



*MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - CCA**

**LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL – LASAN**

Campus da Socopo - 64.049-550 Teresina, Piauí - Fone: 3215-5756.

DIANA SOUSA ALCÂNTARA

**POTENCIAL DE TRANSMISSÃO, RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PELE E  
PARASITISMO DE GATOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

TERESINA/PI

2019

DIANA SOUSA ALCÂNTARA

**POTENCIAL DE TRANSMISSÃO, RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PELE E  
PARASITISMO DE GATOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como exigência para a obtenção do grau Mestre, na área de concentração Sanidade e Reprodução Animal, linha de pesquisa Diagnóstico, Epidemiologia, Controle e Terapia de Doenças Animais.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivete Lopes de Mendonça

TERESINA/PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**A347p** Alcântara, Diana Sousa

Potencial de transmissão, resposta inflamatória da pele e parasitismo de gatos com leishmaniose visceral. / Diana Sousa Alcântara - 2019.  
66 f. : il.

Dissertação ( Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.  
Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivete Lopes de Mendonça

1. Leishmaniose 2. Inflamação 3. Parasitismo 4. Pele 5. Felino I. Título.

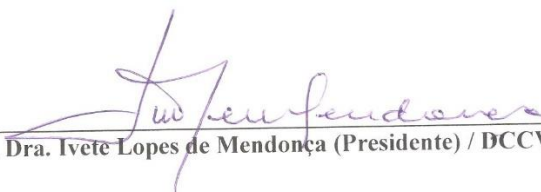
**CDD 636.089 6934**


POTENCIAL DE TRANSMISSÃO, RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PELE E  
PARASITISMO DE GATOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL

DIANA SOUSA ALCÂNTARA

Dissertação aprovada em: 27/02/2019

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça (Presidente) / BCCV/CCA/UFPI

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Hiro Goto (Externa) / IMT/USP

  
\_\_\_\_\_  
Profa Dra. Sílvia França Baeta (Interno) DCCV/ UFPI / CCA

A todos os animais que fizeram parte desse projeto, bem como aos pesquisadores e acadêmicos que, com muita dedicação e esforço, se empenham ao estudo epidemiológico de doenças zoonóticas, afim de contribuírem não somente para a preservação da saúde animal, mas principalmente para a segurança da vida humana.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer em primeiro lugar a Deus, por ter me feito seguir em frente com meus sonhos, não me fazendo desistir mesmo em face a tantos problemas pessoais que aconteceram na minha vida durante a execução desse projeto.

À minha mãe Maria da Cruz, pelo amor e dedicação que sempre teve comigo, me apoiando em todos os sentidos para que eu possa realizar meu sonhos. Sem ela como certeza eu não estaria nessa jornada.

Ao meu filho amado, Guilherme, razão pela qual nunca desisto dos meus sonhos mesmo quando tudo parece difícil.

À minha orientadora, por ter me aceito como sua orientada, bem como pela sua paciência e dedicação, sendo para o resto da minha vida um exemplo de ser humano e de profissional. Muito obrigada, professora! Não tem palavras no mundo que agradeça o suficiente.

À Universidade Federal do Piauí pela oportunidade única de realizar o curso de pós-graduação.

Ao Joilson Batista, por ser além de um colaborador, um ser humano maravilhoso, sempre disposto a ajudar e auxiliar em todos os momentos dúvidas e de necessidade. Um amigo que com certeza irei levar para o resto da minha vida.

Aos meus colegas Francisco Neto, Kayo Sandro, Carla Meneses e Islla Merigueti, por toda ajuda dada para execução desse projeto.

Ao Thiago Saraiva, pela amizade e ajuda durante todo esse tempo, sempre pronto a ajudar e com uma palavra amiga nas horas mais conturbadas.

À professora Silvia de Araújo Franca Baeta, pela ajuda nas necropsias e na interpretação das lâminas, com toda paciência e disponibilidade em ajudar.

À minha família e aos meus amigos que de alguma forma me apoiaram, me incentivando e acreditando na minha capacidade.

Ao meu namorado João Soares Alencar Neto, que nos últimos tempos tem sido meu maior incentivador e minha fortaleza em todos os momentos.

## SUMÁRIO

RESUMO -----	01
ABSTRACT -----	02
LISTA DE ABREVIATURA -----	03
1. INTRODUÇÃO -----	04
1.1. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO -----	08
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	09
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO -----	09
2.2. CICLO BIOLÓGICO -----	10
2.3. SINAIS CLÍNICOS -----	11
2.3.1 SINAIS DERMATOLÓGICOS -----	11
2.4. RESPOSTA IMUNE -----	12
2.4.1 MECANISMOS DE EVASÃO E INTERAÇÃO -----	12
2.4.2 INTERAÇÃO COM NEUTRÓFILOS -----	13
2.5. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS -----	13
2.6. DIAGNÓSTICO -----	14
2.7. RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PELE -----	15
2.8. LEISHMANIOSE FELINA -----	18
3. CAPÍTULO I: POTENCIAL DE TRANSMISSÃO, RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PELE E PARASITISMO EM GATOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL -----	21
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS -----	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO -----	41
6. ANEXOS -----	48

## RESUMO

ALCÂNTARA, D.S. Potencial de transmissão, resposta inflamatória da pele e parasitismo de gatos com Leishmaniose visceral. 2019. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

Em estudos mais recentes infecções por *Leishmania sp.* em gatos domésticos têm sido reportadas em vários países da bacia mediterrânea e no Brasil, onde essa parasitose é endêmica. Em áreas endêmicas de leishmaniose, os gatos, tal como os cães, são susceptíveis à infecção por *Leishmania sp.*, no entanto ainda pouco se conhece sobre o papel dessa espécie dentro da cadeia epidemiológica e como a doença evolui em felinos. O objetivo desse trabalho foi identificar o potencial de transmissão, resposta inflamatória da pele e parasitismo de gatos com leishmaniose visceral domiciliados na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Foram utilizados doze animais, seis para o grupo controle e seis com leishmaniose. Os animais diagnosticados com a doença foram submetidos ao xenodiagnóstico e depois realizada sedação para análise citológica e histopatológica, retirando-se fragmentos de pele da face externa da orelha, região periocular, focinho, dorso e nódulos subcutâneos nos animais que apresentaram essa alteração. No xenodiagnóstico, apenas os animais um e dois não foram capazes de infectar o vetor, os outros animais infectaram 49,31%, 31,25%, 51,35% e 73,8% respectivamente. No imprint, 100% (6/6) das lâminas da orelha foram observadas formas amastigotas de *Leishmania sp.* sendo o fragmento de pele que apresentou maior número de parasitas. No exame histopatológico 61% dos animais apresentaram dermatite histiocitária de moderada a discreta e não houve correlação significativa entre a intensidade de infiltrados inflamatórios e a carga parasitária e nem entre o número de insetos infectados e a intensidade de infiltrados inflamatórios. Tendo em conta os dados obtidos, verifica-se que é necessário alertar os médicos veterinários de que a leishmaniose felina é um diagnóstico diferencial em áreas endêmicas, principalmente em gatos apresentando sinais dermatológicos e que é essencial a aplicação de medidas profiláticas para salvar a saúde animal e a saúde pública.

**Palavras-chave:** inflamação, parasitismo, pele, felino, leishmaniose



## ABSTRACT

In more recent studies infections by *Leishmania* sp. in domestic cats have been reported in several countries in the Mediterranean basin and in Brazil, where this parasite is endemic. In endemic areas of leishmaniasis, cats, such as dogs, are susceptible to infection by *Leishmania* sp., Yet little is known about the role of this species within the epidemiological chain and how the disease progresses in felines. The objective of this work was to identify the transmission potential, inflammatory response of the skin and parasitism of cats with visceral leishmaniasis domiciled in the city of Teresina, Piauí, Brazil. Twelve animals were used, six for the control group and six with leishmaniasis. The animals diagnosed with the disease underwent xenodiagnosis and then sedation for cytological and histopathological analysis. Skin fragments were removed from the external face of the ear, periocular region, snout, dorsum and subcutaneous nodules in the animals that presented this alteration. In the xenodiagnosis, only one and two animals were not able to infect the vector, the other animals infected 49.31%, 31.25%, 51.35% and 73.8%, respectively. In the imprint, 100% (6/6) of the ear blades were observed amastigote forms of *Leishmania* sp. being the fragment of skin that presented greater number of parasites. In the histopathological examination, 61% of the animals presented moderate to discrete histiocytic dermatitis and there was no significant correlation between the intensity of inflammatory infiltrates and the parasite load nor between the number of infected insects and the intensity of inflammatory infiltrates. Taking into account the data obtained, it is necessary to warn veterinarians that feline leishmaniasis is a differential diagnosis in endemic areas, especially in cats with dermatological signs, and that it is essential to apply prophylactic measures to safeguard animal health and public health.

**Key words:** inflammation, parasitism, skin, feline, leishmaniasis

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ag – MHC classe II:	LVC: leishmaniose visceral canina
APCs: células apresentadoras de antígenos	LF: leishmaniose felina
COX-2: cicloxigenase – 2	LV: leishmaniose visceral
CLs: células de Langerhans	LGP: lipofosfoglicano
C3a: complemento 3a	MEC: matriz extracelular
DAMPS: danos moleculares associados ao dano celular	PCR: reação em cadeia de polimerase
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
FIV: vírus da Imunodeficiência felina	PRRs: receptores de reconhecimento padrão
IFN- $\gamma$ : interferon gama	SD: sinais dermatológicos
IgG: imunoglobulina G	T CD4+: linfócito T CD4+
IL-1: interleucina 1	T CD3+: linfócito T CD3+
IL-2 interleucina 2	TFN- $\alpha$ : fatores de crescimento tumoral alfa
IL-6: interleucina 6	TGF- $\beta$ : fator de crescimento e transformação $\beta$
IL-8: interleucina 8	ULD: unidade de Leishmania Donovanii
IL-12: interleucina 12	VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular
IL-17: interleucina 17	WHO: world health organization
IMIQ: imunohistoquímica	

## 1. INTRODUÇÃO

Os parasitos de importância médica são inúmeros, dentre eles, destaca-se o protozoário *Leishmania*, que é agente de um amplo espectro de doenças, coletivamente referidas como leishmanioses (ASHFORD, 2000). As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitas protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania*. Esses parasitas são transmitidos aos seres humanos pelas picadas do mosquito flebotomíneo fêmea infectado - um minúsculo vetor de insetos com apenas 2 a 3 mm de comprimento. Existem três formas principais de leishmaniose: cutânea, visceral e mucocutânea. Em 2017, 20.792 dos 22.145 (94%) casos novos notificados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. (WHO, 2017).

Nas Américas, no período de 2001-2016 foram reportados 55.530 casos humanos de LV com uma média anual de 3.457 casos, sendo 96% dos casos de leishmaniose visceral são reportados no Brasil e se destaca-se o aumento de mortes causadas por leishmaniose visceral desde 2012, período em que esta informação está disponível a nível regional, alcançando em 2016 uma taxa de letalidade de 7,9% nas Américas, considerada a mais elevada quando comparada a outros continentes. A proporção de casos de leishmaniose cutânea em crianças menores de 10 anos também alcançou em 2016 seu maior valor (15,5%) e alguns países registraram mais de 40% da população afetada neste grupo etário sendo deste grupo etário (OPAS/OMS, 2018).

O modo de transmissão habitual do protozoário é através da picada de fêmeas de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae; Phlebotomínae) pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1999).

Os cães, atuam como hospedeiros reservatórios do parasita na infecção humana da Leishmaniose visceral, possibilitando a infecção do vetor, sendo portanto entre os animais domésticos, o principal reservatório (GONTIJO & MELO, 2004). Animais silvestres como *Speothos venaticus* (cão do mato), *Chrysocyon brachyurus* (lobo guará) e *Cerdocyon thous* (raposa do mato) podem atuar como reservatórios, apesar do cão doméstico ser considerado o principal reservatório urbano. Outras

espécies de vertebrados como roedores, equídeos e felinos também já foram evidenciadas com a doença (METZDORF et al, 2017).

Nos últimos anos, houve um grande avanço nas técnicas laboratoriais, o que pode ter contribuído para o crescente número de diagnósticos positivos. Também, profundas alterações nos ecossistemas, ocorridas nos últimos anos, o crescente uso de coleiras à base de deltametrina, que previnem a leishmaniose em cães, evitando a picada pelo mosquito, podem levar a mudanças de hábito alimentar do vetor, assim como a adaptação a novas espécies de hospedeiro (NOÉ, 2008).

Apesar da leishmaniose felina (LF) ser considerada de rara ocorrência (PENNISI, 2000; MANCIANTI, 2004), nos últimos anos houve um aumento no número de casos relatados em todo o mundo, e são poucas as informações sobre vários aspectos da doença, principalmente no que diz respeito à epidemiologia, visto que grande parte dos dados obtidos foram relatos de casos clínicos.

Estudos recentes também detectaram infecções por *Leishmania* em gatos domésticos (por exemplo, SOUZA et al., 2009, BRESCIANI et al., 2010, VIDES et al., 2011). Em todo o mundo, cinco espécies de *Leishmania* foram relatadas em gatos, embora a maioria dos casos envolva *L. infantum* (PENNISI et al., 2013). As taxas de prevalência podem ser superiores a 40% em algumas áreas endêmicas (CHATZIS et al., 2014). Embora esses fatores indiquem que os gatos domésticos provavelmente desempenham um papel importante na epidemiologia da leishmaniose, seu papel tem sido largamente negligenciado e permanece controverso. Não se sabe se os gatos domésticos servem como hospedeiros primários, secundários ou acidentais (MAIA E CAMPINO, 2011, PENNISI et al., 2015).

Em alguns animais, os sinais clínicos se desenvolvem logo após o período de infecção. Em outros casos, os animais infectados podem permanecer assintomáticos por toda a vida ou manifestarem-se apenas em casos de imunossupressão (CFSPH, 2009). A pele é o local onde mais comumente se manifestam os sinais clínicos da doença. Apresenta ainda grande importância na LVC por ser o órgão onde ocorre a primeira interação entre o parasita e o sistema imune canino (CIARAMELLA et al., 1997).

O gato doméstico é um dos mamíferos susceptíveis à infecção por *Leishmania* spp. e pelo fato de ser uma espécie crescente como *pet*, faz-se necessário identificar sua participação no ciclo epidemiológico das leishmanioses. Apesar de serem susceptíveis, os gatos parecem ter uma resistência natural e, geralmente, as

leishmanioses em felinos estão associadas às doenças que causam imunossupressão. A forma cutânea é a mais relatada em felinos (PIRAJÁ, et al., 2013).

