



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM MORFOTECNOLOGIA

EDVAN SOARES DE LIRA

**ANÁLISE *IN SITU* DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E
DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1 – *ALPHA* EM LESÕES DE
LEISHMANIOSE CANINA**

RECIFE

2021

EDVAN SOARES DE LIRA

**ANÁLISE *IN SITU* DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E
DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1 – *ALPHA* EM LESÕES DE
LEISHMANIOSE CANINA**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco na área de concentração Morfologia e Inovações Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Francisca Janaina Soares Rocha

Coorientadores: Prof^a Dr^a Juliana Pinto Medeiros

Prof. Dr. Lêucio Câmara Alves

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Lira, Edvan Soares de

Análise *in situ* do fator de crescimento endotelial vascular e do fator induzido por Hipóxia – 1 Alpha em lesões de leishmaniose canina / Edvan Soares Lira. - 2021.

72 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Janaina Soares Rocha.

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Pinto Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. Lêucio Câmara Alves.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Leishmaniose visceral. 2. Zoonoses. 3. Animais como transmissores de doenças. I. Rocha, Francisca Janaina Soares (orientadora). II. Medeiros, Juliana Pinto (coorientadora). III. Alves, Lêucio Câmara IV. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-054-2022

EDVAN SOARES DE LIRA

**ANÁLISE *IN SITU* DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E
DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1 – *ALPHA* EM LESÕES DE
LEISHMANIOSE CANINA**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco na área de concentração Morfologia e Inovações Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em: 20/12/2021

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Francisca Janaina Soares Rocha
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr^a. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr^a. Rosa Valeria da Silva Amorim
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

RECIFE

2021

Dedico este trabalho em especial a minha mãe Mércia Batista de Lira e in memoriam ao meu pai Luís Soares de Lira que apesar das dificuldades da época lutaram muito para me educar e tornar a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, que a cada dia me tornou mais forte e não me deixou desistir em nenhum momento.

A minha esposa Maria Cristina de Almeida e meus filhos: Cibele de Almeida Lira e Eduan de Almeida Lira por todo apoio ao longo da caminhada e pela força que sempre me deram.

Agradeço a minha orientadora Professora Dr^a. Francisca Janaina Soares Rocha, pela orientação, confiança, por toda paciência, dedicação, atenção e sugestão de ideias para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha coorientadora Professora Dr^a. Juliana Pinto Medeiros, por toda atenção, paciência e dedicação com o aprendizado do aluno.

A meu coorientador Professor Dr. Lêucio Câmara Alves por toda atenção, paciência e dedicação com o trabalho. E também sua aluna mestranda Letícia Maximiano pela atenção e dedicação com o projeto deste mestrado.

Aos meus amigos que nos momentos de desespero estavam ali sempre abertos a ouvirem o meu desabafo, agradeço pelas palavras de consolo, pelos conselhos de superação, força, por me mostrar a pessoa guerreira e batalhadora que eu sou, mas esquecia de acreditar. Sou grata pela amizade de vocês: Cynthia Regina, Yener Cristyel e Juliana Mané.

Agradeço aos meus pequenos de quatro patas, que foram a peça fundamental para a realização desse trabalho.

Sou grato a todos os amigos e colegas do Hospital das Clínicas Recife que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Comece fazendo o necessário, depois o que possível e de repente você estará fazendo o impossível”.

“Tudo na vida quer viver” São Francisco de Assis (Santo)

RESUMO

As leishmanioses englobam doenças de caráter zoonótico que acometem o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, em especial o cão, que é um reservatório em potencial. O processo infeccioso depende de fatores relacionado tanto do parasito quanto do hospedeiro, e a sobrevivência de *Leishmania* sp. está relacionada a evasão do sistema imune do hospedeiro. Faz-se imprescindível o planejamento de novas pesquisas para se determinar quais os fatores inerentes à resposta imuno-inflamatória do cão e às características genéticas das espécies de *Leishmania* viscerotrópicas e dermatrópicas que poderiam influenciar a patogênese da doença. O fator induzível por hipóxia1-alfa (HIF-1 α) está presente em situação de hipóxia nos tecidos, e sua ativação é importante para a capacidade leishmanicida dos fagócitos. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o mais importante agente angiogênico relacionado ao aumento da permeabilidade vascular e neovascularização relacionadas a infecções parasitárias. Diante disso o objetivo da pesquisa foi caracterizar *in situ* os marcadores da inflamação como fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), para fins de esclarecimento da patogênese e diagnóstico da leishmaniose canina, através da técnica de imunohistoquímica. Vinte cães soropositivos para leishmaniose visceral resgatados de Recife e Petrolina em 2020 e 2021 foram incluídos, os sinais e os sintomas clínicos foram coletados através de ficha epidemiológica e prontuários, e a pesquisa de antigênicos HIF-1 α e VEGF nas lesões caninas. O perfil epidemiológico revelou que a maioria dos cães (62%) foram do sexo masculino com média de idade de 7 anos. Nove cães foram classificados como oligossintomático e cinco como polissintomático. A avaliação clínica revelou que a maioria dos cães tinham dermatites, lesões ulcerativas. O diagnóstico de LVC foi previamente confirmado pelos testes parasitológicos e sorológicos. No entanto, a PCR utilizando biopsias de lesões cutâneas não foi capaz de detectar o DNA de *Leishmania* spp. Das 20 amostras de lesões cutâneas positivas para leishmaniose visceral por mais de uma técnica de diagnóstico, 16 (80%) apresentaram amastigotas nas áreas de dermatite papilar e reticular ($p < 0,001$). Nenhuma das amostras apresentou reação inflamatória granulomatosa, mostrando uma tendência do aumento de VEGF em áreas de dermatite com grande quantidade de amastigotas e maior expressão de HIF-1 α . Pelo exposto, é possível concluir, que a dermatite do tipo não granulomatosa de cães favorece a manutenção do parasito em cargas elevadas na derme, o que poderia facilitar a sua disseminação para o sistema linfático e vísceras.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; biomarcadores; imuno-histoquímica.

ABSTRACT

The leishmaniasis encompass zoonotic diseases that affect humans and several species of wild and domestic animals, especially the dog, which is a potential reservoir. The infectious process depends on factors related to both the parasite and the host, and the survival of *Leishmania* sp. is related to evasion of the host immune system. Further research is essential to determine which factors are inherent to the immune-inflammatory response of the dog and the genetic characteristics of viscerotropic and dermatropic *Leishmania* species that might influence the pathogenesis of the disease. Hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α) is present in hypoxic tissues, and its activation is important for the leishmanicidal capacity of phagocytes. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most important angiogenic agent related to increased vascular permeability and neovascularization related to parasitic infections. Therefore, the aim of this research was to characterize in situ markers of inflammation such as hypoxia-induced factor (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) for the purpose of clarifying the pathogenesis and diagnosis of canine leishmaniasis using immunohistochemistry. Twenty seropositive dogs for visceral leishmaniasis rescued from Recife and Petrolina in 2020 and 2021 were included, clinical signs and symptoms were collected through epidemiological records and medical records, and the search for HIF-1 α and VEGF antigens in canine lesions. The epidemiological profile revealed that most dogs (62%) were male with a mean age of 7 years. Nine dogs were classified as oligosymptomatic and five as polysymptomatic. Clinical evaluation revealed that most dogs had dermatitis, ulcerative lesions. The diagnosis of CVL was previously confirmed by parasitological and serological tests. However, PCR using biopsies of skin lesions was not able to detect *Leishmania* spp. DNA. Of the 20 skin lesion samples positive for visceral leishmaniasis by more than one diagnostic technique, 16 (80%) showed amastigotes in the areas of papillary and reticular dermatitis ($p < 0.001$). None of the samples showed granulomatous inflammatory reaction, showing a trend of increased VEGF in areas of dermatitis with a large amount of amastigotes and higher expression of HIF-1 α . From the above, it can be concluded, that the nongranulomatous type dermatitis of dogs favors the maintenance of the parasite in high loads in the dermis, which could facilitate its dissemination to the lymphatic system and viscera.

