso molecular 50pb (Invitrogen®).

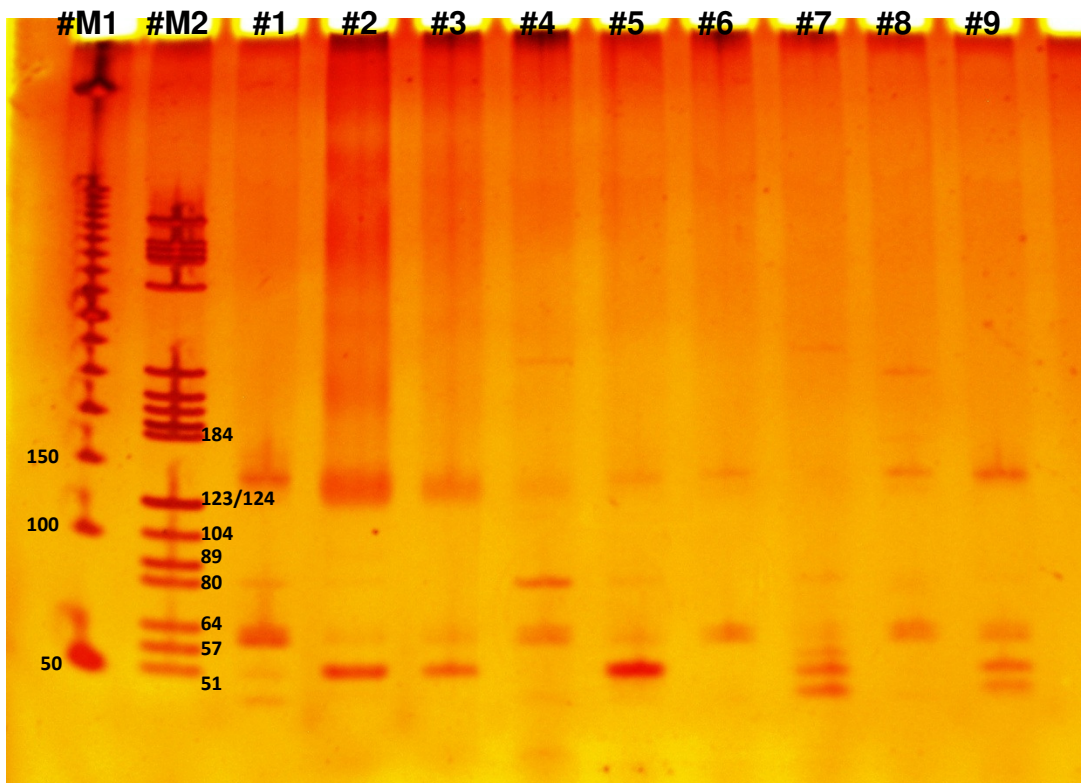


Figura 9: Gel de 6% de poliacrilamida resultante da eletroforese da RFLP-PCR com *Hae III*. Legenda: M1: Marcador de peso molecular 50pb (Invitrogen®); M2:

Marcador de peso molecular de 8 e 587pb (Roche Applied Science®); #1: controle positivo para *L.infantum*; #2, #4, #5, #7: amostras de sangue com *L.infantum* com fragmentos de restrição de 40, 60 e 80bp; #3 e #6: amostras de sangue sugestivas de *L.infantum*, clivagem parcial com fragmento de restrição de 60bp; #7 e #8: amostras de medula óssea e linfonodos de um mesmo animal positivo com *L.infantum* com fragmentos de restrição de 40, 60 e 80bp.