Alterações da pele (pápulas, nódulos, úlceras, eritema, alopecia) são os sinais clínicos mais frequentes de Leishmaniose em gatos, independentemente da espécie de *Leishmania* causadora da infecção. A cabeça e em particular, orelhas externas, plano nasal, focinho e região periocular, são as áreas mais afetadas, presumivelmente a sua maior exposição aos vetores como eles são menos cobertos pela pele (PENNISI, et al., 2015).

A resposta imunológica ao parasita tem um forte impacto no desenvolvimento ou na supressão da doença. A infecção por *Leishmania* pode resultar em dois tipos de resposta imunitária associadas à atividade dos linfócitos: a resposta humoral, não protetora, associada à suscetibilidade à doença, e a resposta celular, promotora da resistência à infecção (MAIA, 2008).

O diagnóstico laboratorial da doença é realizado basicamente por meio de exames sorológicos e parasitológicos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), fixação do complemento, aglutinação direta, observação dos amastigotas ou avaliação imuno-histoquímica (IMIQ). A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo também utilizado como método de confiabilidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SILVA et. al., 2014).

Tendo em vista que qualquer animal saudável que viva ou visite áreas endêmicas necessita de proteção (GRAMICCIA, 2011), deve-se proceder com medidas de prevenção contra a infecção, o que inclui a aplicação de métodos de diagnóstico sensíveis, o uso de coleiras inseticidas e a pulverização com princípios eficazes (DANTAS-TORRES, et al., 2012). Dentre as classes de agentes utilizados cita-se a deltametrina, lambdacyalotrina, alfacipermetrina, cypermetrina, cyflutrina, Betacyflutrina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Os colares de liberação lenta têm duração de vários meses, sendo uma opção prática para a proteção dos animais contra os vetores de *Leishmania* spp. (GRAMICCIA, 2011). Há recomendação do uso de piretróides para repelir os flebotomíneos (GRAMICCIA, 2011; MAIA-ELKHOURY, 2008). A coleira impregnada com flumetrina e imidacloprida é considerada uma opção confiável (NOÉ, 2016), apesar idiosincrasia dos felinos com esses princípios ativos (BOURDOISEAU, 2011).

Os registros de infecção natural em gatos domésticos e a alta densidade populacional de gatos em áreas urbanas destaca a necessidade de analisar a capacidade desses animais de sustentar e disseminar a infecção em ambientes naturais e urbanos (MAIA E CAMPINO, 2011).

## **JUSTIFICATIVA**

Considerando a importância da Leishmaniose para saúde pública e o crescente aumento dos números de casos tanto em animais como em humanos, torna-se necessário aprofundar os conhecimentos a respeito do papel dos felinos domésticos no ciclo biológico da doença, tendo em vista seus hábitos crepusculares e noturnos, similares aos dos flebotomíneos, podem predispor esta espécie animal á infecção por *Leishmania* sp., tornando-se um possível reservatório potencial.

## **ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO**

Esta Dissertação foi estruturalmente organiza nas seguintes partes:

Introdução e Revisão de Literatura, redigidas segundo as normas editoriais do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, um capítulo na forma de artigo científico a ser submetido à publicação assim intitulado: Capítulo I – “ Potencial de transmissão, resposta inflamatória da pele e parasitismo em gatos com leishmaniose visceral”, onde foi redigido e formatado segundo as normas do periódico Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences (Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia) , classificação A2 pelo Qualis Capes e Considerações finais.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Agente etiológico

Protozoários do gênero *Leishmania* são organismos digenéticos e unicelulares. Durante o ciclo de vida, este gênero apresenta duas formas principais: amastigota (Figura 1A) forma aflagelar, imóvel que tem um núcleo relativamente grande e redondo ocupando de metade a dois terços do corpo celular e está presente nos vertebrados, e promastigota (Figura 1B) sem flagelo externo, longa e achatada com cinetoplasto na posição anterior do parasita, próximo ao flagelo. presentes nos invertebrados (MICHALICK, 2005).

Todas as espécies do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanossomatidae (Tabela 1).

As espécies mais frequentemente implicada nos casos de LV são *Leishmania donovani* ou *L. infantum*. As leishmanioses cutâneas do Velho Mundo são causadas por *L. tropica* ou *L. major*, enquanto no Novo Mundo são causadas por exemplo por *L. braziliensis*, já a mucocutânea é causada por *L. braziliensis* ou *L. panamensis* (OMS, 2010).

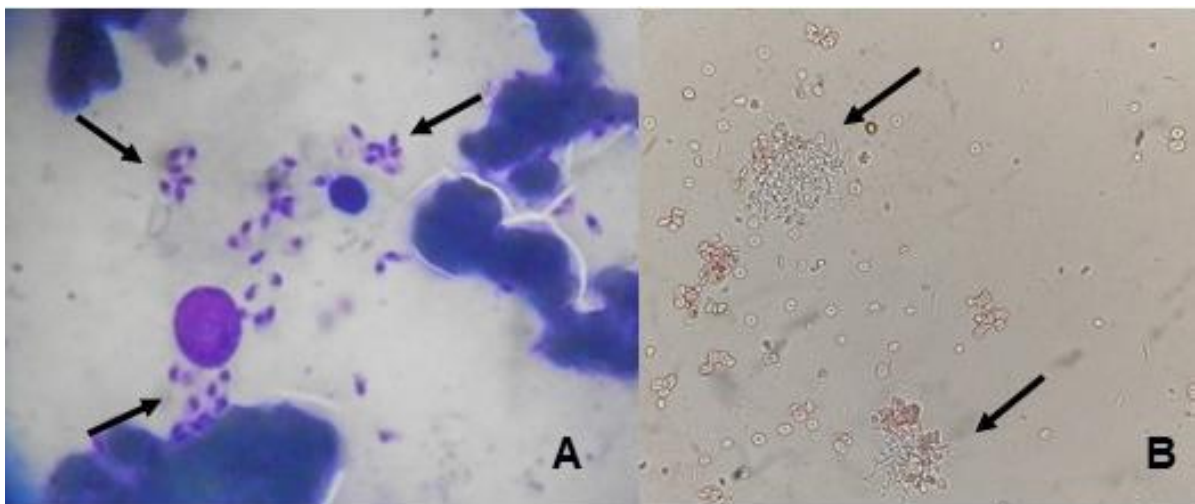


Figura 1 (A) formas amastigotas de *Leishmania* sp. (B) formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sp. extraídas de cultura em meio NNN.

**Tabela 1:** Classificação taxonômica do gênero *Leishmania*, adaptado de Faria, (2008).

<b>Reino</b>	Protista
<b>Filo</b>	Sarcomastigophora
<b>Classe</b>	Zoomastigophora
<b>Ordem</b>	Kinetoplastida
<b>Família</b>	Trypanosomatidae
<b>Gênero</b>	<i>Leishmania</i>

## 2.2 Ciclo Biológico

As leishmanioses possuem um ciclo biológico caracterizado como heteroxênico, no qual se necessita de dois hospedeiros, um vertebrado representado por canídeos silvestres e domésticos, roedores e humanos e um invertebrado, representado pelo inseto vetor (REY, 2001).

O flebótomo vetor desse protozoário tem por volta de dois a três milímetros de comprimento e é encontrado em todas as regiões intertropicais e temperadas do mundo. Geralmente a fêmea deposita seus ovos em tocas de roedores, troncos de árvores, prédios em ruínas, rachaduras, abrigos de animais e lixo doméstico, onde as larvas podem encontrar a matéria orgânica, calor e umidade que necessitam para se desenvolver. Uma vez que precisa de sangue para o desenvolvimento de seus ovos, a fêmea torna-se infectada com *Leishmania* spp. no momento em que ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas a partir do sangue de animais infectados.

No trato digestivo anterior da fêmea ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as formas amastigotas, que se reproduzem por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas promastigotas. Estas, por sua vez, diferenciam-se em paramastigotas e colonizam o esôfago e a faringe do vetor. A partir

de então as paramastigotas se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas e são inoculadas em novos indivíduos no momento da picada, fechando o ciclo de transmissão (MAIA et al, 2009).

### **2.3 Sinais clínicos**

Segundo, Manciant, et al (1998), o quadro clínico observado na leishmaniose visceral é variável e dependente da susceptibilidade e/ou resistência do hospedeiro e da cepa transmitida, podendo ser classificados em: assintomático, quando o animal apresenta nenhum sintoma sugestivo da doença; oligossintomáticos quando apresentar no máximo três sinais clínicos somados à moderada perda de peso, alopecia localizada, pelos opacos, ou pelo menos um destes três sinais; e polissintomáticos quando apresenta sinais clássicos da Leishmaniose, associados há mais de 3 sintomas tais como lesões cutâneas, pelos opacos, severa perda de peso, apatia, ceratoconjuntivite seca, entre outros.

Os sintomas clínicos mais frequentes observados na LVC incluem dificuldade locomotora, perda de peso, polidipsia, apatia, anorexia, vômito, diarreia, polifagia, epistaxe e melena. Dentre os achados de exame físico, merecem destaque a linfadenomegalia, caquexia, hipertermia, esplenomegalia, uveíte e conjuntivite (SALZO, 2008). Feitosa et al. (2000) observaram nos cães naturalmente infectados por *Leishmania*, principalmente, linfadenomegalia, alterações dermatológicas, hiporexia, onicogribose, emaciação, mucosas pálidas, sinais oculares, hipertermia, êmese e diarreia.

#### **2.3.1 Sinais dermatológicos**

As manifestações cutâneas na LVC podem estar presentes entre 50 a 90% dos cães infectados. O sinal dermatológico mais comum é de uma dermatite esfoliativa com escamas esbranquiçadas similares a asbestos. Essa esfoliação pode ser generalizada, mas geralmente é mais pronunciada na cabeça, orelhas e extremidades. A descamação pode ser seguida de hiperqueratose naso-digital e áreas de alopecia e, hipotricose. Com a progressão da doença, nódulos e ulceração multifocal também podem acompanhar a descamação principalmente nas orelhas e no focinho. Outras apresentações incluem onicogribose, paroníquia, dermatite pustular estéril, despigmentação nasal com erosão e ulceração e piodermite bacteriana (SCOTT et al., 2001). Salzo (2008) afirmou que a dermatite esfoliativa é a principal

manifestação cutânea em cães com LVC e, que pústulas, úlceras e nódulos podem ocorrer frequentemente, assim como onicogribose. Os locais mais severos e comumente afetados são o plano nasal, focinho, região periocular e pavilhões auriculares.

## 2.4 Resposta Imune

A resposta imunitária ao parasita tem um forte impacto no desenvolvimento ou na supressão da doença. A infecção por *Leishmania* pode resultar em dois tipos de resposta imunitária associadas à atividade dos linfócitos: a resposta humoral, não protetora, associada à suscetibilidade à doença, e a resposta celular, promotora da resistência à infecção (Maia, 2008). A infecção por *L. infantum* nos cães pode manifestar-se de forma subclínica, doença auto-limitante, doença não limitante e em doença grave com manifestações clínicas de doenças sistêmicas.

Nos cães, a resposta imune caracteriza-se por uma imunidade protetora mediada pelas células T CD4, pela libertação de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) e fatores de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que induzem a atividade microbicida dos macrófagos (GREENE, 2006).

Hervás *et al.* (2002) realizaram o único estudo efetuado em gatos até ao momento sobre a resposta imunitária local à infecção por *Leishmania* sp.. Nesse estudo, caracterizou-se por técnica de imunohistoquímica o infiltrado celular e as citocinas associadas à infecção por *Leishmania* nas lesões cutâneas, oculares e orais de um gato co-infectado pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV). Nas reações nodulares granulomatosas houve um número elevado de linfócitos CD3+ e células plasmáticas secretoras de IgG+ associados a uma elevada expressão de Ag-MHC classe II por numerosos linfócitos e células macrofágicas, indicando uma boa resposta imunitária local (tipo IV) a qual terá sido, possivelmente, a responsável pela não disseminação sistémica da infecção (ROSA, 2009).

### 2.4.1 Mecanismos de evasão e Interação com os macrófagos

Os mecanismos de evasão estão relacionados com a capacidade da *Leishmania* de reduzir ou inibir funções celulares. No interior dos macrófagos, o lipofosfoglicano (LPG) da promastigota metacíclica perturba o funcionamento correto da fusão dos endossomos e lisossomos com o fagossomo, gerando um VP sem total acidificação (DESJARDINS & DESCOTEAUX, 1997). Esse evento permite que haja

tempo para assumir a forma amastigota, mais resistente ao ambiente ácido e proteolítico. Além disso, o parasita inibe a produção de interleucina 12 (IL-12) que está envolvida na ativação de linfócitos T CD4+ Th1 (SACKS & SHER, 2002). Macrófagos infectados aumentam a expressão de interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ), ambos suprimem a resposta imune eficaz anti-*leishmania* (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998). Para ganhar tempo de se multiplicar no interior dos macrófagos, o parasita consegue atrasar a apoptose induzida via fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e fator estimulador de granulócito e macrófago (GM-CSF) (MOORE & MATLASHEWSKI, 1994).

#### 2.4.2 Interação com neutrófilos

A primeira linha celular de defesa recrutada são os neutrófilos, chegando durante as primeiras horas ao local de inoculação das promastigotas (MULLER et al, 2001) com a função de fagocitar e eliminar patógenos, bem como recrutar outras células. Os neutrófilos são recrutados por interleucina 8 (IL-8), interleucina 17 (IL-17), complemento C3a, TNF, fator quimiotático secretado por promastigotas (VAN ZANDBERGEN, 2002). Alguns estudos caracterizam os neutrófilos como células hospedeiras intermediárias que albergam a *Leishmania* até que ela possa infectar, de maneira silenciosa e sem reconhecimento, os macrófagos recrutados que se instalam no sítio inflamatório dias após a infecção. Isto se torna possível devido ao aumento da sobrevivência dos neutrófilos em consequência do retardo da apoptose espontânea provocado pela infecção por *Leishmania*. (GUEIRARD et al, 2008 e AGA, et al, 2002).

### 2.5 Alterações histopatológicas

A pele é o primeiro ponto de contato com organismos do gênero *Leishmania spp.* durante o processo de infecção. No curso da doença, a densidade parasitária tem sido associada com um padrão inflamatório granulomatoso em cães com LV. O alto parasitismo observado na pele de cães infectados mostra o papel do cão na disseminação da leishmaniose enfatizando o risco para saúde pública, especialmente porque estes animais dividem o mesmo habitat do homem (CALABRESE *et al.*, 2010). Por esta razão, a pele deve ser considerada como melhor local para análise parasitológica, sendo um indicador confiável da severidade da doença clínica na LV. Segundo Giunchetti et al. (2007), cães sintomáticos mostraram um grande número de alterações cutâneas exemplificada

por um intenso infiltrado inflamatório dermal difuso, mudanças na matriz extracelular e carga parasitária extrema.

Os parasitas depositados na pele do mamífero pelo flebótomo infectado, ultrapassam uma variedade de obstáculos, incluindo a matriz extracelular (MEC), as proteínas da camada basal para, em seguida, migrarem para outros órgãos ou estabelecer infecção dentro do fagolisossomo dos macrófagos (MELO, 2005).