Keywords: visceral leishmaniasis; biomarkers; immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

Figura 1 -	Classificação quadro clínico da leishmaniose visceral canina. A- Cão com LV, apresentando apatia, alopecia e lesões no corpo. B- Cão com onicogribose. C- Cão com lesões de face e de orelha. D- Cão apresentando emagrecimento e apatia. E- Cão com emagrecimento, ceratoconjuntivite, lesões de face e orelha.	19
Figura 2 -	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.	20
Figura 3 -	Casos de leishmaniose visceral por UF de infecção, Brasil, 2019	22
Figura 4 -	Taxa de incidência de leishmaniose visceral por município de infecção. Brasil, 2019	23
Figura 5 -	Fluxograma de coleta e diagnóstico em cães com leishmaniose visceral	34

ARTIGO

Figura 1 -	Fluxograma de coleta e diagnóstico em cães com leishmaniose visceral	45
Figura 2 -	Fotomicrografias das alterações histopatológicas na derme de cães com leishmaniose visceral. A- Coloração HE de dermatite reticular de cães infectados com <i>Leishmania</i> 400X, com destaque para amastigotas no interior de macrófagos (seta), B- Coloração HE de dermatite reticular de cães infectados por <i>Leishmania</i> 400X com destaque para presença de hemossiderina (seta).	61
Figura 3 -	A-Fotomicrografias da expressão de HIF-1 α em lesões dérmicas de cães infectados por <i>Leishmania</i> 100X; B-Controle HIF 1- α 100X.	61
Figura 4 -	A-Fotomicrografias da expressão de VEGF em lesões por <i>Leishmania</i> 100X em cães com LV; B-Controle VEGF 100X.	61
Gráfico 1 -	Análise de correlação de Spearman entre a presença de inflamação papilar e a carga parasitária (amastigotas) na derme papilar de cães leishmaniose visceral.	58
Gráfico 2 -	Análise de correlação de Spearman entre a presença de inflamação reticular e a carga parasitária (amastigotas) na derme reticular de cães leishmaniose visceral.	59
Gráfico 3 -	Análise de correlação de Spearman entre marcadores HIF-1 α e VEGF e as variáveis em dermatite com maior intensidade em cães com leishmaniose visceral.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características biológicas e laboratoriais de cães do município de Recife e Petrolina entre 2020 e 2021	52
Tabela 2 -	Descrição das características dos cães e de suas lesões dermatológicas	54
Tabela 3 -	Avaliação do perfil de leucócitos entre categorias de inflamação (3+)	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C°	Graus Celsius
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CB	Centro de Biociências
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cPCR	PCR Convencional
CVA	Centro de Vigilância Ambiental
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPP	Dual Path Platform
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAST	Teste de Triagem de Aglutinação Rápida
HIF-1	Fator Induzido Por Hipóxia 1-alpha
HV- UFRPE	Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco
IFAT	Teste de Imunofluorescência de Anticorpos
IFI	Teste de Imunofluorescência Indireta
IGF-I	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I
IHQ	Técnica de Imuno-histoquímica
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
ITS1	Espaçador Interno Transcrito 1
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
NO	Oxido nítrico
MCP 1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
PIGF	Fator de Crescimento da Placenta
cPCR	Reação em Cadeia de Polimerase convencional
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pK	proteínase K
qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real
RFC	Reação de Fixação do Complemento
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta

rK39	antígeno recombinante
TGF	Fator de Crescimento Transformador
TRALD	Teste Rápido Anticorpo <i>Leishmania donovani</i>
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Manifestações Clínicas da Leishmaniose Canina.....	17
2.2	Ciclo Biológico e Formas de Transmissão da <i>Leishmania</i> sp.....	19
2.3	Epidemiologia da Leishmaniose Visceral	21
2.4	Evolução dos Métodos Diagnósticos.....	23
2.4.1	Diagnóstico Parasitológico	24
2.4.2	Diagnóstico sorológico	24
2.4.3	Diagnóstico Molecular	27
2.4.4	Diagnóstico Imunohistoquímico	27
2.5	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e Fator Induzido por Hipóxia 1-Alpha (Hif-1 α) nas Lesões por <i>Leishmania</i>	28
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo Geral.....	31
3.2	Objetivos Especificos.....	31
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	Desenho do Estudo	32
4.2	Local e Período do Estudo	32
4.3	Amostras	32
4.4	Diagnóstico	34
4.4.1	Dual Path Platform - DPP	34
4.4.2	Diagnóstico Parasitológico	35
4.4.3	Diagnóstico Histopatológico	35
4.4.4	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - ELISA	35
4.4.5	Identificação de <i>Leishmania</i> spp.	36
4.4.6	Imunohistoquímica para os marcadores HIF-1A e VEGF	37
4.5	Análises Estatística	38
4.6	Aspectos Éticos	38

5	ARTIGO – Análise do fator de crescimento endotelial vascular e do fator induzido por hipóxia 1-alpha em lesões de laishmaniose canina	40
6	CONCLUSÃO	62

REFERÊNCIAS

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

ANEXO A - Certificado de aprovação da CEUA / UFRPE

ANEXO B - Artigo submetido a BMC Veterinary Research

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária de importância médica e veterinária, causada por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (MARTINS *et al.*, 2015). Sua transmissão ocorre por meio de insetos-vetores, denominados flebotomíneos, e são classicamente divididas em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), sendo causadas por diferentes espécies de parasitos, na qual são digenéticos, desenvolvem-se com a forma promastigota no aparelho digestivo de insetos flebotomíneos e com a forma amastigota intracelular no sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, como cães e humanos (AWASTHI *et al.*, 2004; QUINNELL *et al.*, 2009).

É uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente a população pobre de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento por estar associada à desnutrição, fraqueza do sistema imunológico, habitações precárias e falta de recursos. Ocorrem cerca de 500.000 casos/ano em humanos distribuídos pelos 60 países onde é endêmica, sendo 90% deles na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (WHO, 2016). É transmitida durante repasto sanguíneo pelo flebótomo hematófago infectado e o cão infectado apresenta síndrome clínica caracterizada por atrofia muscular, perda de peso, lesões na pele e onicogribose, porém alguns canídeos não apresentam esses sinais, mesmo após meses ou anos de infecção (PINELLI *et al.*, 1994; DANTAS-TORRES, 2009; MATLASHEWSKI *et al.*, 2011).

O Brasil representa 90% da incidência dos casos ocorridos na América Latina (MISSAWA *et al.*, 2008; QUINNELL; COURTENAY, 2009; BRASIL, 2010; COSTA, 2011), onde o parasito *Leishmania chagasi* e *L. infantum* são os principais causadores da leishmaniose visceral canina (LVC) (DANTAS TORRES, 2006; PINTO *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2013). O cão (*Canis familiares*) é um importante reservatório desse parasito, tendo papel central na transmissão a humanos, principalmente em regiões de degradação ambiental associadas à migração humana e ao processo de urbanização, representando sério problema de saúde pública (PINTO *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2013).