1. DISCUSSÃO

O presente estudo revelou uma elevada taxa de infecção por *Leishmania* spp. (59,55%) nos gatos de área periurbana endêmica para leishmaniose no Distrito Federal. Em áreas não endêmicas, a ocorrência de *Leishmania infantum* em gatos descrita é de 3% (Tabar et al., 2008). Valores muito inferiores foram encontrados por Martin-Sánchez et al. (2006), que obtiveram frequência de 26,1% em 183 gatos de áreas endêmicas do sul da Espanha, contudo os oligonucleotídeos utilizados eram específicos para a espécie *L. infantum* e nosso estudo pesquisou todas as espécies (*Leishmania* spp.) e, talvez por isso tenhamos encontrado valores acima do previamente observado. Outra justificativa para a divergência de resultados, foi a diferença de área pesquisada, apesar de ambas serem endêmicas, áreas periurbanas de introdução recente de espécies viscerotrópicas de *Leishmania* possuem características associadas ao estado de infecção diferentes das descritas em áreas de colonização antiga por este parasito (Carranza-Tamayo, 2010) que podem resultar na divergência de ocorrência de infecção de uma área para outra.

No Brasil, estudo realizado por Neto (2009) avaliou a ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. em 113 gatos de Araçatuba, área também endêmica onde obteve valores de cerca de 22%, enquanto que Costa et al (2010), ao avaliarem 200 gatos da mesma área, para a infecção por *L. infantum*, obtiveram valores ainda menores (11,5%). Contudo, todos estes valores sempre foram inferiores aos obtidos no presente estudo. Cabe salientar que nestes estudos os testes foram baseados em ensaios sorológicos, o que pode ter contribuído para esta diferença uma vez que de acordo com Maia et al. (2009), quando compararam os testes sorológicos e moleculares para detecção da infecção por *L. infantum* em gatos, verificaram discrepância significativa entre estes dois testes, com valores de 7,8% e 18,7%, respectivamente, denotando sempre um maior número de animais positivos a partir de testes moleculares. Esta discrepância de resultados pode sugerir que a resposta

imune de gatos infectados por *Leishmania* spp. seja do tipo celular e não humoral como constatado nos cães com LV (Costa-Val et al., 2007). Tal suspeita baseia-se no fato de que a concentração de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em felinos é inferior às encontradas em cães com LV (Solano-Gallego et al., 2007) e que alguns autores constataram que as maiores proporções de PCR positivos foram em felinos com baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. (Martín-Sánchez et al., 2007; Neto, 2009; Costa et al., 2010). A diferença entre os resultados dos testes também nos permite sugerir que o teste molecular (PCR) apresenta-se mais sensível que testes sorológicos para a detecção da infecção por *Leishmania* spp. nos felinos domésticos.

Confrontado os dados encontrados da ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. em gatos com os dados da infecção em humanos descritos por Carranza-Tamayo (2010) , obtivemos a ocorrência de 59% em gatos enquanto a prevalência em humanos na mesma região foi 46,4% (Carranza-Tamayo, 2010), sendo que o método de diagnóstico utilizado nos humanos foi o teste da intradermoreação de Montenegro. Segundo tabela 2, situação bastante interessante foi constatada neste trabalho nas comunidades Rua do Mato e Alto da Bela Vista, locais onde não foi encontrado ocorrência de leishmaniose visceral humana (LVH), no entanto, foi encontrado a presença do parasita nos gatos. Grande parte da população da comunidade Alto da Bela Vista possuía muitos gatos em suas residências, nesta área obtivemos 79,5% dos gatos infectados com *Leishmania* spp. A ocorrência significativa da infecção em gatos na comunidade com grande população de felinos domésticos e que não há casos de LVH pode levantar a hipótese que os gatos sirvam como fator protetor para os humanos. Apesar de poucos estudos sobre a preferência alimentar do vetor, algumas pesquisas provaram haver alguma tendência preferencial dos flebotomíneos pelos gatos quando comparados a outras espécies animais e que a taxa de engurgitamento destes vetores é alta quando expostos ao contato com os felinos domésticos em condições experimentais (Sanchez, et al., 2000). Em contrapartida, é importante considerar que a preferência alimentar dos vetores pode estar associada a disponibilidade de hospedeiros do que propriamente com a atratividade particular de cada um deles. No entanto, o comportamento dos gatos de dormir durante o período do dia, predispõe a chance de infecção por *Leishmania* spp. já que segundo Dias-Lima et al. (2002) a atividade