Calabrese *et al.* (2010) descreveram um infiltrado inflamatório rico em mastócitos degranulados associados aos parasitas na pele dos cães de Campo Grande. Isto reforça a idéia que mastócitos participam da defesa no hospedeiro, modulando a resposta imunológica durante a invasão do patógeno. Segundo Melo, (2005), é amplamente conhecida que a resposta imune cutânea no estágio inicial da infecção tem papel determinante para o curso da doença. Dentro de poucas horas após a inoculação do parasita, ocorre uma massiva infiltração celular constituída predominantemente de macrófagos os quais entram em contato rapidamente com o parasita. Portanto, avaliar as alterações cutâneas, torna-se importante devido a sua influência na transmissão da doença.

Estudos tem demonstrado que formas amastigotas na pele podem estar implicadas na degradação de componentes da matriz extracelular da pele. O tecido conjuntivo e as membranas basais são as principais barreiras envolvidas na invasão, disseminação e nutrição de parasitas. A secreção de enzimas proteolíticas pelo parasita e de fundamental importância na interação entre este e o hospedeiro. Esta interação inclui invasão e destruição do tecido do hospedeiro e a habilidade do parasita em migrar para o local específico e ou estabelecer condições nutricionais que favoreçam o seu desenvolvimento (ALVES *et al.*, 2010).

## **2.6 Diagnóstico**

O diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser realizado devido à variedade de sintomas da doença. Além disso, os animais podem permanecer assintomáticos por toda a vida ou desenvolver sintomas após períodos que variam de três meses a alguns anos. Além disso, os achados clínicos são comuns a outras enfermidades, sendo as alterações laboratoriais encontradas no hemograma, ou nos exames de função renal ou hepática inespecíficos.

A confirmação do diagnóstico da LVC pode se basear em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. O diagnóstico parasitológico é

considerado por alguns autores, um exame chave, onde se observa as formas amastigotas da *Leishmania* em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos corados com corantes de rotina, tais como Giemsa, Wright e Panótico. A citologia aspirativa é um método de fácil execução, amplamente utilizado no diagnóstico, especialmente em clínicas veterinárias (IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007).

## **2.7 Resposta inflamatória na pele**

A pele é um dos principais mecanismo de defesa inicial dos animais contra agentes exógenos, recobrando toda a superfície do corpo dos animais formando uma barreira física, sendo constituída pela epiderme e derme, sendo a epiderme, de origem ectodérmica, formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, que pode ser subdividida em 5 camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. Entre os principais constituintes celulares da pele estão os queratinócitos, células dendríticas maduras e imaturas, monócitos/macrófagos, granulócitos, dentre outras (SIMPSON et al., 2011). Também fazem parte dessa composição os constituintes humorais as  $\beta$ -defensinas, proteínas do complemento, imunoglobulinas, citocinas, quimiocinas, radicais livres e prostaglandinas (BOS et al., 2009). Estes componentes celulares e humorais formam o sistema imune da pele (GERNER et al., 2015).

As células precursoras da medula óssea dão origem às células de Langerhans localizadas entre os queratinócitos, principalmente na camada espinhosa, e transportadas pelo sangue (NESTLE et al., 2009), e juntamente com as células dendríticas na derme, são capazes de capturar antígenos, processá-los e apresentá-los aos linfócitos T, sendo importante para a resposta imune cutânea (GERNER et al., 2015).

A pele também conta tanto com mecanismos de imunidade inata quanto adaptativa, além da barreira física. Os mecanismos de defesa inatos estão relacionados a fatores secretados por glândulas sebáceas e sudoríparas, células sentinelas e células fagocíticas. As células sentinelas fazem uma correlação entre a resposta imune inata e adaptativa, sendo consideradas células apresentadoras de antígeno (APCs) e importantes tanto para a resposta a infecções como também para manutenção da tolerância imunológica (BRANDONISIO et al., 2004). As primeiras células a chegarem no sítio após a picada do flebotomíneo infectado com *Leishmania* spp, são os neutrófilos, os quais podem contribuir direta ou indiretamente na

eliminação do parasito. Os monócitos são recrutados da corrente sanguínea para o local de infecção por diapedese estimulados pelas quimiocinas CCL2, produzidas pelas células no local da infecção após sua ativação pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Os monócitos são importantes para o controle do parasita nos momentos mais iniciais da infecção devido a sua potente resposta com espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre os agentes invasores (SCOTT; NOVAIS, 2016).

O processo inflamatório ocorre com a ativação das diversas vias de liberação de citocinas inflamatórias estimuladas pela inoculação do protozoário através do rompimento das barreiras físicas da pele. Esse processo inflamatório lesivo da pele em cães afetados pela leishmaniose pode se agravar à medida que temos o alojamento e aumento da carga parasitária na pele desses animais e principalmente quando a evolução da infecção desencadeia danos epiteliais característicos das infecções secundárias, tais como observadas na dermatite papular (LOMBARDO et al., 2014, ORDEIX et al., 2006). O processo inflamatório pode ser classificado como agudo ou crônico, onde, no primeiro caso, os mecanismos de defesa celulares e vasculares atuam em um espaço curto de duração, em que é observado um aumento da permeabilidade vascular, com migração de leucócitos em geral, mas principalmente neutrófilos. Por outro lado, a inflamação crônica caracteriza-se por sua duração mais longa, permanecendo instalada e influenciando a persistência crônica de macrófagos, angiogênese e dano tecidual (FREIRE; VAN-DYKE, 2013).

No momento em que as células de defesa como monócitos e macrófagos são ativadas em resposta ao estímulo inflamatório devido a danos teciduais ou infecções, temos uma conseqüente ativação da resposta de fase aguda, onde diversas citocinas são liberadas pelas células inflamatórias, tais como IL-6, IL-8, IL-1 e TNF- $\alpha$ . Essa resposta de fase aguda é um tipo mecanismo de defesa rápida e não específica contra distúrbios que alterem a homeostasia, tanto de forma localizada como generalizada, alterações essas que podem ser desencadeadas por inflamação, infecções, dano tecidual, neoplasia entre outros (PETERSEN et al., 2004). Na infecção por *Leishmania* spp., em camundongos e humanos, as células dendríticas tem a função de apresentar antígenos processados para células T CD4<sup>+</sup> naive, o que desencadeia uma diferenciação dessas células em uma resposta que pode ser tanto do tipo Th1 como Th2 de acordo com estímulos de patógenos e de citocinas liberadas, sendo a resposta predominante de Th1, mediada principalmente por IL-12, a principal responsável pelo



sucesso da resposta celular contra o parasita (BRANDIONISIO, 2004). Com relação as células de Langerhans (CLs), são células dendríticas residentes na epiderme e correspondem as APCs mais abundantes da pele.

Nas superfícies das células sentinelas, são expressos os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), são responsáveis não só pelo reconhecimento das moléculas PAMPS (Peptídeos moleculares associados aos patógenos), mas também pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a dano celular (DAMPS) e as moléculas relacionadas ao dano e morte celular ou alarminas, presentes no desenvolvimento das alterações inflamatórias de curso crônico de muitas doenças (PICCININI; MIDWOOD, 2010).

Em um estudo com camundongos, foi observado que os parasitas da leishmaniose podem ser capazes de modular negativamente a ativação da resposta inflamatória, esse mecanismo ocorre via infecção das células dendríticas pela promastigota da *L. infantum* promovendo clivagem de subunidades do NF- $\kappa$ B (são um grupo de proteínas que regulam a transcrição genética que codifica várias proteínas pró-inflamatórias bem como quimiocinas e moléculas de adesão), levando a uma desaceleração na maturação ou ativação das células infectadas pelo protozoário (NEVES et al., 2010). Esse efeito negativo sobre o NF- $\kappa$ B afetando as células dendríticas e macrófagos infectados desencadeia diminuição na produção de citocinas e de enzimas relacionadas a produção de mediadores inflamatórios secundários, tornando a resposta imune à leishmaniose, em especial a Th1, menos eficiente.

O NF- $\kappa$ B tem participação importante também em processos de controle anti-inflamatório, atuando diretamente na inibição da expressão de genes pró-inflamatórios e também na modulação da expressão e ativação de citocinas diversas como a IL-10. Por outro, o NF- $\kappa$ B como fator de transcrição também tem função crucial para o processo inflamatório na síntese de citocinas dentre as quais TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009). Além desses mediadores inflamatórios, o NF- $\kappa$ B também tem importância na expressão da cicloxigenase-2 (COX-2) e também importância em processos de angiogênese e possivelmente participação na expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de angiogênico importante no processo inflamatório. Através da estimulação das citocinas TNF- $\alpha$  e da IL-1 pelas vias de ativação do NF- $\kappa$ B (TNF- $\alpha$ ), temos a estimulação de células endoteliais e conseqüente aumento da expressão de moléculas de adesão, favorecendo à migração neutrofílica (BEHM et al., 2012).

## 2.8 Leishmaniose felina

A leishmaniose em gatos foi descrita pela primeira vez em 1912, na Argélia. A partir de então, a doença em felinos vem sendo alvo de estudos em diversas regiões do mundo. O primeiro caso relatado no Brasil foi descrito por Mello, em 1940, de um gato com lesões na orelha e no plano nasal, sem a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida (SIMOES-MATTOS et al., 2004). Somente no ano de 2002 foi diagnosticado um gato nativo de Cotia, São Paulo, área onde nenhum caso autóctone de leishmaniose visceral humana ou canina havia sido relatado (COELHO et al, 2011).

Apesar da prevalência da doença ser baixa, o número de casos clínicos de leishmaniose felina e de infecções por *Leishmania* reportados em países endêmicos tem aumentado devido ao incremento de estudos epidemiológicos, à melhoria das técnicas de diagnóstico e à sensibilização de profissionais (ROSA, 2009).

Em áreas endêmicas de leishmaniose, os gatos, tal como os cães, são suscetíveis à infecção por *Leishmania sp.* Estes animais cumprem vários requisitos necessários para poderem ser considerados reservatórios tais como: (i) estar em estreito contato com o vetor, se tiver acesso ao exterior durante o pôr-do-sol e o amanhecer, (ii) pela sua tendência territorial e deslocamentos perto de vegetação rasteira, zonas húmidas e resguardadas, locais ideais para o crescimento do vetor; (iii) coabitação com o homem; (iv) apresentar parasitas no sangue periférico e pele e (v) capacidade de transmitir os parasitas aos vetores (PINTO, 2013).

Os cães domésticos são considerados os únicos reservatórios primários comprovadamente conhecidos para infecção por *L. infantum*. Foi considerado durante muito tempo que os gatos não tinham qualquer papel na epidemiologia de *L. infantum* em áreas endêmicas. Esta visão se deu pelo fato de que, por um longo período, muito poucos casos de leishmaniose clínica foram descritos em gatos em comparação com cães, e isso levou a acreditar que os gatos fossem resistentes à infecção. Essa interpretação mudou, como os conceitos de reservatório e a susceptibilidade em hospedeiros infectados agora são melhores entendidos. A maioria dos cães infectados não exibe sinais clínicos (pelo menos por um longo período), embora eles possam servir como fontes de infecção para o vetor. Durante as últimas duas décadas, muitos Mamíferos selvagens foram diagnosticados com infecção por *Leishmania* através de métodos sorológicos e / ou moleculares. No entanto, seu papel como fontes confiáveis de infecção permanente são desconhecidos (PENNISI et al, 2015).

O primeiro caso relatado no Brasil foi relatado no estado do Pará, de um gato com lesões na orelha e no plano nasal, sem a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida (MELLO, 1940).

Em estudos mais recentes, infecções por *Leishmania sp.* em gatos domésticos têm sido reportadas em vários países da bacia mediterrânea e no Brasil, onde essa parasitose é endêmica (MAIA et al., 2010).

Em um estudo realizado no município de Teresina, Piauí, Brasil, por Mendonça et al. (2017), área endêmica de LV no Brasil, a prevalência na população em estudo foi A prevalência de infecção por *Leishmania spp.* na população em estudo foi de 4% (3/83) no ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e 4% (3/83) por meio da observação do esfregaço e isolamento em meio de cultura, utilizando amostra de linfonodo.

Os sintomas em gatos são inespecíficos e assemelham-se ao quadro clínico observado em cães. Alguns animais podem apresentar-se com perda de peso e massa muscular, desidratação, linfadenomegalia local ou generalizada. No entanto não são raras as descrições de gatos parasitologicamente positivos e assintomáticos (COSTA, 2008).

Dos casos relatados de leishmaniose felina, com manifestações cutâneas, as mais frequentes foram lesões ao nível da trufa, pavilhões auriculares, cavidade bucal, lábios e pálpebras. Num menor o número de casos também foram descritas lesões ao nível dos membros, pescoço, região dorsolombar, tórax, abdômen e cauda (PINTO, 2013). As lesões cutâneas são, essencialmente, caracterizadas por úlceras e/ou nódulos hemorrágicos ou ulcerados principalmente localizados sobre o focinho. Alguns animais apresentam alopecias localizadas ou difusas e/ou crostas. Com menos frequência observam-se eritema, pápulas e pústulas. Sinais como descamação e seborreia também se encontram relatados (TRAINOR et al., 2010).

A forma nodular cutânea é a mais comumente observada em felinos. Os casos devem ser distinguidos dos nódulos causados em criptococose, esporotricose, histoplasmose, granuloma eosinofílico, micobacterioses, e uma grande variedade de neoplasmas cutâneos (sarcóides felinos, tumor de mastócitos, fibrossarcoma, basal carcinoma e linfoma). Os principais diferenciais das lesões ulcerativas incluem carcinoma de células escamosas, dermatite ulcerativa, úlcera indolente, dermatite por picada de insetos, micobacteriose atípica, lepra felina, vasculite cutânea e eritema

multiforme. Finalmente, doenças da pele como dermatofitoses, lúpus eritematoso, sistêmico ou cutâneo, complexo pêfigo, adenite sebácea (PENNISI et al, 2015).

Ainda não está claro se o quadro dermatológico é causado por uma ação da *leishmania* ou decorrente de coinfeções, como por exemplo, piodermites ou dermatofitoses, desencadeadas pela imunossupressão ocasionada pelo parasito. Outro problema a ser levantado é o fato do uso de determinados medicamentos, como antifúngicos, poder melhorar temporariamente lesões cutâneas causadas por *leishmanias*, uma vez que estes fármacos podem ter ação leishmanioestática. Deste modo, a suspeita clínica passa a ser de outras enfermidades, uma vez que o tratamento melhora os sintomas, o que dificulta o diagnóstico de leishmaniose visceral. Por esta razão, há que se pensar que o número de casos de leishmaniose felina pode estar sendo subestimado (SIMOES-MATTOS et al., 2004).