O principal vetor biológico da leishmaniose visceral canina (LVC) são os insetos-fêmeas, da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (SHARMA; SINGH, 2008). Os principais hospedeiros mamíferos são roedores, carnívoros e primatas, sendo o cão considerado o principal reservatório e fonte de infecção doméstica da *L. infantum* (DANTAS-TORRES, 2007; SOBRINO *et al.*, 2008; WHO, 2016). A

doença já foi identificada no cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores (BANETH, 2006). No Brasil, as raposas infectadas foram encontradas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica e também já foram relatados casos de marsupiais infectados no Brasil e na Colômbia (LAINSON *et al.*, 1990; BRASIL, 2006).

O processo infeccioso depende de fatores relacionado tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, e a sobrevivência da *Leishmania* sp. está relacionada a evasão do sistema imune do hospedeiro (SACKS; SHER, *et al.*, 2002). O papel mais relevante na luta contra a leishmaniose é realizado pela resposta imune específica. A resistência à infecção está associada a um perfil de secreção de citocinas, que possuem papel importante na indução dos linfócitos T do tipo Th1 e Th2. A imunidade protetora é realizada através de uma resposta mediada pelos linfócitos Th1, onde haverá produção de várias citocinas (TNF- α , IL2, IL12, INF α - β e pelo IFN- γ), responsáveis pela atividade leishmanicida dos macrófagos, por meio da produção de óxido nítrico (NO) para induzir apoptose celular e a eliminação do parasito (VIEIRA, 2014; ZIMOVSKI, 2016). No entanto, a suscetibilidade à infecção está associada a uma resposta do tipo Th2, resultando na secreção de interleucinas (IL-4, IL5, IL-6, IL-10 e IL-13 e TGF- β), desencadeando a proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos (VIEIRA, 2014; CARNEIRO, 2016; ZIMOVSKI, 2016).

O fator induzível por hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) está presente em situação de hipóxia nos tecidos, e sua ativação é importante para a capacidade leishmanicida dos fagócitos. Além disso regula a produção de diversas enzimas e ativa genes que participam da eritropoiese, angiogênese e glicólise, que podem ter ações protetoras ou nocivas para o organismo (FRAGA *et al.*; 2012; CARDOSO *et al.*, 2015).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o mais importante agente angiogênico relacionado ao aumento da permeabilidade vascular e neovascularização em câncer e infecções parasitárias (NIZET; JOHSON, 2009). Ele tem importância crucial para a angiogênese, tanto natural como desencadeada por processos patológicos tais como: crescimento tumoral, metástase e em infecções com sinais clínicos de desordem epitelial, como nas leishmanioses (FRAGA *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2015).

Na leishmaniose canina por se tratar de uma zoonose e o cão ser um reservatório de alto potencial, é imprescindível a otimização do seu diagnóstico e prognóstico, buscando-se identificar novos marcadores que poderão ser úteis para o monitoramento do curso clínico, das respostas terapêuticas e da imunidade do animal. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi determinar *in situ* a presença dos HIF-1 α e VEGF em lesões dos caninos com leishmaniose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE CANINA

A leishmaniose é uma doença infecciosa sistêmica, de evolução lenta e início insidioso. Suas manifestações clínicas são dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. Dentre as alterações sistêmicas, é possível encontrar: hepatomegalia, esplenomegalia, conjuntivite, inflamação das margens das pálpebras, rinite, poliartrite neutrofílica e glomerulonefrite. Essas alterações causam sinais clínicos como secreção ocular, tosse, epistaxe, poliúria e polidipsia, icterícia, letargia, intolerância a exercícios, febre, perda de peso progressiva, perda muscular, vômito e diarreia, paralisia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte, sintomas estes que podem ser confundidos com a cinomose (MAIA, 2013; BRASIL, 2014, FREIRE; MORAES, 2019).

A hipoalbuminemia também pode ser observada, estando relacionada ao catabolismo proteico aumentado, a lesão renal, a desnutrição ou ao defeito na síntese hepática decorrente da inflamação do fígado (GODOY *et al.*, 2017). Estudos realizados por Godoy *et al.* (2017), verificou-se a presença dessa alteração em 68,3% das amostras estudadas. Com as alterações nos valores dessas proteínas há a inversão da razão albumina\globulina (A/G), e quanto maior o número de sinais clínicos, maior é a concentração de imunoglobulina, justificando a menor razão A\G encontrada nos animais portadores da doença (GODOY *et al.*, 2017; TORRES *et al.*, 2017).

Cerca de 50% a 60% de todos os cães portadores de formas amastigotas não exibem qualquer sinal clínico da doença, e 20% destes animais apresentam parasitos na pele (ALVAR *et al.*, 2004; BANETH, 2006). Com o passar do tempo, pode haver progressão para doença sintomática, ao menos que a replicação das amastigotas seja cessada por mecanismos imunológicos. Aproximadamente 15% dos animais infectados são clinicamente resistentes, ou seja, capazes de se recuperar dos sintomas clínicos e eliminar os parasitos espontaneamente (ALVAR *et al.*, 2004), enquanto outros, considerados suscetíveis, são predispostos à desenvolverem uma infecção e doença sintomática (LITTLE, 2006).

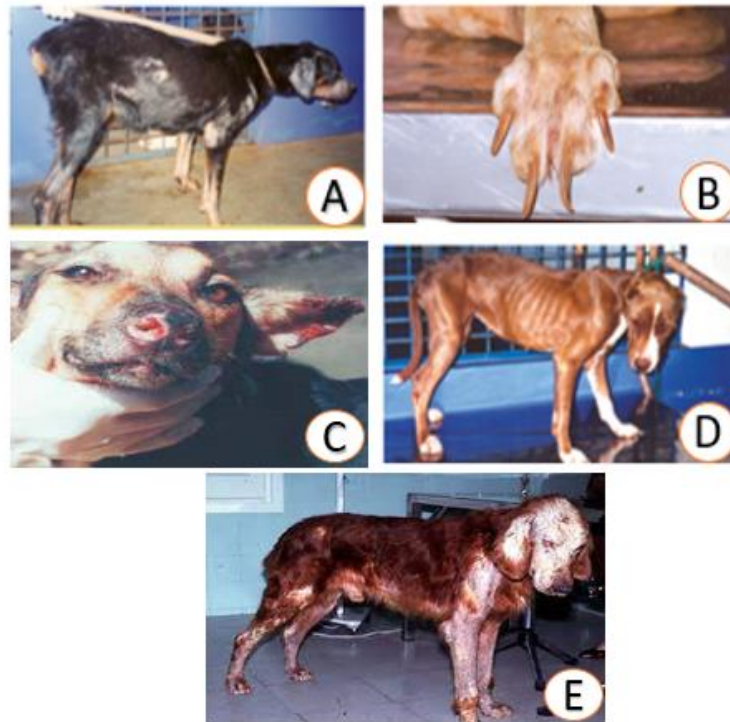
A doença no cão é de evolução lenta e início insidioso. A leishmaniose visceral canina é uma doença sistêmica severa cuja manifestações clínicas estão intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. O quadro clínico dos cães infectados apresenta características clínicas que varia do estágio assintomático a um estágio

grave da doença. Inicialmente, os parasitos estão presentes no local da picada. Posteriormente, ocorre a infecção de vísceras e eventualmente tornam-se distribuídos através da derme. A alopecia causada pela infecção expõe grandes áreas da pele extensamente parasitada. Classicamente a leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta lesões cutâneas, principalmente descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações e pelo opaco. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se, com grande frequência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose (Figura 1). Na fase final da infecção, ocorre em geral a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período (Brasil, 2014).