de picadas dos flebótomos ao nível do solo pode ocorrer nas primeiras horas da manhã, quando o aquecimento da copa das árvores pressiona os flebótomos a descenderem ao solo para se protegerem da dessecação e ao entardecer, momento em que os gatos normalmente encontram-se ativos devido ao aumento dos níveis de cortisol, o resfriamento contínuo favorece o retorno dos flebótomos às copas das árvores, em busca de suas fontes de alimentos na natureza, como seiva de plantas, néctar e frutas maduras (Dias et al., 2003). Estudos referentes ao hábito alimentar do vetor podem contribuir para o conhecimento da epidemiologia das leishmanioses e para o direcionamento de controle e vigilância (Dias et al., 2003).

Dois animais (3%) positivos para *Leishmania*, apresentavam lesões ulceradas na região facial, similares aquelas previamente descritas nos casos de LF do Brasil (Schubach et al., 2003; Savani et al., 2003; Souza et al., 2004). Foram ainda descritas a presença de nódulos nos gatos infectados (Schubach et al., 2003; Savani et al., 2003; Souza et al., 2004), mas que não foram observados no presente experimento. Infelizmente, não foram colhidas amostras destas lesões para a realização da PCR e, confirmação ou não do parasita nestas áreas ulceradas. Por meio da reprodução de infecções experimentais de *Leishmania braziliensis* em gatos, Simões-Mattos et al. (2005) verificaram que os sinais clínicos apresentados são: presença de lesões ulcerativas e nódulos na região facial semelhante à infecção em humanos; linfadenopatia e perda de peso. A cura total dos nódulos e lesões ulcerativas faciais ocorreu até a quadragésima semana após inoculação do parasita. Em nosso estudo, a linfadenopatia focal estava presente em 11% dos gatos positivos, segundo Simões-Mattos et al. (2005), a linfadenopatia pode aparecer na décima primeira semana em 92,3% dos gatos avaliados após inoculação do parasita. A cura dos sinais clínicos porventura advindos da infecção por *Leishmania* spp., tanto as lesões ulcerativas quanto a linfadenopatia, pode ocorrer de forma espontânea em gatos (Greene., 2007; Martin-Sánchez et al., 2006; Simões-Mattos et al.; 2005). Apesar das alterações clínicas encontradas nos gatos positivos para *Leishmania* spp. do presente estudo serem compatíveis com as relatadas na literatura, não é possível afirmar que tais alterações sejam decorrentes da infecção por *Leishmania* spp., uma vez que não foram excluídas outras enfermidades nos animais avaliados. Além disso, apesar de não termos registrado, a maioria dos gatos não eram castrados e por morarem em casas com livre acesso a

rua e mata, não podemos descartar que as lesões ulcerativas na região facial e a linfadenopatia focal apresentadas possam ser provenientes de brigas entre os felinos domésticos. A ausência de sintomatologia para a maioria dos gatos positivos para *Leishmania* spp. avaliados neste estudo concordam com Lappin (2006) de que os felinos em geral estão subclínicamente infectados e que esta fase subclínica da infecção pode persistir por meses a anos. O conhecimento da prática médica veterinária reforça esta afirmação uma vez que é observado que os gatos demonstram grande facilidade de conviver com patologias de caráter crônico por longos períodos, sem necessariamente exibir sinais ou sintomas, sendo a mesma condição não verificada em cães.