Estudos recentes realizados por Mendonça et al (2017), em 4% dos 83 gatos utilizados no estudo foi encontrado a presença do parasita, e destes, somente um apresentou sinais clínicos sugestivos de LV, fato confirmado por outros relatos que afirmam que uma grande proporção desses gatos são subclínicamente infectados. A presença de gatos infectados com *L. infantum* na cidade de Teresina, uma área endêmica para LV em cães e humanos, indica uma possível participação desses animais na cadeia epidemiológica de *L. infantum* em ambientes intra e peridomiciliares.

Os métodos de diagnóstico aplicáveis ao gato são os mesmos empregados para cães. A abordagem diagnóstica geral da leishmaniose em animais de companhia deve ser baseada no histórico de casos clínicos, achados laboratoriais específicos e resultados de testes diretos (análise parasitológica), indiretos (que avaliam a resposta imune do hospedeiro ao parasito) e moleculares (DANIEL et al, 2009).

Em face ao exposto, o presente estudo teve como principal objetivo identificar o potencial de transmissão, resposta inflamatória da pele e parasitismo de gatos com leishmaniose visceral domiciliados na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

- ❖ Identificar padrões histopatológicos da pele que caracterizem gatos domésticos com potencial para transmitir o parasita ao vetor.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- ❖ Pesquisar correlação entre os sintomas dermatológicos e a carga parasitária
- ❖ Pesquisar a correlação entre a carga parasitária e as regiões da pele mais propensas a picada do vetor em gatos domésticos infectados sintomáticos e assintomáticos
- ❖ Observar resposta inflamatória da pele de gatos domésticos infectados sintomáticos e assintomáticos
- ❖ Verificar a ocorrência de parasitismo na pele e relacionar com a infectividade do vetor e alterações histopatológicas

## 4 CAPÍTULO I

### **Potencial de transmissão, resposta inflamatória da pele e parasitismo de gatos com leishmaniose visceral**

[Potential of transmission, inflammatory response of the skin and parasitism of cats with visceral leishmaniosis]

#### **RESUMO**

Em estudos mais recentes Infecções por *Leishmania sp.* em gatos domésticos têm sido reportadas em vários países da bacia mediterrânea e no Brasil, onde essa parasitose é endêmica. Em áreas endêmicas de leishmaniose, os gatos, tal como os cães, são suscetíveis à infecção por *Leishmania sp.*, no entanto ainda pouco se conhece sobre o papel dessa espécie dentro da cadeia epidemiológica e como a doença evolui em felinos. O objetivo desse trabalho foi identificar o potencial de transmissão, resposta inflamatória da pele e parasitismo de gatos com leishmaniose visceral domiciliados na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Foram utilizados doze animais, seis para o grupo controle e seis positivos. Os animais positivos foram submetidos ao xenodiagnóstico e depois realizada sedação para análise citológica e histopatológica, retirando-se fragmentos de pele da face externa da orelha, região periocular, focinho, dorso e nódulos subcutâneos nos animais que apresentaram essa alteração. No xenodiagnóstico, apenas os animais um e dois não foram capazes de infectar o vetor, os outros animais infectaram 49,31%, 31,25%, 51,35% e 73,8% respectivamente. No imprint, 100% (6/6) das lâminas da orelha foram observadas formas amastigotas de *Leishmania sp.* sendo o fragmento de pele que apresentou maior número de leishmanias. No exame histopatológico 61% dos animais apresentaram dermatite histiocitária de moderada a discreta e não houve correlação significativa entre a intensidade de infiltrados inflamatórios e a carga parasitária e nem entre o número de insetos infectados e a intensidade de infiltrados inflamatórios. Tendo em conta os dados obtidos, verifica-se que é necessário alertar os médicos veterinários de que a leishmaniose felina é um diagnóstico diferencial em áreas endêmicas, principalmente em gatos apresentando sinais dermatológicos e que é essencial a aplicação de medidas profiláticas para salvaguardar a saúde animal e a saúde pública.

**Palavras-chave:** inflamação, parasitismo, pele, felino, leishmaniose

## **ABSTRACT**

In more recent studies *Leishmania* sp. in domestic cats have been reported in several countries in the Mediterranean basin and in Brazil, where this parasite is endemic. In endemic areas of leishmaniasis, cats, such as dogs, are susceptible to infection by *Leishmania* sp., Yet little is known about the role of this species within the epidemiological chain and how the disease evolves in felines. The objective of this work was to identify the transmission potential, inflammatory response of the skin and parasitism of cats with visceral leishmaniasis domiciled in the city of Teresina, Piauí, Brazil. Twelve animals were used, six for the control group and six positive. Positive animals were submitted to xenodiagnosis and then sedation was performed for cytological and histopathological analysis. Skin fragments were removed from the external face of the ear, periocular region, snout, dorsum and subcutaneous nodules in the animals that presented this alteration. In the xenodiagnosis, only one and two animals were not able to infect the vector, the other animals infected 49.31%, 31.25%, 51.35% and 73.8%, respectively. In the imprint, 100% (6/6) of the ear blades were observed amastigote forms of *Leishmania* sp. being the fragment of skin that presented greater number of leishmanias. In the histopathological examination, 61% of the animals presented moderate to discrete histiocytic dermatitis and there was no significant correlation between the intensity of inflammatory infiltrates and the parasite load nor between the number of infected insects and the intensity of inflammatory infiltrates. Taking into account the data obtained, it is necessary to warn veterinarians that feline leishmaniasis is a differential diagnosis in endemic areas, especially in cats with dermatological signs, and that it is essential to apply prophylactic measures to safeguard animal health and public health.

**Key words:** inflammation, parasitism, skin, feline, leishmaniasis

## INTRODUÇÃO

Em áreas endêmicas de leishmaniose, os gatos, tal como os cães, são suscetíveis à infecção por *Leishmania sp.* (PINTO, 2013). Em estudos mais recentes, infecções por *Leishmania sp.* em gatos domésticos têm sido reportadas em vários países da bacia mediterrânica e no Brasil, onde esta parasitose é endêmica (MAIA et al., 2010).

A investigação da história e a relação dos aspectos epidemiológicos são pontos importantes a serem considerados para a obtenção de um diagnóstico clínico correto porque, na prática, doenças da pele, que são responsáveis pela maioria dos casos na rotina clínica desses animais, podem ser confundidas com alguns dos sintomas encontrados na leishmaniose (MENDONÇA et al, 2017).

Dos casos relatados de leishmaniose felina, com manifestações cutâneas, as mais frequentes foram lesões ao nível da trufa, pavilhões auriculares, cavidade bucal, lábios e pálpebras (PINTO, 2013). Ainda não está claro se o quadro dermatológico é causado por uma ação da *leishmania* ou decorrente de coinfeccções, como por exemplo, piodermites ou dermatofitoses, desencadeadas pela imunossupressão ocasionada pelo parasito (SIMOES-MATTOS et al., 2004).

A pele é um dos principais mecanismos de defesa inicial dos animais contra agentes exógenos, recobrando toda a superfície do corpo dos animais formando uma barreira física. Entre os principais constituintes celulares da pele estão os queratinócitos, células dendríticas maduras e imaturas, monócitos/macrófagos, granulócitos, dentre outras (SIMPSON et al., 2011). Também fazem parte dessa composição os constituintes humorais as  $\beta$ -defensinas, proteínas do complemento, imunoglobulinas, citocinas, quimiocinas, radicais livres e prostaglandinas (BOS et al., 2009). Estes componentes celulares e humorais formam o sistema imune da pele (GERNER et al., 2015).

Em face ao exposto, o presente estudo teve como principal objetivo identificar o potencial de transmissão, resposta inflamatória da pele e parasitismo de gatos com leishmaniose visceral domiciliados na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.



## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sanidade Animal (LASAN) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Foram utilizados 12 gatos domésticos domiciliados na cidade de Teresina escolhidos através de estudo randomizado utilizando a relação de residências cadastradas no sistema da Eletrobrás/Piauí. As residências que não tiverem gatos foram substituídas pela residência localizada imediatamente a sua direita. A randomização foi realizada utilizando o programa estatístico BioEstat 5.3.

Os animais que fizeram parte do grupo controle apresentaram exame parasitológico e sorológico negativos, exames hematológicos e bioquímicos normais e sem sinais clínicos característicos da doença. O grupo dos animais positivos foi composto por animais que apresentaram presença de *Leishmania sp.* no exame parasitológico, com ou sem sinais clínicos característicos da doença.

O diagnóstico dos animais positivos foi feito mediante pesquisa direta do parasita realizando aspirado de medula óssea na crista do osso esterno e aspirado de linfonodo poplíteo. Antes do procedimento foi realizado tricotomia e assepsia com álcool 70% no local da coleta e bloqueio com cloridrato de lidocaína 2% e o procedimento executado após ausência total de sensibilidade local. As Amostras de linfonodo poplíteo e medula óssea foram distribuída em tubos contendo meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicolle) com 1mL de Schneider's suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL), soro fetal bovino 10%, urina humana 1%, em seguida incubados em estufa B.O.D. a 25°C. O cultivo foi examinado sob microscópio óptico, aumento de 40X, a cada 5 dias até o 20º dia, para observar as formas promastigotas do parasito. Do mesmo material, realizou-se esfregaço em lâmina e corado pelo Giemsa para visualizar formas amastigotas de *Leishmania sp.*

Três animais que fizeram parte do grupo positivo, fizeram parte também das pesquisas de Batista (2019) que compõe o mesmo grupo de estudos do presente trabalho, no qual foram extraídos material para análise molecular e identificação da espécie de. O DNA das formas promastigotas foi extraído usando o DNA Genômico do kit de tecido (NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel, Durën, Alemanha), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Para análise molecular e identificação de isolados, o gene ITS1 ribossomal específico de *Leishmania* foi amplificado utilizando os primers LITSR (5-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3) e L5 · 8S (5-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3). A mistura reacional de PCR continha 1,0 µl de solução de DNA, 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 nM de cada primer, 2,5 U de AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), 2,5 µL de 10 µL de [Tris-HCl 50 mM, (pH 8,3), KCl 50 mM] e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> em um volume final de 15 µl. Controles positivos com *L. infantum* (MHOM / 1973

/ BH46), *L. amazonensis* (IFLA / BR / 1968 / PH8) e *L. braziliensis* (MHOM / 1975 / M2903) foram utilizados. O DNA genômico foi usado em  $1 \cdot 0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . Todos os testes incluíram um controle negativo sem DNA. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a  $95^\circ \text{C}$  por 2 min, 32 ciclos a  $95^\circ \text{C}$  por 20 s,  $53^\circ \text{C}$  por 1 min,  $72^\circ \text{C}$  por 1 min e extensão final a  $72^\circ \text{C}$  por 6 min. Os fragmentos amplificados foram de cerca de 300–350 pares de bases (pb) foram analisados em 100 V em tampão (89 mM tris (pH 7,3), 89 mM de ácido bórico e 2 mM EDTA) em 5% de acrilamida / bis-acrilamida 39: 1 géis corados com nitrato de prata. Os produtos de PCR (5 a 10  $\mu\text{l}$ ) foram digeridos com a enzima endonuclease HaeIII, de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de restrição foram analisados a 100 V em solução [89 mM tris (pH 7,3), 89 mM de ácido bórico e 2 mM EDTA] em 5% de acrilamida / bis-acrilamida e comparados com as espécies de *Leishmania* usadas como controle.

O Hemograma foi realizado em contador automático (BC–2800 Vet Mindray) com kit ABX Vetpack e contagem diferencial de leucócitos em esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa. As quantificações bioquímicas séricas de uréia, creatinina, ALT/TGP, AST/TGO, albumina e proteína total, foram realizadas em aparelho semiautomático (Analisador Bioquímico BA 88 BIOCLIN) com o uso de kits da Labtest seguindo as recomendações descrita pelo fabricante.

O xenodiagnóstico foi realizado para avaliar a infectividade e o parasitismo dos animais positivos, para tanto, os animais foram sedados com associação de acepromazina a 0,2%, 0,5 mg/kg com cloridrato de cetamina 15mg/kg, ambos administrados via intramuscular. As fêmeas de *L. longipalpis* foram provenientes da colônia de flebotomíneos do Laboratório de Sanidade Animal (LASAN). Foram utilizadas em cada animal uma média de 45 fêmeas de primeira geração, após cinco dias de nascidas e desprovidas de qualquer fonte alimentar. Os insetos foram depositados em caixas de plástico escurecidas com aproximadamente cinco cm de diâmetro e seis cm de altura, com um lado aberto e coberto por tecido de organza, colocado sobre a pele interna da orelha do animal por um período de 50 minutos. Posteriormente, os insetos foram acondicionados na incubadora BOD com um algodão embebido em solução açucarada a 50%. Após o 5º dia do repasto sanguíneo, as fêmeas foram dissecadas em lâmina estéril para a pesquisa de promastigotas em objetiva de 40x.

Após realização do xenodiagnóstico, os gatos com leishmaniose foram anestesiados com tiopental de sódio 2,5% (0,5 mL/ kg) e em seguida, retirados fragmentos de pele da face externa da orelha, região periocular, focinho, dorso e regiões que apresentaram alguma lesão dermatológica, com lâmina de bisturi nº 24, e logo após a coleta, realizado imprint em lâmina de microscopia e suas impressões foram coradas com Giemsa, e as amostras de tecido fixados

em formol a 10% tamponado para o estudo histopatológico. Todos os animais foram submetidos a eutanásia após a coleta, seguindo as recomendações contidas nas normativas do CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais).

O critério utilizado para classificar a intensidade dos infiltrados inflamatórios nas amostras foram em discretos, moderados e intenso.

A avaliação da carga parasitária foi feita através da observação de formas amastigotas de *Leishmania sp.* nas lâminas de imprint feitas com fragmentos de pele utilizando objetiva de imersão do microscópio óptico, no qual estabeleceu-se 22 campos para contagem das formas amastigotas do parasita. Os campos foram analisados seguindo sequência horizontal e vertical de movimento da platina. A quantidade de formas amastigotas obtida na contagem para cada animal foi categorizada em baixa (0-2), média (3-24) e alta (acima de 25).

Foi realizada correlação de Spearman utilizando o programa GraphPad Prism , versão 5.0 (Trial), 2007, admitindo probabilidade de erro de 5% e  $p > 0,05$ .

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em reunião na presente data 08/02/2018, registrada no mesmo com o nº 437/18.

## RESULTADOS

A biologia molecular revelou a presença de fragmentos amplificados de 300 a 350 pb nas cepas isoladas dos três gatos infectados. Os parasitas causadores foram identificados como *L. infantum* usando ITS1 PCR e subsequente análise de RFLP.

Nos animais positivos do presente estudo, foram observados os seguintes sintomas: alopecia difusa, prurido intenso, nódulos subcutâneos, eritema generalizado, hiperqueratose e lignificação, rarefação pilosa na cabeça, piodermite e sarna notoédrica (Figura 2).