A classificação segundo os sinais clínicos apresentados nesses animais pode ser:

- Cães assintomáticos: ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*.
- Cães oligossintomáticos: presença de adenopatia linfoide, pequena perda de peso e pelo opaco.
- Cães sintomáticos: todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores.

Figura 1 - Classificação quadro clínico da leishmaniose visceral canina. A- Cão com LV, apresentando apatia, alopecia e lesões no corpo. B- Cão com onicogribose. C- Cão com lesões de face e de orelha. D- Cão apresentando emagrecimento e apatia. E- Cão com emagrecimento, ceratoconjuntivite, lesões de face e orelha.



Fonte: Brasil, 2014. Ministério da Saúde. Adaptado.

2.2 CICLO BIOLÓGICO E FORMAS DE TRANSMISSÃO DA *Leishmania* spp.

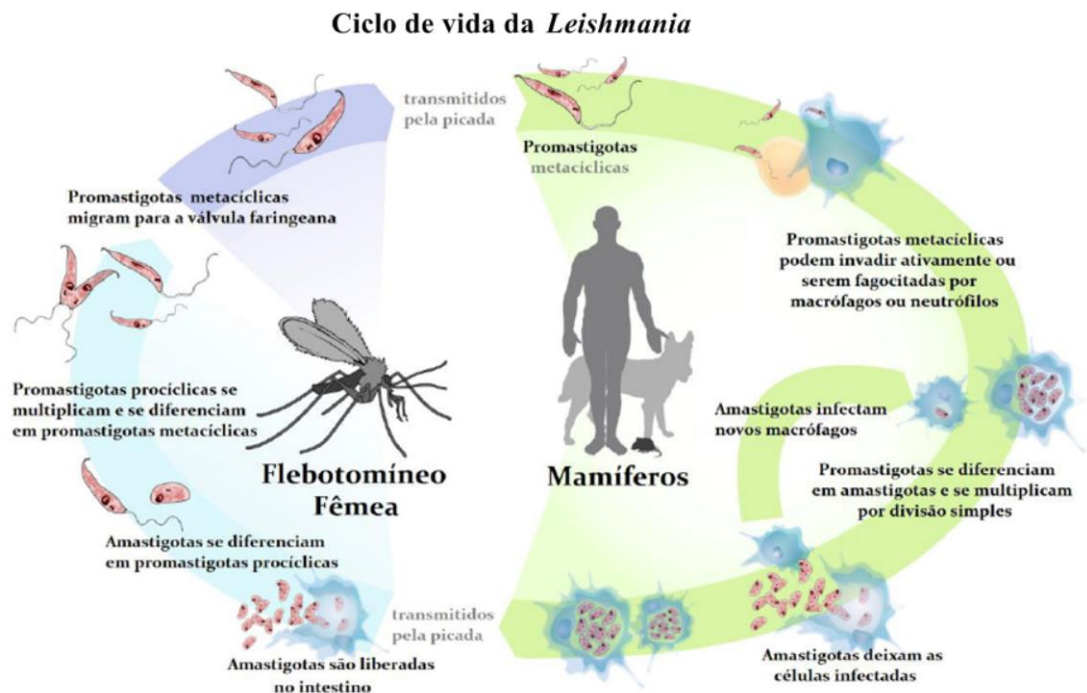
O ciclo biológico de *Leishmania* sp. é heteroxênico, necessitando de dois hospedeiros, sendo um deles o invertebrado, representado pelo inseto vetor, e por um hospedeiro vertebrado, mamíferos representados por humanos, canídeos silvestres e domésticos, marsupiais e roedores (SCHLEIN *et al.*, 1993).

A transmissão inicia-se quando os insetos infectados picam o hospedeiro vertebrado, após a picada do flebotomíneo infectado com *Leishmania* spp. (PETERS, 2008), os quais podem contribuir direta ou indiretamente na eliminação do parasito. Na infecção por *L. amazonensis* (NOVAIS *et al.*, 2009) e na *L. braziliensis* (GUIMARAES-COSTA *et al.*, 2009). As formas promastigotas (extracelulares alongadas e flageladas, medindo entre 14 e 20 μ m) do parasito são regurgitadas e inoculadas. Estas formas possuem mecanismos que lhes permitem resistir à ação de elementos presentes no sangue, principalmente o sistema complemento, e estimular sua adesão e endocitose pelos macrófagos. Em seguida, são fagocitadas por macrófagos e se transformam na forma amastigota (arredondadas, medindo entre 2,1 e 3,2 μ m),

dentro dos fagolisossomos. Esse ambiente, com pH intensamente ácido, estresses oxidativos e proteolíticos, é essencial para a transformação na nova forma, sendo crucial ao sucesso da infecção. Depois de sucessivos ciclos de replicação por divisão binária, as amastigotas podem causar rompimento do macrófago, caindo no espaço intercelular, aonde virão a ser fagocitadas por outros macrófagos e células do sistema fagocítico mononuclear (ALEXANDER *et al.*, 1999; MICHALICK, 2002)

O ciclo de transmissão de *Leishmania* inicia-se pelo repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Durante a picada as formas promastigotas são regurgitadas no hospedeiro vertebrado, sendo fagocitadas por macrófagos onde se diferenciam em formas amastigotas que se multiplicam por divisão binária até o rompimento da célula, liberando os amastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos. A fêmea do flebotomíneo ao picar o hospedeiro mamífero infectado ingere juntamente com o sangue os macrófagos infectados que no seu tubo digestivo se rompem e liberam as amastigotas e se diferenciam em formas promastigotas que se multiplicam por fissão binária. O flebotomíneo ao realizar um novo repasto sanguíneo, liberam as formas infectantes, dando assim continuidade ao ciclo (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2007), conforme visualizados na Figura 2.

Figura 2 - Ciclo biológico da *Leishmania* sp.



2.3 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

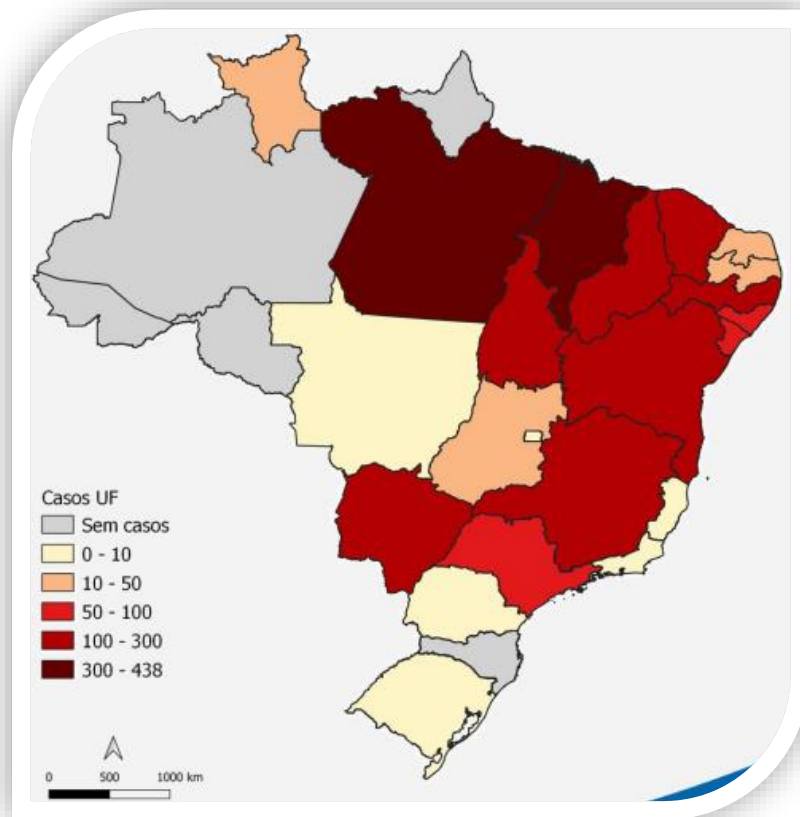
O cão doméstico (*Canis familiaris*) desempenha grande importância na epidemiologia da LV em áreas endêmicas, pois é um reservatório doméstico da LV. Em áreas silvestres outros canídeos desempenham papel semelhante (*Cerdocyon thous* e *Dusicyon vetulus*), além de outros animais já encontrados albergando *L. chagasi*, como marsupiais didelfídeos (BRASIL, 2006). Existem também relatos indicando roedores como reservatórios da LV em áreas rurais e periurbanas (SILVA, 2007).