Em relação ao resultado dos diferentes tipos de material amostrado (sangue, medula óssea, linfonodos e pele), observamos que a PCR do sangue mostrou-se mais sensível para a detecção da *Leishmania* spp, uma vez que nos demais tecidos não confirmaram-se os resultados positivos obtidos no sangue, apenas 90% para medula óssea e linfonodos e 80% para a pele. Por outro lado, cabe salientar que não foram testados os tecidos de animais negativos no sangue, descartando os casos de animais positivos nos tecidos e negativos no sangue. Porém, 70% das amostras testadas foram positivas em todos os tecidos o que reitera a distinta distribuição do agente no organismo e que merece estudos futuros. Baseado nos dados encontrados no presente estudo e na preconização por técnicas diagnósticas menos invasivas aos animais, este estudo nos permite sugerir uma conduta a ser utilizada pelos clínicos veterinários para o diagnóstico molecular (PCR) de *Leishmania* spp. nos felinos domésticos, a primeira opção corresponderia a colheita de sangue e como segunda opção a punção de linfonodos, principalmente dos reativos, e, como terceira opção a punção de medula óssea.

Embora a PCR da pele tenha sido realizada a partir de fragmentos de pele íntegra, a obtenção de 80% de concordância com os resultados do sangue, merece destaque e também é motivo de preocupação para a saúde humana, pois pode levantar a hipótese que felinos domésticos sirvam como reservatório. Porém a potencialidade do gato realmente ser capaz de transmitir o parasita para o mosquito só poderá ser avaliada por meio de xenodiagnóstico, reiterando a necessidade de estudos futuros.

Por meio da RFLP-PCR, foi identificado que a espécie presente no sangue de alguns gatos foi a *L. infantum*, esta espécie também acomete os humanos na região pesquisada (Carranza-Tamayo, 2010). A digestão parcial sugere que pode ter ocorrido mutações no sítio de restrição da enzima no gene ou que se trata de uma espécie diferente de *Leishmania*.

Na identificação da espécie de *leishmania* na medula óssea, pele e linfonodos de um mesmo animal, foi encontrado a mesma espécie (*L. infantum*). Contudo, é necessário a realização destes testes (identificação da espécie em diversos órgãos do mesmo animal) em um número maior de animais para possibilitar uma melhor análise visando descartar a possibilidade de haver co-infecções de espécies diferentes de *Leishmania* em diferentes órgãos. A identificação da mesma espécie em diferentes comunidades, denotam que apesar das diferenças geográficas, a espécie que acomete os felinos domésticos da região é a mesma (*L. infantum*).

No diagnóstico por meio de cultura, não houve crescimento nos aspirados de medula óssea e linfonodos. Devido a escassez de literatura para esta técnica para gatos, não tivemos como comparar os resultados. Em cães, Maia et al.(2007) realizou a cultura em diferentes órgãos de cães positivos para leishmaniose através de ensaios sorológicos, foi encontrado resultados positivos em 17,5% de medula óssea e 19,3% em linfonodos. Vale ressaltar que neste trabalho, foram utilizados os tecidos do post mortem que aumentam a possibilidade de encontrar maior quantidade de parasitas do que somente 0,2 mL de material, conforme foi utilizado no presente estudo. Apesar de ser uma técnica que possui baixa sensibilidade para detecção de infecção de *Leishmania* spp. quando comparada a outros testes, é possível atribuir a negatividade de todas as amostras do presente estudo devido a baixa parasitemia e a pequena quantidade utilizada, somente 0,2 mL de aspirado de medula óssea e linfonodos. Sugerimos que para os próximos estudos com esta técnica para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em felinos domésticos seja utilizada tecidos do post mortem ou biopsia dos órgãos com maior probabilidade de encontrar o parasita.

Apesar da escolha do local da biopsia de pele ser a região da face interna da orelha, coerente com a habilidade dos flebotomíneos de picar áreas com a menor quantidade de pelos, a imunohistoquímica e o diagnóstico parasitológico da pele

foram negativos para todas as amostras. Atribuímos os resultados a baixa parasitemia nas amostras, baixa sensibilidade das técnicas para peles integras e pequena quantidade de material avaliado, fragmentos de 2mm a 4mm de diâmetro, que pode ter sido parcialmente perdido durante a etapa de blocagem. Em relação aos testes parasitológicos de medula óssea e linfonodos terem apresentado resultados negativos para todas as amostras, esta constatação é semelhante aos resultados de Costa et al. (2010) que realizaram o exame parasitológico de medula óssea e linfonodos de 200 gatos, encontrando a ocorrência de 1,5% e 3,5% de positividade, respectivamente. Como em nosso estudo para o exame parasitológico só avaliamos 10 animais é aceitável que não tenhamos nenhuma amostra positiva.