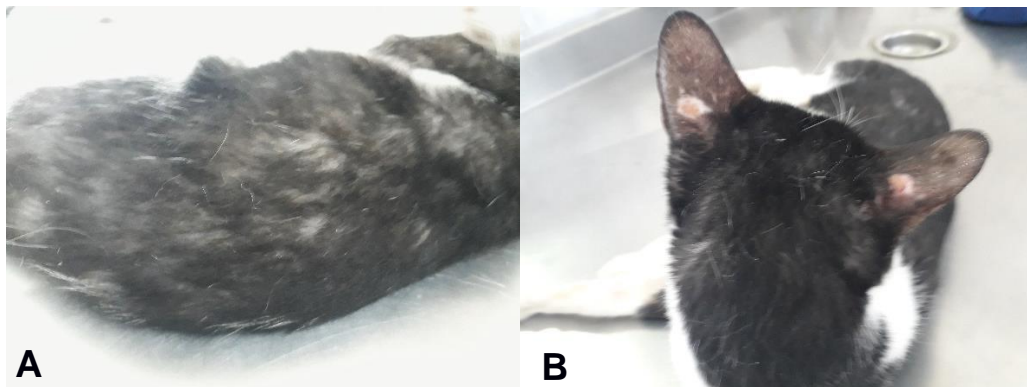




Figura 2 – Lesões cutâneas de gatos naturalmente acometidos por *Leishmania infantum* em gatos domiciliados na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. (A) alopecia difusa. (B) rarefação pilosa na cabeça. (C) hiperqueratose e lignificação. (D) nódulos subcutâneos endurecidos medindo aproximadamente 1 a 2cm de diâmetro.

A presença de piodermite e alopecia difusa estava presente em 100% (6/6) dos animais positivos e 66,7% (4/6) além de piodermite e alopecia difusa, apresentavam eritema generalizado. Em 50% (3/3) dos felinos foram observados sarna notoédrica (Figura 3A e 3B), rarefação pilosa na cabeça, hiperqueratose e lignificação, crostas melicéricas, prurido intenso, piodermite e alopecia difusa concomitantemente. Também foram observados em 33,3% (2/6) dos gatos, além dos sintomas relacionados acima, presença de nódulos subcutâneos endurecidos de 1 a 2cm de diâmetro e eritema generalizado (Tabela 2).

Tabela 2 – Sintomas dermatológicos observados em felinos naturalmente acometidos por Leishmaniose visceral, domiciliados na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

Lesões	Animal1	Animal2	Animal3	Animal4	Animal5	Animal6
Alopecia difusa	+	+	+	+	+	+
Prurido intenso	-	-	+	-	+	+
Crostas melicéricas	-	-	+	-	+	+
Nódulos subcutâneos	-	-	+	-	-	+
Eritema generalizado	-	-	+	+	+	+
Hiperqueratose e lignificação	-	-	+	-	+	+
Rarefação pilosa na cabeça	-	+	+	+	+	+

Piodermite	+	+	+	+	+	+
Sarna notoédrica	-	-	+	+	+	-

Nos fragmentos de pele analisados através da técnica de imprint dos gatos com leishmaniose, em 100% (6/6) das lâminas da orelha foram observadas formas amastigotas de *Leishmania infantum*, Em relação a avaliação da carga parasitária, o fragmento de pele que apresentou maior número de formas amastigotas de *Leishmania infantum*, foi a orelha (Figura 3A e 3B) no qual dois animais apresentaram carga parasitária média e um animal com alta carga parasitária, seguida da região periocular (Figura 3 C, D), (Figura 4) e focinho, onde dois animais apresentaram baixa carga parasitária e um apresentou alta. O dorso foi a região com menor carga parasitária, tendo apenas dois animais positivos, sendo um com baixa e outro com alta, conforme tabela 3, onde a carga parasitária está representada em baixa (+), média (++) e alta (+++).

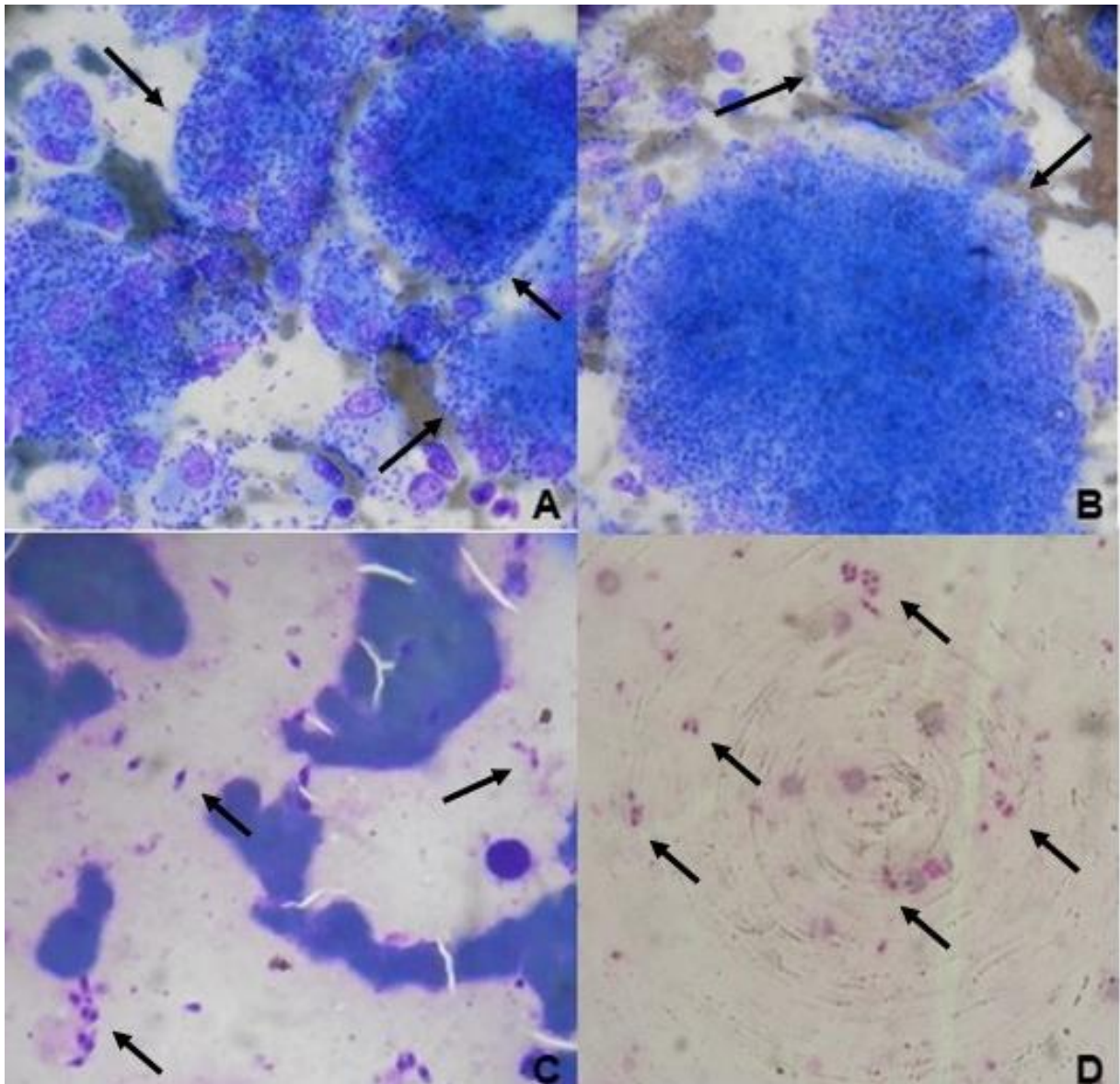


Figura 3 (A) e (B) – formas amastigotas de *Leishmania sp.* em fragmento de pele da orelha de gato um doméstico com leishmaniose apresentando alta carga parasitária, observada em microscopia óptica. (C) e (D) – formas amastigotas de *Leishmania sp.* em fragmento de pele da região periocular de um gato doméstico com leishmaniose apresentando média carga parasitária. Giemsa, aumento 1000x.

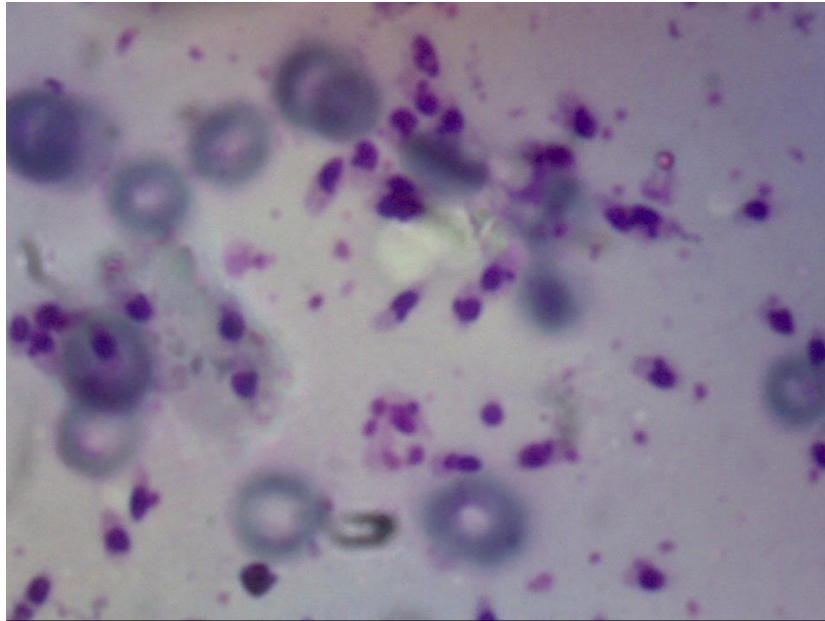


Figura 4: formas amastigotas de *Leishmania* sp. em fragmento de pele da região periocular de um gato com Leishmaniose. Giemsa, aumento de 16000x

Tabela 3 – Imprint realizada em fragmentos de pele extraídos de gatos domésticos acometidos por Leishmaniose visceral domiciliados na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

<b>Animais</b>	<b>Orelha</b>	<b>Região Periocular</b>	<b>Focinho</b>	<b>Dorso</b>
Animal 1	+	+	+	+
Animal 2	+	-	-	-
Animal 3	++	-	-	-
Animal 4	+	-	-	-
Animal 5	++	+	+	-
Animal 6	+++	+++	+++	++
(%) de animais infectados	100	50	50	33,3

No xenodiagnóstico realizado nos felinos com leishmaniose, apenas dois não foram capazes de infectar o vetor, conforme mostrado abaixo na tabela 4.

Tabela 4 – Xenodiagnóstico realizado em gatos domésticos acometidos por Leishmaniose visceral domiciliados na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

<b>Quantidade de insetos</b>	<b>Animal 1</b>	<b>Animal 2</b>	<b>Animal 3</b>	<b>Animal 4</b>	<b>Animal 5</b>	<b>Animal 6</b>
utilizados	40	34	74	40	38	43
Alimentados	40	33	73	32	37	42
infectados	0	0	36	10	19	31
(%)	0	0	49,31	31,25	51,35	73,8

Quanto as alterações histopatológicas, os fragmentos de pele coletados dos animais pertencentes ao grupo controle não apresentaram lesões significativas características da doença. As lesões observadas nos animais positivos para Leishmaniose visceral estão descritas (quadro 1).

Quadro 1 - Achados histopatológicos de lesões cutâneas de seis gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, domiciliados na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

<b>ANIMAL</b>	<b>FRAGMENTO</b>	<b>HISTOPATOLÓGICO</b>
1	Orelha, região periocular, focinho e dorso	Sem alterações (Figura 5A e 5B)
2	Orelha	Dermatite linfoplasmocitária multifocal discreta (Figura 6A)
	Dorso	Dermatite linfoplasmocitário discreto
	Focinho e região periocular	Sem alterações
3	Orelha	Dermatite histiocitária discreta com áreas multifocais com presença de formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> intersticial e no interior de macrófago
	Focinho	Dermatite histiocitária multifocal com presença de formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> livres e dentro de macrófagos (6B)
	Nódulo	Dermatite histiocitária multifocal moderada a intensa se aprofundando até a hipoderme com miríades de formas amastigotas de <i>Leishmania sp.</i> intersticial e dentro de macrófagos (Figura 7A e 7B)



3	Região periocular e dorso	Sem alterações
4	Região Periocular	Dermatite histiocitária discreta
	Focinho	Dermatite neutrofílica com presença de pequenas quantidades de formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> no interstício.
	Orelha e dorso	Sem alterações
5	Orelha	Dermatite histiocitária discreta (Figura 8A).
	Região periocular	Dermatite linfocítica multifocal discreta
	Focinho	Dermatite histiolinfocítica multifocal discreta
	Dorso	Dermatite linfocítica multifocal discreta
6	Orelha	Dermatite histiocitária intensa e difusa com miríades de amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> (Figura 8B)
	Região periocular	Dermatite histiocitária multifocal moderada com miríades de formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> intralesional .
	Focinho	Dermatite histiocitária multifocal moderada e miríades de formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> intralesionais, no interstício e dentro de macrófagos (Figura 8C e 8D)
	Dorso	Dermatite histiocitária multifocal discreta.
	Nódulos	Dermatite histiocitária intensa e difusa com presença de miríades de formas amastigotas de <i>Leishmania sp.</i> intralesionais (Figura 9A e 9B)

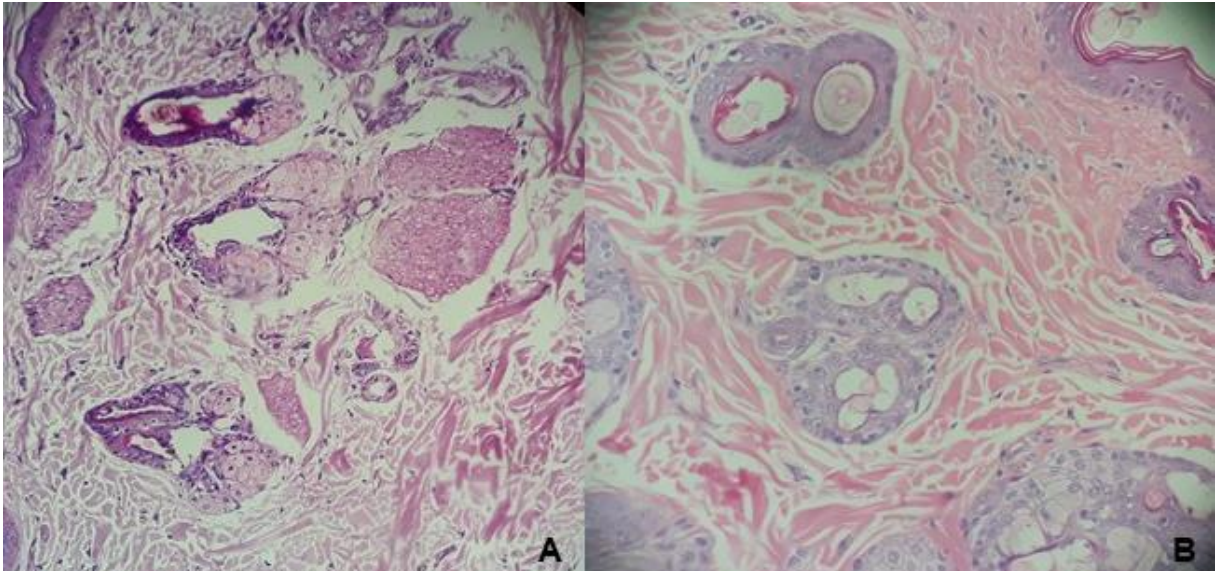


Figura 5 - dois fragmentos de pele retirados de dois gatos domésticos com leishmaniose: (A) - Fragmento de pele pilosa da orelha sem alterações. (B) - fragmento de pele do focinho sem alterações. HE, aumento 400x.