Leishmaniose visceral é uma doença com uma peculiar distribuição geográfica. Em alguns locais, como a Índia, Nepal e África, é uma doença exclusivamente antroponótica, isto é, só é transmitida entre humanos. Porém, na China, no Oriente Médio, no Mediterrâneo e nas Américas Central e do Sul, é uma zoonose, pois é transmitida entre animais e humanos (COSTA, 2011).

Atualmente, a leishmaniose está presente nas Américas, Europa, África e Ásia, e geralmente está associada à pobreza, desnutrição, deslocamento populacional e mudanças climáticas e ambientais. Estima-se uma prevalência mundial de 12 milhões de casos, com uma incidência anual de cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV e entre 600.000 e 1 milhão de novos casos de LCL (OPAS 2019).

A notificação passou a ser obrigatória no Brasil em 1978 e, ultimamente, todas as 24 unidades federativas brasileiras já registraram casos autóctones da leishmaniose, distribuídas em todas as cinco regiões, sendo a região Nordeste com o maior registro de casos do país, cerca de 49,1% dos casos, sendo mais incidente nos estados do Maranhão, Ceará, Bahia, Piauí, Pernambuco (BRASIL, 2021) (Figura 3). Geralmente a LV está associada às áreas xéricas, semiáridas, sendo originalmente uma doença típica de áreas rurais e periurbanas (GONTIJO; MELO, 2004).

Figura 3 - Casos de leishmaniose visceral por UF de infecção, Brasil, 2019.



Fonte: Brasil. Ministério da Saúde.

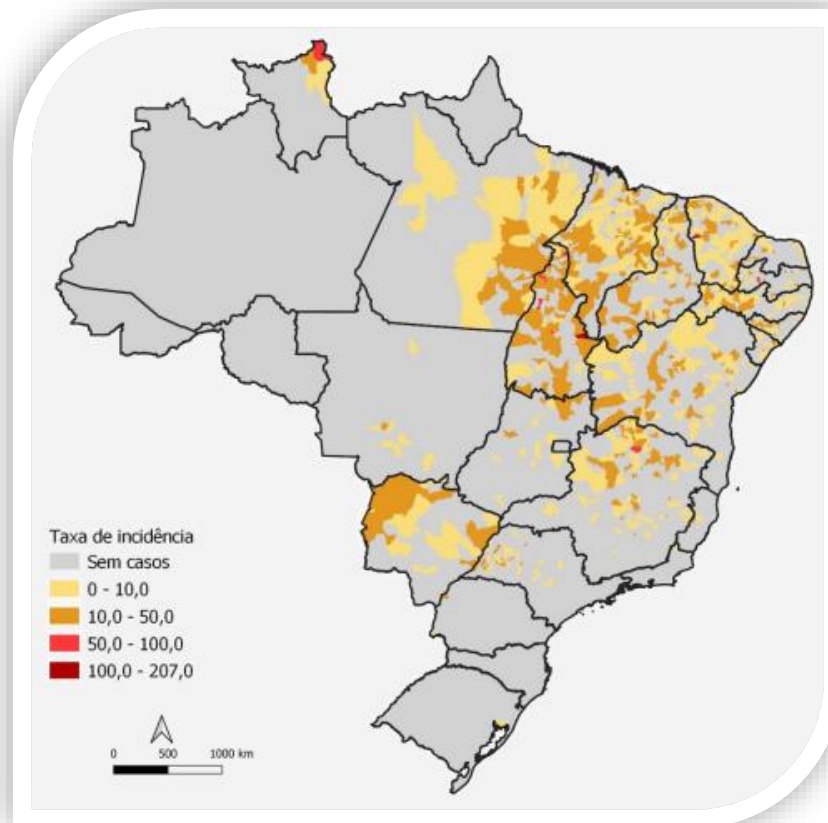
A incidência de LV nas Américas foi de 2,96 e 0,47 casos por 100.000 habitantes, considerando a população das áreas de transmissão e a população total dos países com ocorrência de casos de LV, respectivamente. Em 2019, quatro países tiveram redução na incidência de LV (Brasil, Guatemala, Paraguai e Venezuela, enquanto 6 países tiveram aumento na taxa (Argentina, Bolívia, Colômbia, Honduras, México e Uruguai).

No Brasil, foi registrado o menor número de casos de LV desde 2003, devido a uma redução de 27% (937) dos casos. Por outro lado, a Argentina, o Paraguai e o Uruguai tiveram um aumento de casos, e a Bolívia (Estado Plurinacional da) notificou um caso de LV ao Sisleish pela primeira vez, embora a transmissão autóctone já tivesse sido confirmada em anos anteriores (OPAS, 2020).

Na distribuição dos casos, incidência por 100.000 habitantes de casos de leishmaniose visceral, o maior número de casos no Brasil ocorreu nos municípios de Fortaleza (Ceará) São

Luis (Maranhão), Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Belo Horizonte (Minas Gerais), Teresina (Piauí), Marabá e Paraupébas (Pará) e Araguaína (Tocantins) (OPAS, 2020) (Figura 4).

Figura 4 - Taxa de incidência de leishmaniose visceral por município de infecção. Brasil, 2019.



Fonte: Brasil. Ministério da Saúde.

2.4 EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. O diagnóstico clínico é complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias.

2.4.1 Diagnóstico Parasitológico

Até a década de 30, o diagnóstico humano e os inquéritos caninos eram realizados por meio dos exames diretos através da punção de fígado, de baço, no entanto, esses exames apesar de apresentar boa positividade dos casos, não são eficazes para realizar uma cobertura total dos animais positivos (RAMOS *et al.*, 2019), devido sua invasividade. O diagnóstico também pode ser realizado através do raspado de pele. A confirmação parasitológica da leishmaniose visceral é baseada na visualização de amastigotas por exame microscópico de aspirados teciduais. Apesar de sua alta especificidade, a sensibilidade nos diferentes métodos é variável, sendo maior em aspirados de baço (93-99%) do que na medula óssea (53-86%) ou linfonodo (53-65%), no entanto, o aspirado do baço apresenta alto risco para o paciente devido a possíveis complicações (por exemplo, ruptura do baço e sangramento não controlado); portanto, exige cuidados muito rigorosos, como experiência e conhecimento técnico do operador, instalações adequadas de serviços de saúde e apoio para realização de hemotransfusões e cirurgias em caso de emergência (PAHO, 2019).

A demonstração do parasito pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas para preparação histológicas. A especificidade destes métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido. A sensibilidade mais alta (98%) é alcançada quando se utiliza aspirado do baço. As punções esplênicas e de medula óssea são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, não sendo procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em larga escala, e muitas vezes são também inadequados para diagnósticos individuais (SUNDAR *et al.*, 2002).