A diferença relevante da ocorrência encontrada no diagnóstico molecular quando comparada as outras técnicas utilizadas neste trabalho denotam que a PCR utilizada no presente trabalho é uma boa ferramenta para a detecção da infecção por *Leishmania* spp no felinos domésticos. A escolha do protocolo da PCR baseou na excelente sensibilidade, atingiu positividade de até 4 parasitos/amostra (Carranza-Tamayo, 2010).

Não houve alteração significativa entre os grupos de animais positivos e negativos para a infecção por *Leishmania* spp em nenhum parâmetro hematológico e bioquímico avaliado (Tabela 5). As diferenças observadas foram apenas decorrentes da comunidade ou da interação entre grupo e comunidade. Os resultados obtidos não corroboram com os principais achados normalmente encontrados em cães com leishmaniose, como anemia e hiperglobulinemia (Costa-Val et al., 2006; Garcia et al., 2006). Isto sugere que os gatos podem apresentar uma infecção subclínica conforme citado por Lappin (2006), e tal situação implica em falhas no diagnóstico pelos clínicos. A hipoalbuminemia e hiperglobulinemia encontrada nos dois os grupos podem estar relacionadas a redução da síntese protéica, desnutrição, perda de proteínas (Kaneko et al., 1997) e a estimulação da resposta humoral induzida pela *Leishmania* spp. ou outros hemoparasitas, uma vez que não foram descartados outras infecções ou mesmo co-infecções. Uma avaliação importante para subsidiar o diagnóstico seria a diferenciação das globulinas visto que a leishmaniose em cães pode apresentar gamopatia, porém este teste não foi realizado mas pode ser foco de estudos futuros.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo realizado na região periurbana endêmica para Leishmaniose Visceral Humana de Brasília, Distrito Federal, nos permitiu concluir que:

- A infecção por *Leishmania* spp. ocorre com alta frequência nos felinos domésticos e pode estar presente em áreas onde não há Leishmaniose Visceral Humana.
- A espécie *L. infantum* é a que acomete os felinos domésticos e pode estar presente em diferentes tecidos.
- Não foram observadas alterações hematológicas, bioquímicas e clínicas significativas quando comparados com os animais negativos.
- A PCR mostrou-se uma boa técnica diagnóstica para a detecção da infecção por *Leishmania* spp. em gatos.

5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. H.; REIS, B. A.; SANTOS, L. S.; VOLPINI, C. A.; MARQUES, J. M.; ROMANHA, J. A. Use of PCR-RFLP to identify Leishmania species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, 140: 231-238, 2006.
- BENSOUSSAN, E.; NASEREDDIN, A.; JONAS, F.; SCHNUR, F. L.; JAFFE, L. C. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.4, p.1435-1439, 2006.
- COSTA-VAL, P. A., CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, F. N.; MICHALICK, M. S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, N. M. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis infectivity. **The Veterinary Journal**, v.174, p.636-643, 2007.
- CARRANZA-TAMAYO, O. C. Caracterização e acompanhamento geo-referenciado do primeiro foco de transmissão da leishmaniose visceral humana em Brasília, Distrito Federal. 48f. **Tese** (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília, 2010.
- COSTA, C. A. T.; ROSSI, N. C.; LAURENTI, D. M.; GOMES, D. A. A.; VIDES, P. J.; SOBRINHO, V. S. V.; MARCONDES, M.; Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 213-217, 2010.
- DESJEUX, P. Leishmaniosis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology*, **Microbiology & Infectious Diseases**, 27: 305-318, 2004.
- DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBELO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, p. 1373-1380, Rio de Janeiro, 2003.
- DIAS-LIMA, A.; BERMUDEZ, C. E.; MEDEIROS, J. F.; SHERLOCK, I. Estratificação vertical da fauna de flebotomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária em terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.18, n. 3, Rio de Janeiro, 2002.