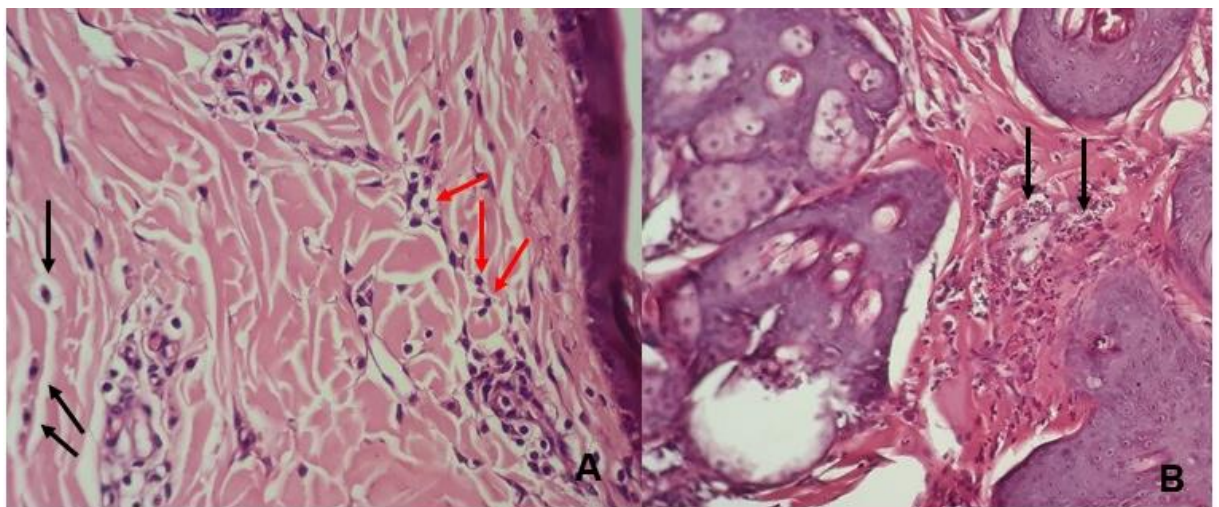


Figura 6 – dois fragmentos de pele retirados de dois gatos com leishmaniose: (A) – Dermatite linfoplasmocitária multifocal discreto de um fragmento de orelha. Visualização de plasmócito (setas pretas) e linfócitos (setas vermelhas). (B) – formas amastigotas de *Leishmania infantum* livres e dentro de macrófagos (setas) de um fragmento do focinho. HE, aumento 400x.

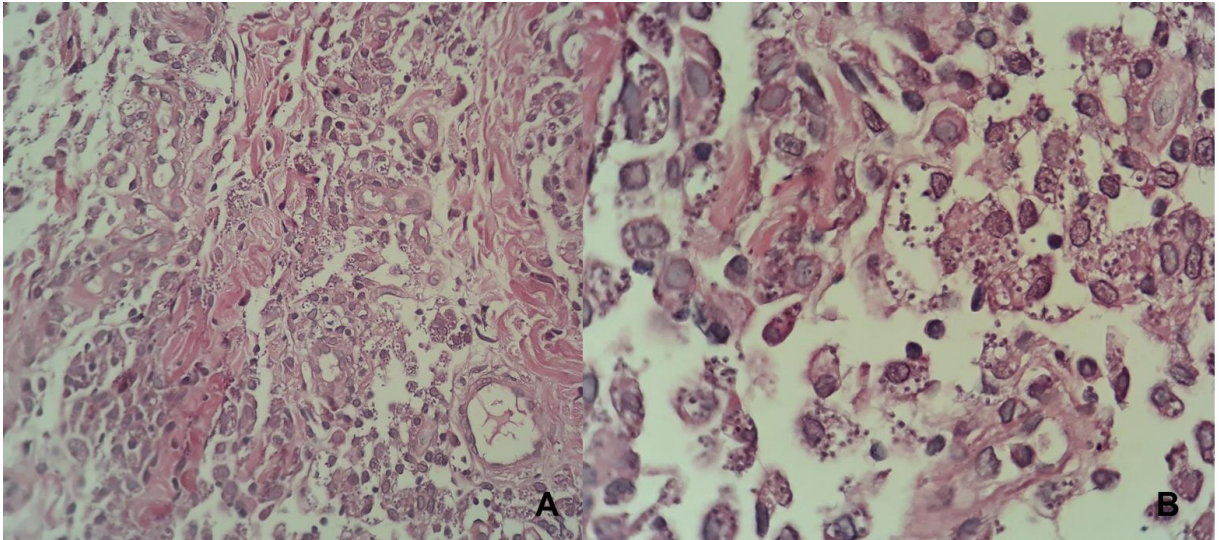


Figura 7: (A) e (B) – Dermatite histiocitária multifocal coalescente moderada a intensa com miríades de formas amastigotas de *Leishmania infantum* intralesional livres e dentro de macrófagos (setas) de um fragmento de pele de um nódulo em um gato com leishmaniose. HE, aumento 400X e 1000X respectivamente.

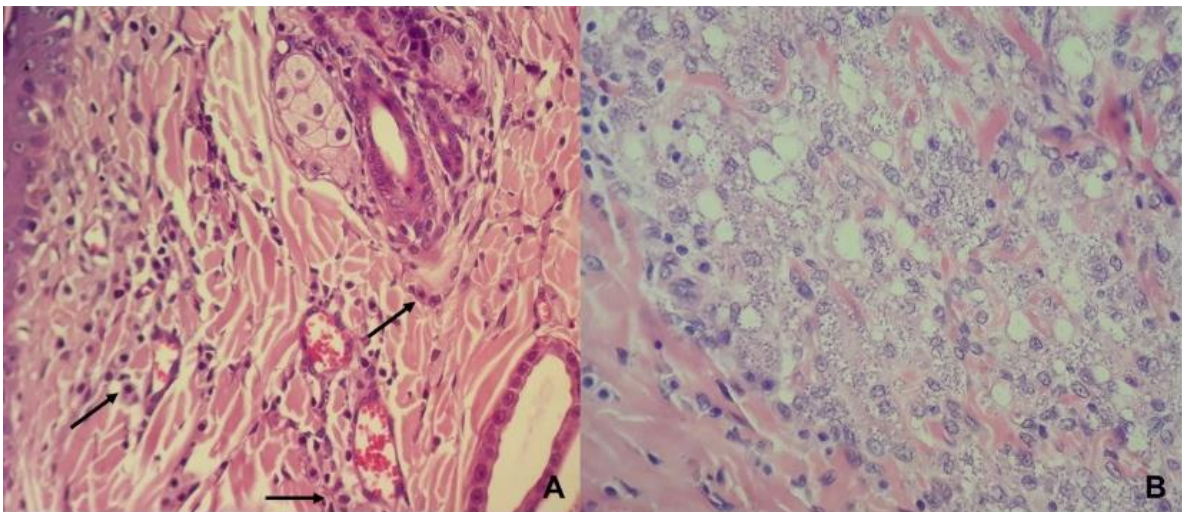


Figura 8 – fragmentos de pele da orelha de dois gatos com leishmaniose: (A) Dermatite histiocitária discreta. Na imagem observa-se a presença de macrófagos que caracterizando o tipo de infiltrado inflamatório (setas). HE, aumento 400x. (B) - Dermatite histiocitária intensa e difusa com miríades de amastigotas de *Leishmania infantum* (setas). HE, aumento de 400x.

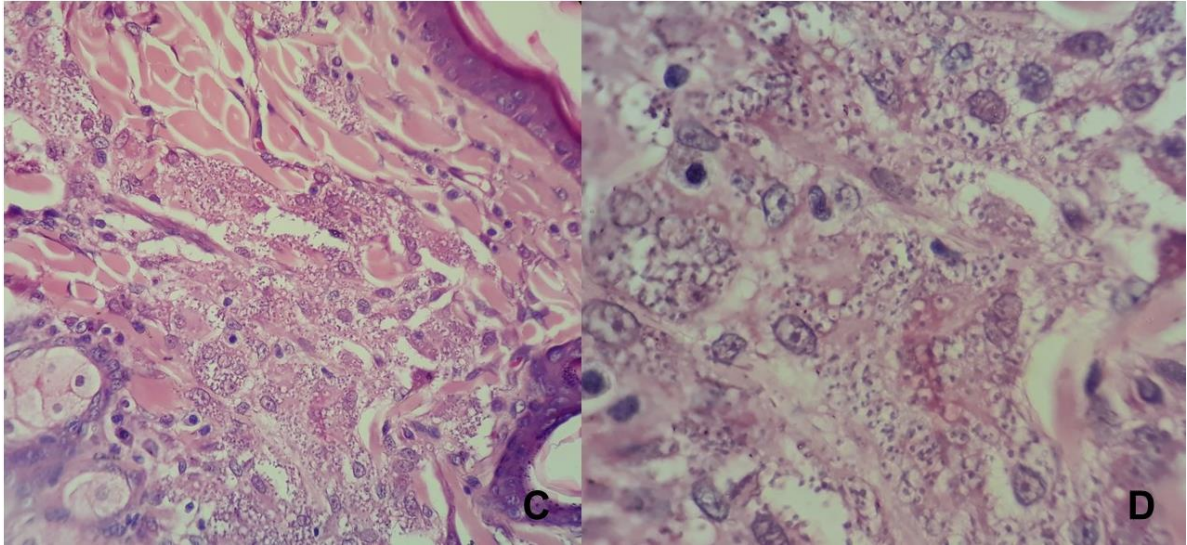


Figura 8 – fragmentos de pele de focinho de um gato com leishmaniose: (C) e (D) - Dermatite granulomatosa multifocal moderada e miríades de formas amastigotas de *Leishmania infantum* intralesionais, livres (setas pretas) e dentro de macrófagos (seta vermelha). HE, aumento de 400x e 1000x respectivamente.

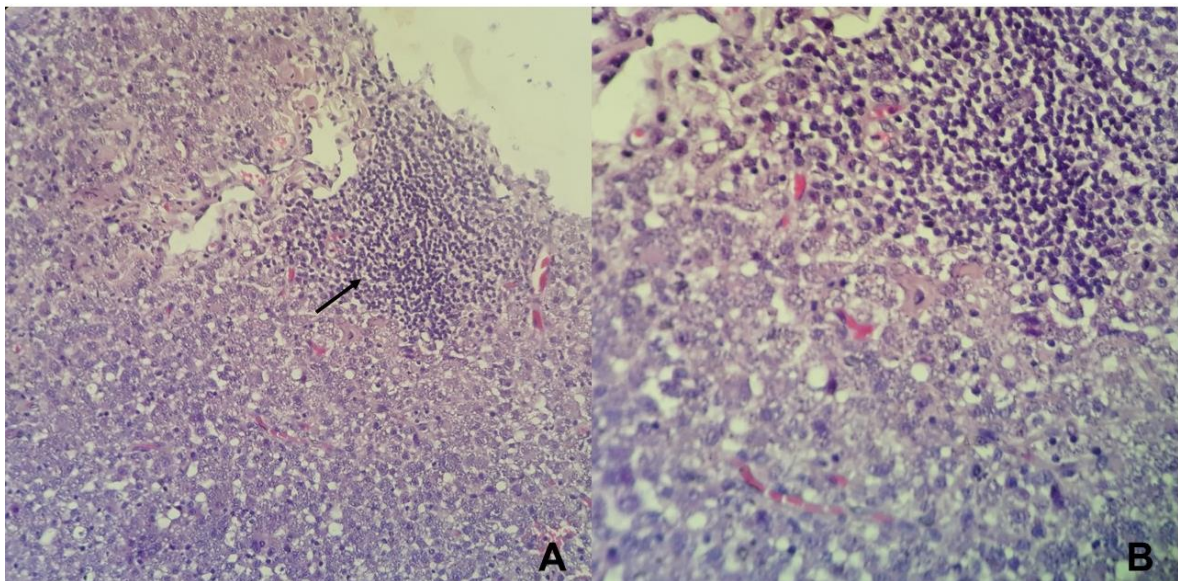


Figura 9 – fragmento de pele de um nódulo de um gato com leishmaniose: (A) e (B) Dermatite histiocitária intensa e difusa (seta preta) e presença de miríades de formas amastigotas de *Leishmania infantum* intralesionais. HE, aumento de 400x e 1000x respectivamente.

## DISCUSSÃO

Nos animais positivos do presente estudo, os sinais dermatológicos foram predominantes na sintomatologia clínica da doença, apresentando múltiplas e inespecíficas

manifestações, característicos de vários tipos de dermatopatias que podem acometer os gatos domésticos assim como nos cães, coincidindo com descrições em outros trabalhos como de Vides (2010) e Pinto (2013) que cita ocorrências de várias manifestações cutâneas, sendo as mais frequentes foram lesões ao nível da trufa, pavilhões auriculares, cavidade bucal, lábios e pálpebras. E em um menor o número de casos também foram descritas lesões ao nível dos membros, pescoço, região dorsolombar, tórax, abdómen e cauda. Trainor et al. (2010) cita que as lesões cutâneas são, essencialmente, caracterizadas por úlceras e/ou nódulos hemorrágicos ou ulcerados principalmente localizados sobre o focinho, e alguns animais apresentam alopecias localizadas ou difusas e/ou crostas. Com menos frequência observam-se eritema, pápulas e pústulas, descamação e seborreia. A presença desse grande número de sinais encontrados nos gatos domésticos que fizeram parte desse estudo, reforçam a idéia de que em áreas endêmicas, a leishmaniose visceral deve ser incluída como diagnóstico diferencial já que não existe sinais patognômicos da doença.