2.4.2 Diagnóstico Sorológico

Exame sorológico, realizado pela reação de fixação do complemento (RFC), foi utilizado pela primeira vez, para diagnosticar a LV humana, em 1938 (SOUZA *et al.*, 2013). Em 1957, pesquisadores brasileiros descreveram a RFC para inquéritos caninos, com antígeno extraído do bacilo da tuberculose, concluindo que, esta técnica possuía sensibilidade e especificidade melhores que os exames diretos. Com a demonstração da possibilidade de aplicação da RFC em eluatos de sangue colhidos em papel de filtro, essa técnica tornou-se largamente difundida (MARTINS *et al.*, 2018), com vantagens sobre os demais métodos

sorológicos por não apresentar reações cruzadas com outras enfermidades, mesmo quando se utilizam antígenos (BRASIL, 2014). Contudo, podem ocorrer reações cruzadas em títulos baixos com a doença de Chagas e a leishmaniose tegumentar americana (LTA). Nos casos de LV, comumente são observados títulos elevados de anticorpos no soro, geralmente superiores a 1:80, sendo que títulos inferiores a esse necessitam de confirmação por outras metodologias (BRASIL, 2014).

Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da LV humana e canina. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizada desde a década de 60, demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro (NOLETO, *et al.*, 2017). A especificidade desse teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos (NOLETO, *et al.*, 2017). A utilização de formas amastigotas de *L. donovani* como antígeno nas RIFI aumenta significativamente a sensibilidade, sem perder a especificidade do teste, resultando numa maior precocidade do diagnóstico frente a animais assintomáticos ou oligossintomáticos (SANTOS *et al.*, 2018).

A necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 70, muitos estudos avaliando e aprimorando o ELISA-padrão, assim como, as diversas variações de ELISA como: Dot-ELISA, fucose manose ligant-ELISA ou FML-ELISA, bovine submaxillary mucin-ELISA ou BSM-ELISA, Fast-ELISA, micro ELISA, entre outras. O ensaio imunoenzimático (ELISA) permite a triagem de muitas amostras utilizando microplacas revestidas com antígeno e um espectrofotômetro que determina os títulos de anticorpos por densidade óptica. O potencial para quantificação absoluta de anticorpos torna o ELISA uma ferramenta poderosa que é menos suscetível ao viés do operador. Um de seus pontos fortes é a possibilidade de usar combinações de múltiplos antígenos, aumentando assim a sensibilidade e / ou especificidade do método (TRAVI *et al.*, 2018).

A utilização de antígenos recombinantes ou purificados como as glicoproteínas de membranas gp63, gp72, gp70 e rK39 específicas do gênero *Leishmania*, melhoram a sensibilidade e a especificidade da técnica. Entretanto, reações cruzadas com enfermidades causadas por outros tripanossomatídeos podem ainda ocorrer (BANETH, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2021). O desempenho do rK39 pode variar de acordo com a marca usada, o rK28 desenvolvido mais recentemente tem apresentado alta sensibilidade no subcontinente indiano e africano (acima de 95%) (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019). O antígeno recombinante rK39 é bem estudado e já testado no Brasil específico para as espécies do complexo *L. donovani*. (MOLINET *et al.*, 2013). O teste de imunocromatografia foi desenvolvido para o diagnóstico

da LV humana, e vem sendo aplicado em estudos para a LVC. O teste foi desenvolvido utilizando-se o rK39 fixado em papel (Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* - TRALd) e baseia-se na reação com o sangue, soro ou plasma do paciente. No Brasil, quando aplicado em cães de área endêmica, a sensibilidade foi de 92% e a especificidade de 99,5% (GONTIJO, MELO, 2004; Leal, 2007).

O teste de aglutinação direta (DAT) é baseado na aglutinação de promastigotas de *Leishmania* corados com Coomassie tripsinizados por anticorpos anti-*Leishmania*. Foi o primeiro teste sorológico desenvolvido para uso em campo. É simples, barato e confiável, com acurácia clínica comprovada (SOUSA *et al.*, 2011; ADAMS *et al.*, 2012). Tem uma sensibilidade e especificidade de 91% a 100% e 72% a 100%, respectivamente, mas a leitura subjetiva dos títulos dos pontos finais leva à discrepância do observador (ADAMS *et al.*, 2012). Apesar dessas desvantagens, o DAT é bem aceito como um teste sorológico de rotina geralmente aplicado a muitas amostras. O teste de triagem de aglutinação rápida (FAST) é uma modificação do DAT com base em uma única diluição de soro acima do ponto de corte de soros normais. Requer tempos de incubação mais curtos e foi otimizado para a triagem de grandes populações de cães (SCHALLIG *et al.*, 2002).

O teste de imunofluorescência de anticorpos (IFAT) é o método sorológico qualitativo de referência para o diagnóstico de CVL (PALTRINIERI *et al.*, 2016). O uso da IFAT é restrito a ambientes laboratoriais porque necessita de equipamento especializado e pessoal treinado (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2014). A especificidade e sensibilidade são próximas a 100% em animais sintomáticos. Algumas limitações notáveis são a reatividade cruzada com outros patógenos, como tripanossomos.

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina é um teste rápido de triagem fundamental para as ações de campo dos serviços municipais da Secretaria de Vigilância em Saúde. O teste conta com a inovadora tecnologia de imuno-ensaio cromatográfico Dual Path Platform (DPP®) que amplia, consideravelmente, o nível de sensibilidade e agilidade se comparada a outras metodologias, possibilitando a detecção da doença de forma mais rápida (entre 15 e 20 minutos).

O teste permite o uso das amostras soro, plasma ou sangue total venoso. Além disso, o exame oferece diversos benefícios: fácil execução em campo; leitura e interpretação simples; maior sensibilidade e especificidade; capacidade de multi-testes aperfeiçoada; uso tanto de sistemas com conjugados líquidos quanto secos; por ser um teste de triagem, permite que apenas os casos positivos sejam levados para confirmação, desonerando, desta forma, o laboratório (Bio-Manguinhos/Fiocruz 2019).

2.4.3 Diagnóstico Molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular muito utilizada no diagnóstico da LVC, pois é altamente sensível e específica, possuindo entre 38% a 76% de sensibilidade e 100% de especificidade (NISHIDA E DELMASCHIO, 2017; BARRIOS; ALICIA, 2018; GALLUZZI *et al.*, 2018). Porém, os resultados da PCR podem variar muito de acordo com o tipo de amostra utilizada, metodologia usada na purificação do DNA e região-alvo escolhida para amplificação (HOLANDA *et al.*, 2018).

O diagnóstico molecular associado ao exame clínico, sorológico e parasitológico favorece a caracterização epidemiológica e o controle da infecção. A PCR convencional (cPCR) e a PCR em tempo real (qPCR) são utilizadas para detectar o parasito a partir de moléculas de DNA em várias amostras biológicas, porém, quando a carga parasitária é baixa, falsos resultados são comuns na rotina diagnóstica (GONÇALVES, 2018).

2.4.4 Diagnóstico Imunohistoquímico

A técnica de imunohistoquímica (IHQ) é realizada a partir da identificação do parasito em cortes de fragmentos de tecidos retirados de biópsias, principalmente da face interna do pavilhão auricular de cães, onde são encontradas maiores concentrações do parasito ou com conteúdo obtido da punção de linfonodos ou medula óssea (LIMA *et al.*, 2013).