- DISH, J. et al. Detection of circulation leishmania chagasi DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 391-395, 2003.
- GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cats**. 3. Ed. Philadelphia: Saunders, p.685-697, 2006.
- IKEDA, F.A.; CIARLINE, P.C. et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por Leishmania chagasi no município de Araçatuba-SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, 47: 42-48, 2003.
- JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Lea & Febiger: Philadelphia, 1993.
- JONES, C.T., HUNT, R.D., KING, N.W. Moléstias causadas por protozoários. In: JONES, C.T., HUNT, R.D., KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6.Ed. São Paulo: Manole, p. 599-600, 2000.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- KIRKPATRICK, C. E.; FARRELL, J. P.; GOLDSCHMIDT, M. H. Leishmania chagasi and L. donovani: experimental infections in domestic cats. **Experimental Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 125-131, 1984.
- LAPPIN, R.M. Doenças Infecciosas. In: NELSON,W.R, COUTO,G.C. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3.Ed. Rio de Janeiro: Mosby, p.1265-1266, 2006.
- MAIA, C.; GOMES,J.; CRISTOVAO, J.; NUNES, M.; MARTINS, A.; REBELO, E., CAMPINO, L. Leishmania survey on cats from a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **4th World Congress on Leishmaniasis**, India, 2009.
- MAIA,C.; RAMADA,J.; CRISTOVÃO,M.J.; GONÇALVES,L.; CAMPINO,L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **The Veterinary Journal**, Short Communication, 2007.
- MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parassitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 203-206, 2004.
- MARTIN-SANCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUNOZ-PEREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MARQUEZ, F.; Infection by Leishmania infantum in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, 145: 267-273, 2007.

- NERI, M. Por uma droga menos tóxica. *Correio Braziliense*. Brasília, 19 de setembro de 2010. **Caderno Cidades**, p.25.
- NETO, S. L. Uso dos antígenos total, FML e RK39 em ELISA indireto para detecção de anticorpos anti *Leishmania* spp. em *Felis catus*. 48f. **Tese** (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.
- PASSOS, MA.V.; LASMAR,B.E.; GONTIJO, MF.C.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural Infection of a Domestic Cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, V. 91, p. 19-20, 1996.
- PENNISI, M. G. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: KILLICK-KENDRICK, R. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution**. Boxmeer: Intervet International, p. 39-48, 2002.
- SAVANI, E.S.M.M.; CAMARGO, M.C.G.O.; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G.; D'ÁURIA, S.R.N.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. The first record in the Américas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 120: 229-233, 2004.
- SANCHEZ, M.A.; HERVAS, H.; CHACON, F.; GOMEZ, J.C.; LUICENTES, J.; CASTRILLO, J.; PEREZ, R.; PASCUAL, F. Evaluacion Del gato comum (*Felis catus domesticus*) como reservorio de La leishmaniose en la cuenca mediterranea. **Pequenos animales**, v.24, p. 46-54, 2000.
- SCHUBACH, T.M.P., FIGUEIREDO, F.B., PEREIRA, S.A., MADEIRA, M.F., SANTOS, I.B., ANDRADE, M.V., CUZZI, T., MARZOCHI, M.C.A., SCHUBACH, A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 98: 165-167, 2004.
- SERGENT, E.; SERGENT, E.; LOMBAARD, J.; QUILICHINI, M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la meme habitation. **Bulletin de Société de Pathologie Exotique**, v. 5, p. 93-98, 1912.
- SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.; BEVILAQUA, C.M.L., PRATA-JÚNIOR, R.C.; HOLANDA, C.M.; RONDON, F.C.M.; BASTOS, K.M.S.; COELHO, Z.C.B.; BARRAL, A.; POMPEU, M.M.L. The susceptibility of

- domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, 127: 199-208, 2005.
- SLAPPENDEL, R.J.; GREENE, C.E.. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. 3.Ed., **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 769-777, 1990.
- SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L.; QUINTANA, J.; PASTOR, J.; ESPADA, Y.; PORTÚS, M.; ALBEROLA, J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern mediterranean. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, n.4, p. 676-680, 2007.
- SOUZA, I.A.; BARROS,S.M.E.; ISHIKAWA,E.; ILHA,N.M.I.; MARIN,B.R.G.; NUNES,B.L.V. Feline leishmaniasis due to *Leishmania*(*Leishmania*) *amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p.41-45, 2005.
- SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Editora MS, 1.ed., Brasília, 2004. 120p.
- VOLPINI,C.A.; PASSOS,A.M.V.; OLIVEIRA,C.G.; ROMANHA,J.A. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.*(*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.90, p.31-37,2003.
- TABAR, M.; ALTET, L.; FRANCINO, O.; SANCHEZ, A.; FERRER, L.; ROURA, X. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 151, p.332–336, 2008.
- TAFURI, L. W., SANTOS, L. R., ARANTES, E. M. R., GONÇALVES, M. N. M., MICHALICK, M. S. M. TAFURI, W. L. An Alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, p. 17–23, 2004.
- VITA, S.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E.; LUCIANI, A. Feline leishmaniasis and erlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Veterinary Research Communications**, v.9, p. 319-321, 2005.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção por *Leishmania* spp. ocorre nos felinos domésticos de área endêmica para leishmaniose humana e canina e deve merecer destaque na clínica de pequenos animais, uma vez que constitui uma zoonose. Ela pode estar presente inclusive em áreas onde não há casos de LVH.

O presente trabalho demonstrou o quanto a leishmaniose é sub diagnosticada na Medicina Veterinária, devido a falta de conhecimento da doença em gatos e apropriados métodos diagnósticos.

O advento das técnicas de diagnóstico moleculares permitem aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes diagnóstico que podem ser utilizados como rotina diagnóstica. Contudo mais estudos devem ser realizados para identificação de outras espécies e subespécies de *Leishmania* que acometem os gatos em diversas regiões do Brasil.

A ausência de alterações no exame físico, hematológicas e bioquímicas significantes quando comparado aos animais negativos apontam que os gatos infectados com *Leishmania* spp. são assintomáticos ou possuem uma infecção subclínica.

ANEXOS

1- Termo de Consentimento do Proprietário - Etapa 1

Termo de consentimento Livre e Esclarecido – Etapa 1

Eu, _____ RG: _____
Natural de: _____ nascida em: / / estado civil:
_____ Profissão: _____ Residente em: _____
Proprietária do animal: _____

Estou sendo convidado a participar de um estudo denominado Estudo da leishmaniose visceral nos felinos domésticos do Distrito Federal, cujos objetivos e justificativas são identificar através de técnicas moleculares (Reação em Cadeia Polimerase) o número de felinos domésticos infectados pela leishmaniose em áreas endêmicas no Distrito Federal e detectar as alterações hematológicas, bioquímicas e clínicas apresentadas. Após a análise dos resultados, a caracterização da leishmaniose visceral em felinos domésticos poderá ser conduzida, bem como permitirá avaliar o possível papel epidemiológico desta espécie na doença.

Minha participação no estudo será permitir que a equipe realizadora do projeto colete 3 mL de sangue do meu animal, para posterior análise. Os resultados deste estudo auxiliará veterinários no diagnóstico da leishmaniose visceral em felinos domésticos e contribuirá com a Saúde Pública quanto ao papel epidemiológico do gato em áreas endêmicas no Distrito Federal.