Quanto as infecções secundárias encontradas nos animais do presente trabalho, a prevalência foi de piodermite, sendo a mesma diagnosticada em todos os animais positivos e sarna notoédrica, observada em 50% dos felinos positivos, resultados semelhantes em gatos foram obtidos por Vides (2010) e por outros autores em estudos realizados em cães, (CAVALCANTI et al 2014; BASTOS, 2014), provavelmente devido a imunodeficiência causada pelo parasita.

Com o intuito de saber se a quantidade sinais dermatológicos serviriam de atrativo para o flebótomo e influenciar na capacidade do hospedeiro em infectar uma quantidade maior de insetos, foi realizado a correlação entre essa quantidade e o número de insetos infectados, no qual não houve correlação significativa, demonstrando que E, sendo portanto essa capacidade influenciada por outros fatores que ainda necessitam de estudos mais aprofundados para seu entendimento. Esse resultado vai em contraste com o relato em cães realizados por Nery et al. (2017), no qual foi observada correlação estatística com a infectividade, demonstrando que quanto menos sinais clínicos e anormalidades laboratoriais um cão apresenta, menor o risco dele transmitir o parasito para o vetor. No entanto, não há consenso na literatura sobre essa relação. Alguns autores já observaram que animais sem sinais clínicos não transmitem o parasito (TRAVI et al, 2001) enquanto outros argumentam que um cão infectado pode transmitir o protozoário independentemente de apresentar ou não sinais clínicos (MICHALSKY et al, 2007).

Os animais três, cinco e seis que apresentaram mais de cinco sinais dermatológicos (SD), foram capazes de infectar maior quantidade de insetos, com 49,31%, 51,35% e 73,8%

dos flebótomos infectados respectivamente. Seguidos do animal quatro, no qual foram observados quatro SD, foi capaz de infectar 31,25% dos insetos alimentados. E os animais um e dois, com dois SD e três SD respectivamente, não infectaram nenhum flebótomo. Não houve correlação significativa entre a quantidade de sinais dermatológicos e o número de insetos infectados.

A correlação entre a carga parasitária nos fragmentos de pele e o número de insetos infectados só foi significativa na orelha, apresentando  $p=0,0167$ .

Não houve correlação significativa entre a intensidade dos infiltrados e a quantidade de insetos infectados, tendo em vista que mesmo nos animais onde o número de insetos infectados foi alto como nos animais três e cinco, a intensidade de infiltrados inflamatórios foi discreto, semelhantes ao resultado do animal dois que não infectou nenhum inseto. Somente no animal seis foi observado presença de dermatite inflamatória intensa.

Nos fragmentos de pele onde a carga parasitária apresentou-se alta, foi possível observar a intensidade de infiltrados inflamatórios de moderado a intenso, e nos animais onde a carga apresentou-se de baixa a média, essa intensidade variou de moderado a leve, porém não apresentando correlação significativa entre a intensidade de infiltrados inflamatórios e a carga parasitária.

A *Leishmania infantum* induziu resposta inflamatória na pele com distribuição e intensidades variáveis, e embora se reconheça que a dermatite é um sintoma comum de se encontrar na leishmaniose visceral canina, a proporção de inflamação da pele em gatos em áreas endêmicas que poderia ser atribuído à presença de *Leishmania* ainda é desconhecido. No entanto, as características de uma doença crônica e a inflamação são profundamente influenciadas pelo hospedeiro e pela resposta imunológica ao agente desencadeante (PONTES DE CARVALHO, et al. 2002).

As células inflamatórias predominantes nos fragmentos analisados foram macrófago, neutrófilo, linfócito e em menor número plasmócito que foi visualizado apenas no animal de número dois, Em cães, a presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos é, de acordo com Larangeira (2008), um achado comum na leishmaniose visceral canina. Em um estudo feito por Lemos et al. (2000) com humanos infectados pela *L. amazonensis*, o infiltrado inflamatório em lesões de pessoas resistentes a doença, foram constituídos por uma mistura de linfócitos, plasmócitos e macrófagos epitelióides com formação de granuloma e poucos parasitas. Por outro lado, em indivíduos suscetíveis, o infiltrado inflamatório foi composto quase exclusivamente de macrófagos não ativados contendo grandes células citoplasmáticas e vacúolos sobrecarregados com parasitas.

O infiltrado inflamatório do tipo histiocitário foi predominante, presente em 66,7% (4/6) dos animais positivos, sendo o fragmento de pele da orelha, o que apresentou maior presença desse tipo de infiltrado. Tais resultados corroboram com estudo feito por Navarro et al. (2010). Estudos realizados por Mattia et al. (2018), utilizando sete gatos com dermatite ulcerativa, submetidos a biópsia de pele para estudo histopatológico, imuno-histoquímica e qPCR, no qual a presença de histiócitos foi confirmada em 23 dos 27 casos e as técnicas de imunohistoquímica e qPCR confirmaram a ausência de *Leishmania* em todos os casos, concluindo que a infiltração histiocitária do tecido não é um marcador específico para a infecção por *Leishmania sp.* nesta população, não coincidindo com o presente trabalho, no qual não foi observado histiócitos em 66,7% dos animais com presença de *Leishmania infantum*, sendo que a quantidade de infiltrados foi diretamente proporcional à carga parasitária, sugerindo que os mesmos sejam um marcador específico para *Leishmania*.

Os infiltrados inflamatórios do tipo linfoplasmocitários ou linfoplasmocíticos e linfocíticos, foram observados nos animais dois e cinco respectivamente. Esses padrões são incomuns e caracterizados pelo predomínio de linfócitos maduros e, por vezes, menor quantidade de plasmócitos em amostras de tecidos não linfoides. Geralmente estão relacionados a reações de hipersensibilidade do tipo IV como aquelas relacionadas a picadas de ectoparasitos e administração de vacinas (GRANDI et al., 2014).

Os fragmentos de pele da região periocular e dorso, foram os fragmentos de pele com menor presença de infiltrados inflamatórios, provavelmente por serem regiões menos propensas a auto traumatismos e conseqüente acúmulo de células inflamatórias como acontece na orelha.

A correlação entre a carga parasitária nos fragmentos de pele e o número de insetos infectados só foi significativa na orelha. Um dos tecidos mais amplamente utilizados para diagnóstico na LVC é a pele da orelha, visto que a detecção direta do parasito, em biopsias de pele, pode ser obtida através de um procedimento cirúrgico extremamente simples (TAFURI et al., 2004).

Estudos realizados por Xavier et al. (2006) demonstraram que amostras de pele da orelha, espelho nasal e abdômen são potencialmente utilizadas para diagnóstico da LVC independente do estado clínico do cão. Porém, esses autores relatam um maior parasitismo na pele de orelha quando comparado aos outros locais. Travi et al. (2001) observaram que a pele de orelha tende a ser mais infectiva à flebotomíneos em relação a pele do abdômen.

Ao avaliarem duas distintas regiões anatômicas da pele de orelha, Moura et al. (2008) observaram maior parasitismo na extremidade quando comparado ao terço inferior desse órgão. A susceptibilidade da pele de orelha parece ser devido ao fato desse local ser bastante

vulnerável a auto traumatismos, estimulando o prurido e dessa forma o acúmulo de células inflamatórias nesse local, contribuindo para a manutenção do parasitismo (TAFURI et al., 2004).

Nos animais positivos utilizados nesse trabalho, não foi observado correlação significativa entre a intensidade dos infiltrados inflamatórios e a quantidade de insetos infectados, demonstrando que esse fator não é determinante para infecção do vetor.

Nos fragmentos de pele onde a carga parasitária apresentou-se alta, foi possível observar a intensidade de infiltrados inflamatórios de moderado a intenso, e nos animais onde a carga apresentou-se de baixa a média, essa intensidade variou de moderado a leve, porém não apresentando correlação significativa entre a intensidade de infiltrados inflamatórios e a carga parasitária, indo em desacordo com estudos realizados em cães por Moura et al. 2008 e Verçosa et al. (2008).

## CONCLUSÃO

Concluimos no presente estudo, que os gatos domésticos são capazes de infectar o vetor independentemente da quantidade de sinais dermatológicos e da carga parasitária, sendo portanto potenciais transmissores, porém as alterações inflamatórias encontradas são inespecíficas, variando quanto aos tipos de infiltrado inflamatório e a intensidade e não demonstrando relação significativa com a quantidade de carga parasitária presentes na pele do animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOS, P.M. **Comparações macroscópicas e histopatológicas de lesões cutâneas em cães com leishmaniose visceral**. 2014. Monografia – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- BOS, J. D.; LUITEN, R. M. Skin immune system. **Cancer Treat Res.**, v. 146, p. 45-62, 2009.
- CAVALCANTI, M.P.; FAUSTINO, M.A.G; ALVES, L.C.; BORBA, M.A.C.; SILVIA, L.B.G.; MOTA, R.A. Infecções micóticas e bacterianas em lesões cutâneas de cães parasitologicamente positivos para *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.11, n.3, p. 160-162, 2014.
- GERNER, M. Y.; TORABI-PARIZI, P.; GERMAIN, R. N. Strategically localized dendritic cells promote rapid T cell responses to lymph-borne particulate antigens. **Immunity**, v. 42, n. 1, p. 172-85, 2015.
- GRANDI, F.; BESERRA, H.E.O.; COSTA, L.D. (2014). **Citopatologia veterinária diagnóstica**. Ed. MedVet, 1ª edição, p.30, São Paulo, Brasil.



- LARANGEIRA, D.F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor**. São Paulo, 2008. 79f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2008.
- LEMO, S.V.; ASCENCAO, S.J.; CORREIA, S.T.M., SAMPAIO, T.V. P.; RODRIGUES F.L.A. (2000) Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses. **CBA mice. Microbes Infect.**, n.2, p.1807–1815, 2000.
- MATTIA, D.D.; FONDEVILA, D.; ABRAMO, F.; FONDATI, A. A retrospective histopathological, immunohistochemical and molecular study of the presence of *Leishmania* spp. in the skin of cats with head and neck ulcerative dermatitis. **Vet. Dermatol.**, v.29, p.212-e76, 2018.
- MAIA, C.; NUNES, M.; CRISTÓVÃO, J.; CAMPINO, L. Experimental canine Leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. **Acta Trópica**, v.116, p.193- 199, 2010.
- MENDONÇA, I.L.; BATISTA, J.F.; RIBEIRO, I.M.M.; ROCHA, F.S.B.; SILVA, S.O.; MELO, M.N. *Leishmania infantum* in domestic cats from the municipality of Teresina, state of Piauí, Brazil. **Parasitology Open**, v.3, e1, p.1, 2017.
- MICHALSKY E.M., ROCHA M.F., DA ROCHA LIMA A.C.V.M., FRANÇA-SILVA J.C., PIRES M.Q., OLIVEIRA F.S., PACHECO R.S., DOS SANTOS S.L., BARATA R.A. & ROMANHA A.J. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Vet. Parasitol.** n.147, p.67-76, 2007.
- MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; SAMPAIO, W. M.; LIMA, W. G.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L.; MICHALICK, M. S. M. Histopathological and parasitological analysis of skin tissues biopsies from two distinct anatomical areas of the ears of dogs. **Brasiliian Journal of Veterinary Pathology**, v. 1, p. 10-15, 2008.
- NAVARRO, J.A.; SÁNCHEZ, J.; PENAFIEL-VERDÚ, C.; BUENDÍA, A.J.; ALTIMIRA, J.; VILAFRANCA, M. Histopathological Lesions in 15 Cats with Leishmaniasis. **J. Comp. Path.**, v.143, p.297e302, 2010.
- NERY, G.; BECERRA, D.R.D.; BORJA, L.S.; MAGALHÃES-JÚNIOR, J.T.; SOUZA, B.M.P.S.; FRANKE, C.R.; VERAS, P.S.T.; LARANGEIRA, D.F.; BARROUIN-MELO, S.M. Avaliação infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. **Pesq. Vet. Bras.**, v.37, n.7, 2017.
- PINTO, P.M.F. **Prevalência da infecção por *Leishmania* sp. em gatos residentes no Concelho de Cascais**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.
- PONTES-DE-CARVALHO L, SANTANA CC, SOARES MB, OLIVEIRA GG, CUNHANE TO E, RIBEIRO-DOS-SANTOS R. Experimental chronic Chagas\_ disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. **J. Autoimmun.**, n.18, p.131–138, 2002.
- SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; POMPEU, M.M.L. Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, p.79-87, 2004.
- SIMPSON, C. L.; PATEL, D. M.; GREEN, K. J. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. **Nat.Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 12, p. 565-580, 2011.
- TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M.; GONCALVES, R.; DE MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immunol. Methods**, v.292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

TRAINOR, K. E.; PORTER, B. F.; LOGAN, K. S.; HOFFMAN, R. J.; SNOWDEN, K. F. Eight Cases of Feline Cutaneous Leishmaniasis in Texas. **Veterinary Pathology**, v.47, n.6, p.1076-1081, 2010.

TRAVI B.L., TABARES C.J., CADENA H., FERRO C. & OSORIO Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** N.64, p.119-124, 2001.

VIDES, J.P. **Infecção por Leishmania chagasi em gatos com dermatopatias provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral.** 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

XAVIER, S. C.; DE ANDRADE, H. M.; MONTE, S. J.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC. Vet. Res.**, v. 2, p. 1-17, 2006.

VERÇOSA, B. L. A.; LEMOS, C. M.; SILVA, S. M. S. S.; DE CARVALHO, S. M.; GOTO, H.; COSTA, F. A. L. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 45, 2008.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento da relação parasito-hospedeiro na leishmaniose felina é de suma importância para entendimento do papel dessa espécie dentro do ciclo epidemiológico da doença e as alterações causadas pelo parasito, tendo em vista que pouco sabemos sobre o comportamento da Leishmania sp. em gatos domésticos e a capacidade de resposta imunológica ao parasita, bem como os fatores que influenciam essa resposta e os sinais clínicos manifestados.