O exame consiste na associação do antígeno de *Leishmania* spp. com um anticorpo, em seguida um segundo anticorpo irá se ligar ao primeiro, permitindo assim a visualização do antígeno (LIMA *et al.*, 2013; GUERRA *et al.*, 2016).

O emprego do método imunohistoquímico propicia melhores resultados, pois tem maior contraste e melhor visualização, permitindo aumento na sensibilidade e especificidade na detecção do agente. Esse teste possui de 70 % a 80 % de sensibilidade e 100% de especificidade, resultando em maior sensibilidade e especificidade quando comparada à histopatológica (LIMA *et al.*, 2013; GUERRA *et al.*, 2016; MUNFORD, 2016).

O diagnóstico da LVC só deve ser estabelecido após uma combinação da sintomatologia clínica apresentada pelo animal com o resultado de exames parasitológicos, sorológicos ou moleculares (FERRER, 1999; ALVAR *et al.*, 2004).

2.5 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) E FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1-alpha (HIF-1 α) NAS LESÕES POR *Leishmania*

O VEGF é um agente angiogênico que está envolvido no aumento da permeabilidade vascular (NIZET, JOHNSON, 2009) e, na inflamação granulomatosa, promovendo a migração e ativação de macrófagos para o sítio infeccioso (NOGUEIRA, LATINI, NOGUEIRA, 2016).

Na infecção por leishmaniose as lesões epiteliais encontradas nos quadros clínicos podem estar associadas à hipóxia em camundongos (ARRAIS-SILVA et al., 2005) e em humanos acometidos por leishmaniose cutânea (FRAGA et al., 2012).

Estudos com VEGF, HIF-1 α e a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em material de lesões humanas tem ajudado no monitoramento do curso clínico dos pacientes com hanseníase (vichorwiana, tuberculoide, dimorfo). O HIF-1 α está presente em situações de hipóxia nos tecidos, sua ativação é importante para a capacidade bactericida dos fagócitos, além disso, regula a produção de diversas enzimas, entre elas a iNOS, que pode ter ação protetora ou nociva para o organismo (CARDOSO et al., 2015; ZINKERNAGEL, JOHNSON, NIZET, 2007; SINGH et al, 2012; GORDAN, SIMON, 2007).

A expressão de HIF pode ter efeitos distintos na regulação imunológica a depender do tipo de célula (BHANDARI, NIZET, 2014). Um estudo comparou o efeito do HIF-1 α em fagócitos mononucleares na leishmaniose cutânea induzida por *L. major* e na leishmaniose visceral, mostrando que o HIF-1 α atua como fator protetor na leishmaniose cutânea, enquanto na leishmaniose visceral ele atuou como fator prejudicial (SCHATZ, NEUBERT, RIEGER, JANTSCH, 2018).

Outro estudo demonstrou que a ativação do HIF-1 α no macrófago é um fator protetor para a *Leishmania donovani*, onde o crescimento intracelular do parasito foi favorecido na presença de HIF-1 α contrapondo-se a atividade prejudicial a outros patógenos como *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* dentre outras bactérias. A infecção por *L. donovani* aumentou a transcrição de HIF-1 α e sua estabilização, bem como inibiu a atividade da prolina hidroxilase - PHD (SINGH, 2012).

Os vasos sanguíneos têm uma participação estratégica na resposta imune inflamatória, com importante expressão de citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento e fatores hemostáticos por células endoteliais que podem ser identificados precocemente e auxiliar clinicamente como biomarcadores de algumas doenças infecciosas (NOGUEIRA; LATINI; NOGUEIRA, 2016).

O VEGF é um dos mais importantes agentes angiogênicos relacionado ao aumento da permeabilidade vascular e neovascularização em câncer, retinopatia diabética, feridas, degeneração macular relacionada à idade e infecções parasitárias (NIZET; JOHNSON, 2009). O VEGF se liga ao seu receptor presente em células endoteliais para que se inicie a angiogênese, esses receptores são chamados de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 e a ativação do VEGF pode ocorrer por inúmeros estímulos, entre eles a hipóxia e a isquemia, e algumas citocinas. Em situações de hipóxia, ocorre uma vasodilatação periférica devido ao aumento do óxido nítrico circulante e uma estabilização do HIF-1 α , e por consequência, um aumento nos níveis de VEGF (NOCITI *et al.*, 2015).

Estudo *in vitro*, realizados com diversas cepas de *Leishmania* spp. entre elas a *L. infantum* e a *L. donovani*, demonstraram interação com fatores pró-angiogênicos como o VEGF (ARDORE *et al.*, 2014). Não apenas os sinais clínicos de lesão da pele na leishmaniose estão relacionados com quadros de hipóxia, o controle *in vitro* estava associado a uma possível diminuição das porcentagens de células infectadas (COLHONE *et al.*, 2004). Por outro lado, a promoção da angiogênese pode também proporcionar um ambiente favorável para o desenvolvimento da leishmaniose, tendo como base o fato de que algumas moléculas leishmanicidas têm potenciais anti-angiogênicos (GALAL *et al.*, 2009). Existem evidências que também algumas formas de *Leishmania* spp., como a *L. donovani*, pode ser capaz de ativar o fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1) que regula a ação do VEGF no intuito de auxiliar sua adesão e sobrevivência em macrófagos (SINGH *et al.*, 2012).

A angiogênese aumenta o VEGF na inflamação granulomatosa, promovendo a migração e ativação de macrófagos para a região (NOGUEIRA; LATINI; NOGUEIRA, 2016). A ativação endotelial induz ao estímulo de moléculas que podem implicar na patogênese das reações hansênicas (NOGUEIRA; LATINI; NOGUEIRA, 2016).

A expressão de VEGF tem sido demonstrada por células epiteliais glomerulares (podócitos) (KRETZLER, 1998; SHULMAN, 1996) e por células tubulares (SIMON, 1995), os seus receptores estão no endotélio dos glomérulos e nos capilares peritubulares (SIMON, 1998; THOMAS 2000). A presença da hipóxia é um dos principais estímulos para o aumento da expressão do VEGF. Essa expressão também pode ser regulada e influenciada por uma grande variedade de hormônios, fatores de crescimento, citocinas, como fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformador (TGF), fator de crescimento da placenta (PlGF), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), angiotensina II, IL-1 e IL-6. O VEGF acarreta na proliferação de células endoteliais, aumenta a permeabilidade vascular e medeia a vasodilatação do endotélio via aumento da produção de óxido nítrico (NO) pela síntese

NO endotelial (iNOS) (HOOD, 1998). Além disso, VEGF induz a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (MARUMO, 1999) que conseqüentemente promove a quimiotaxia de monócitos e expressão de moléculas de adesão (NEUFELD, 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar *in situ* a presença dos HIF-1 α e VEGF em lesões dos caninos com leishmaniose

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características das lesões dermatológicas dos caninos;
- Realizar a análise qualitativa dos níveis de HIF-1 α e VEGF detectados nas lesões, intensidade de leve a acentuada;
- Correlacionar os achados imunohistoquímicos com a histopatologia.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, no qual os cães foram investigados para determinar a presença dos HIF-1 α e VEGF em lesões dos caninos com leishmaniose, caracterizar *in situ* os marcadores da inflamação: Fator induzido por hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), para fins de esclarecimento da patogênese e construção de alternativas no diagnóstico da leishmaniose canina, através da técnica de imunohistoquímica.