Declaro ter recebido os esclarecimentos necessários sobre possíveis desconfortos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após sua realização. Assim, o animal pode apresentar um desconforto no local da coleta de sangue, podendo ainda apresentar desconforto e irritação durante a coleta.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

O referido projeto será conduzido sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Giane Regina Paludo (coordenadora) e envolverá outros docentes e alunos desta instituição.

Tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Brasília, de de 20__.

Assinatura Proprietário

2- Termo de Consentimento do Proprietário - Etapa 2

Termo de consentimento Livre e Esclarecido – Etapa 2

Eu, _____ RG: _____

Natural de: _____ nascida em: / / estado civil:

_____ Profissão: _____ Residente em: _____

Proprietária do animal: _____

Estou ciente que o meu animal foi positivo para infecção por *Leishmania spp* e estou sendo convidado a participar de uma nova etapa do estudo denominado Estudo da leishmaniose visceral nos felinos domésticos do Distrito Federal, cujo objetivo e justificativa são analisar através de técnicas laboratoriais a apresentação da doença. Desta forma, a caracterização da leishmaniose visceral em felinos domésticos poderá ser conduzida, bem como permitirá avaliar o possível papel epidemiológico desta espécie na doença.

Minha participação no estudo será permitir que a equipe realizadora colete outro tipo de material biológico, autorizo o deslocamento do(s) meu(s) animal(is), para o

Hospital Veterinário da Universidade de Brasília/Clinica Particular, onde será (ão) submetido(s) a procedimento de anestesia geral para a punção de linfonodos, de medula óssea e biópsia de pele (orelha). Os resultados deste estudo auxiliarão médicos veterinários no diagnóstico da leishmaniose visceral em felinos domésticos e contribuirá com profissionais da área de Saúde Pública quanto ao papel epidemiológico do gato em áreas endêmicas no Distrito Federal.

Declaro ter recebido os esclarecimentos necessários sobre possíveis desconfortos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após sua realização. Assim, o animal pode apresentar um desconforto temporário no local da biópsia, podendo ainda apresentar desconforto e irritação durante os procedimentos de administração dos anestésicos. Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

O referido projeto será conduzido sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Giane Regina Paludo (coordenadora) e envolverá outros docentes e alunos desta instituição.

Tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Brasília, de _____ de 20__.

Assinatura Proprietário

3- Planilha de Hemogramas

| PROJETO LEISHMANIOSE FELINA | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|------|----|----|------|----|-------|------|------|------|------|------|------|---------|-------|---------|------------|
| DATA: | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PROCEDÊNCIA: | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ident | Sexo | VG | PT | Hem. | Hb | Leuc. | Mono | Linf | Eosi | Segm | Baso | Bast | Plaquet | Metar | Hematoz | Observação |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | | | | | | | | | | |

4- Planilha de Bioquímicos

| PROJETO LEISHMANIOSE FELINA | | | | | | |
|-----------------------------|---------------------|----------|-----------|-----|-------|------------|
| DATA: | | | | | | |
| PROCEDÊNCIA: | | | | | | |
| Nº | PROTEÍNAS TOTAIS | ALBUMINA | GLOBULINA | ALT | URÉIA | CREATININA |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | | | | | |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | | | | | | |
| 12 | | | | | | |
| 13 | | | | | | |
| 14 | | | | | | |
| 15 | | | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | | | | | | |
| 18 | | | | | | |
| 19 | | | | | | |
| 20 | | | | | | |

5- Formulário de Exame Físico Geral

| EXAME FÍSICO GERAL - DATA - LOCAL | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------|---------|------------|-----|----|----|-------|------|----------------|
| IDENTIF. | HIDRATAÇÃO | MUCOSAS | LINFONODOS | TPC | FC | FR | PULSO | PESO | ANAMNESE GERAL |
| AMOSTRA 1 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 2 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 3 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 4 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 5 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 6 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 7 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 8 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 9 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 10 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 11 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 12 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 13 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 14 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 15 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 16 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 17 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 18 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 19 | | | | | | | | | |
| AMOSTRA 20 | | | | | | | | | |