Sugere-se mais estudos sobre a resposta inflamatória na pele dos felinos domésticos, levando em consideração que a pele é o primeiro ponto de contato do parasito com o hospedeiro e que esse último apresenta sinais dermatológicos inespecíficos, semelhantes aos apresentados em outras patologias, em áreas endêmicas, a leishmaniose deve ser incluída como diagnóstico diferencial nessa espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO

- AGA, E., KATSCHINKI, D. M., VAN ZANDBERGEN, G., LAUFS, H., HANSEN, B., MULLER, K., SOLBACH, W., LASKAY, T., Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*, **Journal of Immunology**, vol. 169, p. 898-905, 2002.
- ALVES, G. B. B.; PINHO, F. A.; SILVA, S. M. M. S.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, F. A. L. Alterações cardíacas e pulmonares em cães sintomáticos e assintomáticos infectados naturalmente com *Leishmania (leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n.3, p. 310-315, 2010.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-81, 2000.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In GREENE: **Infectious diseases**. Canadá: Ed. Elsevier, 2008, p. 685-698.
- BEHM, B.; BABILAS, P.; LANDTHALER, M.; SCHREML, S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 26, p. 812-820, 2012.
- BOGDAN C., ROLLINGHOFF, M., The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion, **International Journal of Parasitology**, vol. 28, p. 121-134, 1998.
- BOS, J. D.; LUITEN, R. M. Skin immune system. **Cancer Treat Res.**, v. 146, p. 45-62, 2009.
- BOURDOISEAU, G. Leishmaniose féline :actualités. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v.46, n.1, p.23-6, 2011.
- BRANDONISIO, O.; SPINELLI, R.; PEPE, M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. **Microbes Infect.**, v. 6, n. 15, p. 1402-9, 2004.
- BRASIL. Ministério da saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. In: **Ministério da Saúde**, M.S., (Ed.). Brasília, pp. 122, 2006.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Guia de vigilância epidemiológica. 7 ° ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, p. 813, 2009.
- BRESCIANI, K.D.S., SERRANO, A.C.M., DE MATOS, L.V.S., SAVANI, E.S.M.M., D'AURIA, S.R.N., PERRI, S.H.V., BONELLO, F.L., COELHO, W.M.D., AOKI, C.G., COSTA, A.J. Occurrence of *Leishmania* spp. in domestic cats from Araçatuba, SP. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 19, 127–129, 2010.
- CALABRESE, K.S.; CORTADA, V.M.C.L.; DORVAL, M.E.C.; LIMA, M.A.A.; OSHIRO, E. T.; SOUZA, C.S.F.; SIVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L. O.P.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; ABREU-SILVA, A. L. *Leishmania* (*Leishmania*)

Infantum/Chagasi: Histopathological Aspects Of The Skin In Naturally Infected Dogs In Two Endemic Areas. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 253-257, 2010.

CHATZIS, M.K., ANDREADOU, M., LEONTIDES, L., KASABALIS, D., MYLONAKIS, M., KOUTINAS, A.F., RALLIS, T., IKONOMOPOULOS, J., SARIDOMICHELAKIS, M.N. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Vet. Parasitol.** n.202, p.217–225, 2014.

CIARAMELLA P.; OLIVA G.; DE LUNA R. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v.22, p.539–543, 1997.

COELHO, W.M., RICHINI-PEREIRA, V.B., LANGONI, H., BRESCIANI, K.D. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol.**, v.176, v.(2-3), p.281-2, 2011.

COSTA, T.A.C. **Utilização da técnica de ELISA com proteína A e anti-IgG para o diagnóstico sorológico da leishmaniose felina**, 2008. 57f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba e Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

DANIEL CURVELLO DE MENDONÇA M, NEY LUIS P, PAULA CRISTINA B, DEBORA CRISTINA O, EDUARDO DE BASTOS SANTOS J, ANTÔNIO CEZAR OLIVEIRA G. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. **Ciência Rural**. 2009.

DANTAS-TORRES F, SOLANO-GALLEGO L, BANETH G, RIBEIRO VM, DE PAIVA-CAVALCANTI M, OTRANTO D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v.28, n.12, p.531-8, 2012.

DESJARDINS, M., DESCOTEAUX, A., Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 185, p. 2061-2068, 1997.

FARIA, T. C. P. **Estudo sero-epidemiológico da infecção por *Leishmania infantum* em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária , Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 5, n.28, p.36-44, 2000.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.214-21, 2006.

FREIRE, M. O.; VAN-DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000, v. 63, p. 149-164, 2013.

GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B.

Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 121, n. 1, p. 23-33, 2007.

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

GRAMICCIA M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*. v.181, n.1, p.23-30, 2011.

GREENE, C.E. (2006); **Infectious diseases of dog and cat**; Saunders Elsevier, 3ª edição; pp. 685-697; Georgia, USA.

GUEIRARD, P., LAPLANTE, A., RONDEAU, C., MILON, G., DESJARDINS, M., Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages, **Cell Microbiology**, vol. 10, p. 100-111, 2008.

HERVÁS, J.; AREVALO, J.; CHACON-MANRIQUE, L.F.; RIPOLL, G.; FERNANDEZ, J.; BOISO, A.; VILLAMANDOS, J. (2002); Evaluation of Local Immunoresponse in feline leishmaniasis; In **Proceedings of the 27 WSAVA Congress**; Granada, Espanha.

IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n. 71, p.34-42, 2007.

KILLICK-KENDRICK R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinical Dermatology** 1999; 17:279-289.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v.47, n.260, p.583–621, 1952.

LEMONS, S.V.; ASCENCAO, S.J.; CORREIA, S.T.M., SAMPAIO, T.V. P.; RODRIGUES F.L.A. (2000) Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses. **CBA mice. Microbes Infect.**, n.2, p.1807–1815, 2000.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; CHICHARRO, C.; SOLANO-GALLEGO, L. Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. **Parasit Vectors.**, v. 7, n. 120, p. 1-11, 2014.

LONGONI SS, LÓPEZ-CESPEDES A, SÁNCHEZ-MORENO M , BOLIO-GONZALEZ ME, SAURI-ARCEO CH, RODRÍGUEZ-VIVAS RL ,et al... Detection of different *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan

Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v.35, n.5, p.469-76, 2012

MACHADO, J.G.; HOFFMANN, J.L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, n.12, p.50-58, 2007.

MAIA, C.; CAMPINO, L. (2008); Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection; **Veterinary Parasitology** , n.158, 274–287, 2008

MAIA C, RAMADA J, CRISTOVAO JM, GONCALVES L, CAMPINO L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Vet J.**, v.179, n.1, p.142-4, 2009.

MAIA, C., CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends Parasitol.** n.27, p.341–344, 2011.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.D.; SENA, J.M.D.; LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública.** n.24, p.2941-7, 2008.

MANCIANTI, F., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., PIERI, S., Studies on canine leishmaniasis control I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonil treatment, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 82, p. 566–567, 1988.

MANCIANTI, F. Leishmaniosi felina: quale ruolo epidemiologico? **Parassitologia**, v.46, p.203204, 2004.

MAROLI, M.; PENNISI, M.G.; MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.357-360, 2007.

MELLO, G.B. Verificação da infecção natural do gato (*Felis Domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Brasil Médico**, v.54, p.180, 1940.

MELO F. A. **Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados.** 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

METZDORF, I.P.; DA COSTA LIMA JUNIOR, M.S.; FATIMA C.M.M.; SOUZA FILHO; A.F., SOUZA, T.R.A.; FRANCO, K.G, et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropica.** n.166, p.121-5, 2017.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D.; MELO, A.L., LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**, 11th ed. São Paulo: Atheneu: 2005. p. 56-72.

MOORE, K. J., MATLASHEWSKI, G., Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis, **Journal of Immunology**, vol. 152, p. 2930-2937, 1994.

MULLER, K., VAN ZANDBERGEN, G., HANSEN, B., LAUFS, H., JAHNKE, N., SOLBACH, W., LASKAY, T., Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice, **Medical microbiology and immunology**, vol. 190, p. 73-76, 2001.

NAVARRO, J.A.; SÁNCHEZ, J.; PENAFIEL-VERDÚ, C.; BUENDÍA, A.J.; ALTIMIRA, J.; VILAFRANCA, M. Histopathological Lesions in 15 Cats with Leishmaniosis. **J. Comp. Path.**, v.143, p.297e302, 2010.

NESTLE, F. O.; MEGLIO, P. D.; QIN, J.; NICKOLOFF, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol.**, v. 9, n. 10, p. 679–691, 2009.

NEVES, B. M.; SILVESTRE, R.; RESENDE, M.; OUAISSI, A.; CUNHA, J.; TAVARES, J.; LOUREIRO, I.; SANTARÉM, N.; SILVA, A. M.; LOPES, M. C.; CRUZ, M. T.; SILVA, A. C. Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Impairment of Nuclear Factor- $\kappa$ B. Molecular Mechanisms Behind the Arrested Maturation/Activation State of *Leishmania infantum*-Infected Dendritic Cells. **Am J Pathol.**, v. 177, n. 6, p. 2898–2911, 2010.

NOÉ, P. **Infecção por *Leishmania sp.* em gatos (*Felis domesticus*) na cidade de Campo Grande/MS, Brasil.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2008.

NOÉ, P.; BABO-TERRA, V.J. Leishmaniose felina - revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, p. 56-8, 2016.

Organização Mundial de Saúde (2010); Thecnical Report Series Controlo of the Leishmaniasis; **Organização Mundial de Saúde**, pp. 1-202.

Organização Pan-Americana da Saúde: **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018  
Disponível em: [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis)

PENNISI, M.G.; MAXI, I.; VITALE, F.; MASUCCI, M.; BORRUTO, G.; CARACAPPA, S. Studio dell'infezione de *Leishmania* mediante PCR in gatti che vivono in zona endemica. **Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie**, v. 54, p. 215-216, 2000.

PENNISI, M.G.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; OLIVA, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishvet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasite & Vectors**, v.8, p.302, 2015.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Vet Res.**, v. 35, n. 2, p. 163-87, 2004.

PICCININI, A. M.; MIDWOOD, K. S. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators Inflamm*, v. 2010, p. 1-21 2010.

PIRAJÁ, G.V.; SILVIA, D.T.; PERUCA, L.C.B.; ALVES, M.F.; PAIXÃO, M.S.; LUCHEIS, S.B.; SANTOS, W.J.; GUIRALDI, L.M. Leishmaniose felina: Revisão de Literatura. **Vet. e Zootec.**, v.20, n.2, p.203-216, 2013.

REIS, A. B.; CARVALHO, A. T.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 102–116, 2006.

REY, L. **O complexo “*Leishmania donovani*” e a leishmaniose visceral**; Parasitologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.253-66, 2001.

ROSA, N. J. G. C. **Rastreo de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da área metropolitana de Lisboa**. (2009). Dissertação de Mestrado; Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

SACKS, D., SHER, A., Evasion of innate immunity by parasitic protozoa, **Nature immunology**, vol. 3, p. 1041-1047, 2002.

SALZO, P.S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. **Nosso clínico**, São Paulo, ano 11, n.63, p.30-34, 2008.

SCOTT, D.W.; WILLIAM, H.M.; GRIFFIN, G.E. Viral, rickettial and protozoal skin disease. In \_\_\_\_ **Small animal dermatology**. 6 ed. Philadelphia. Saunders, 2001. p.517-542.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, v. 16, p. 581–592, 2016.

SILVA, D.T. et al. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.23, n.2, p. 179-186, 2014.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.**, v. 165, n. 1-2. P. 1-18, 2009.

SOUZA, A.I., NUNES, V.L.B., BORRALHO, V.M., ISHIKAWA, E.A.Y. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, MS, State, Brazil: a case report. *J. Vem. Anim.* **Toxins Trop. Dis.** n.15, p.359–365, 2009.



VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annu Rev Immunol.**, v. 27, p. 693-733, 2009.

VAN ZANDBERGEN, G., HERMANN, N., LAUFS, H., SOLBACH, W., LASKAY, T., *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes, **Infection and Immunity**, vol. 70, p. 4177-4184, 2002.

## ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Potencial de transmissão, resposta inflamatória da pele e parasitismo de gatos com leishmaniose visceral**", registrada nº 437/18, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. IVETE LOPES DE MENDONÇA do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **08/02/2018**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Março/2018 à Fevereiro/2019
Espécie/Linhagem/raça	Gatos/variadas
Nº de Animais	45
Peso/ Idade	Variado/ 1 a 12 anos
Sexo	Machos ou Fêmeas
Origem	Gatos domésticos domiciliados na cidade de Teresina, escolhidos através de estudo randomizado utilizando a relação de residências cadastradas no sistema da Eletrobrás/Piauí.

Teresina, 08 de Fevereiro de 2018.

*Waldilenny Ribeiro de Araújo Moura*

Profa. Dra. Waldilenny Ribeiro de Araújo Moura  
Coordenador em Exercício da CEUA/UFPI



*MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - CCA**

**LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL – LASAN**

Campus da Socopo - 64.049-550 Teresina, Piauí - Fone: 3215-5756.

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu, \_\_\_\_\_ brasileiro(a), portador(a) da carteira de identidade N° \_\_\_\_\_ SSP/PI, CPF N° \_\_\_\_\_, com domicílio na (rua, avenida,) \_\_\_\_\_ n° \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_, Teresina-PI; recebi explicações acerca dos procedimentos realizados no animal de minha propriedade. Nome: \_\_\_\_\_ da raça: \_\_\_\_\_, sexo M ( ) F ( ), idade \_\_\_\_\_, autorizo que participe do projeto **“ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM GATOS DOMÉSTICOS E A PARTICIPAÇÃO NO CICLO DE TRANSMISSÃO”** a ser desenvolvido pela Universidade Federal do Piauí – UFPI, sob coordenação da Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça. Trata-se de uma pesquisa cujo objetivo principal é analisar a possível participação dos gatos transmissão do “calazar”. O Termo de Consentimento estende-se à coleta de material biológico: sangue, medula óssea, linfonodo poplíteo e raspado de pele. Nos animais infectados: realização de xenodiagnóstico e coleta de fragmento de pele e outros procedimentos necessários ao bem estar do animal em foco. Aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, sob protocolo 102/15.

Teresina, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Proprietário



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA  
HOSPITAL VETERINÁRIO UNIVERSITÁRIO

**TERMO DE DOAÇÃO**

Proprietário:.....

Endereço:.....Fone:.....

Município:.....Estado:.....

Dôo ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Piauí, o animal cujas características são as seguintes:

Ficha Nº..... Nome:.....

Espécie:..... Raça:.....

Idade:.....Sexo:.....

Pelagem:.....

Observações:.....  
.....

Teresina, ..... de ..... de .....

.....

Assinatura do Proprietário

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia  
(*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

### Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

### Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <[www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br)>. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz) ou [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).

### Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado,

automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.

- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

### **Comitê de Ética**

É indispensável anexar cópia do Certificado de aprovação do projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. Esclarecemos que o referido documento deve constar como sendo a primeira página do texto em Word (não incluir no texto em pdf), além da menção, em Material e Métodos, do número do Certificado de aprovação do projeto.

### **Tipos de artigos aceitos para publicação:**

#### **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 30.

## **Preparação dos textos para publicação**

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

### **Formatação do texto**

O texto NÃO deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

### **Seções de um artigo**

- Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- Autores e Filiação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

#### **Nota:**

- 1.o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
  - 2.o texto do artigo em pdf NÃO deve conter o nome dos autores e filiação.
- Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
  - Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.
  - Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
  - Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já

publicados.

Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do Certificado de aprovação do CEUA. (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

✓ *Tabela.* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

✓ *Figura.* Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, SEM revisão de literatura,



discussão, repetição de resultados e especulações.

□ Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

□ Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, adaptadas para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

▪ A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)

✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

▪ *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

▪ *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*): ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

**Nota:** Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação. O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.