4.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

As amostras clínicas dos cães foram resgatadas através do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV-UFRPE) e Centro de Vigilância Ambiental de Petrolina (CVA) os e dados clínicos epidemiológicos foram capturados a partir de um formulário extraídos através do prontuário médico dos cães. A pesquisa e as análises de dados foram realizadas pelo Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia (PPGM) do Departamento de Histologia e Embriologia - (DHE) no Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Os procedimentos de imuno-histoquímica foram realizados no Departamento de Parasitologia CCS/UFPE e os procedimentos moleculares foram realizados no Departamento de Parasitologia do Instituto Ageu Magalhães IAM/Fiocruz no período de março de 2020 à dezembro de 2021.

4.3 AMOSTRAS

Neste estudo, foram resgatados 20 blocos de biopsia parafinada de lesões cutâneas em cães do município de Recife e de Petrolina, Pernambuco, Brasil, com diagnóstico confirmado de leishmaniose. O diagnóstico foi confirmado em todos os casos por meio de biópsia, exame parasitológico direto. Apesar da limitação de alguns dados clínicos das lesões, todas as amostras foram de lesões cutânea da região do cotovelo. Essas amostras foram coletadas de 20 cães no período de 2020 e 2021.

Foram avaliados 20 cães soropositivos para *Leishmania* sp. dos quais foram colhidas biópsias das lesões de pele da região de cotovelo para investigação histopatológica e identificação molecular da espécie parasitária, esses materiais foram coletados no ambulatório do HV-UFRPE e CVA de Petrolina.

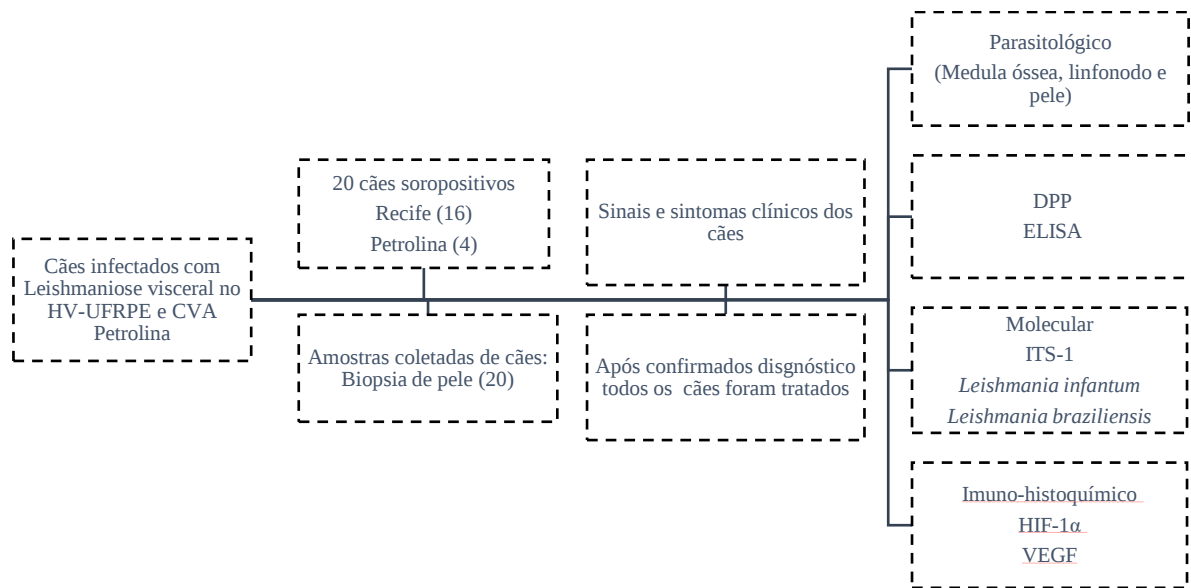
Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética em Uso de Animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o protocolo (1983220520) em anexo. Os proprietários dos animais foram convidados a participar da pesquisa e, após o aceite, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A), autorizando a utilização do material coletado para fins científicos.

A coleta de biopsia foi realizada em total de 20 amostras de lesões de pele de 20 cães com leishmaniose, sendo 16 cães coletados do município de Recife e quatro do município de Petrolina positivas pelo teste parasitológico, conforme visualizados no fluxograma abaixo (Figura 5).

Para cada animal, o estado clínico foi avaliado e os achados foram registrados em formulário específico, antes da coleta das amostras. Os seguintes sinais / sintomas foram investigados: perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, dermatite ulcerativa / seborreica, alopecia generalizada ou localizada, onicogribose. A partir desses achados, cada animal foi classificado como assintomático (sem sinais / sintomas sugestivos de CVL), oligossintomático (um a três sinais clínicos, por exemplo, cães com adenopatia linfóide, perda de peso e cabelo opaco) e polissintomático (mais de três sinais / sintomas).

Após avaliação clínica, as coletas de biopsia de pele dos cães foram realizadas e cada amostra foi identificada de forma precisa e devidamente transportada para o laboratório, onde foram processadas em blocos de parafinas e armazenadas em freezer (-20°C) até o processamento.

Figura 5 - Fluxograma de coleta e diagnóstico em cães com leishmaniose visceral



Fonte: Autor (2021).

4.4 DIAGNÓSTICO

Foram coletados biópsia de lesão cutânea para realização de testes parasitológico e histopatológico de pele na região do cotovelo de cada animal prospectivamente, assim como, testes sorológicos também foram realizados na rotina clínica do hospital veterinário, como TR DPP e ELISA, teste molecular para a identificação da espécie de *Leishmania* e testes imunohistoquímico para determinar a presença de dos marcadores HIF-1 α e VEGF.

4.4.1 Dual Path Platform - DPP

O TR DPP (Dual Path Platform) Leishmaniose Visceral Canina é um teste de triagem imunocromotográfico de uso único para detecção, em cães, de anticorpos específicos para *Leishmania*, em soro, plasma ou sangue total venoso. O TR DPP foi realizado em amostra de sangue dos 20 cães do estudo, oferecendo o resultado em cerca de 15 minutos. Todos foram positivos.

O Ministério da Saúde (MS) recomenda para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), dois testes sorológicos (TR-DPP – teste de triagem e ELISA – teste confirmatório). Considera-se o animal infectado quando os dois exames são reagentes.

4.4.2 Diagnóstico Parasitológico

A visualização de formas amastigotas de *Leishmania* sp. pela análise microscópica de aspirado de linfonodos, medula óssea ou baço é o teste confirmatório para a LV (Ministério da Saúde, 2006b). Foi realizado o teste parasitológico em aspirado de linfonodo, medula óssea e tecido cutâneo das lesões dos cães, foi usada a técnica da coloração panótica. O teste parasitológico da lesão cutânea foi realizado através de raspado/imprint e corado pelo método Panótico Rápido (Webinar Panótico® Laborclin), seguindo o protocolo do fabricante.

4.4.3 Diagnóstico Histopatológico

Para o diagnóstico histopatológico, os cortes histológicos foram corados com HE seguindo os procedimentos histológicos padrões: desparafinização em xilol, seguida por três soluções sequenciais de álcool absoluto finalizando com 6 mergulhos com água corrente. Para a coloração de núcleo as lâminas permaneceram em um corante básico de hematoxilina por 4 a 6 minutos e foram lavadas em água corrente (6 mergulhos). Em seguida as lâminas foram mergulhadas rapidamente em álcool 70%, lavadas com água corrente por 10 minuto e submetidas a 6 mergulhos em álcool a 80%. Para coloração de citoplasma as lâminas permaneceram por 30 segundos em um corante ácido denominado Eosina. Em seguida o tecido foi desidratado em álcool a 95% (6 mergulhos) e álcool absoluto I e II (6 mergulhos em cada) e clarificados em xilol I, II e III (6 mergulhos em cada) finalizando com as montagens das lâminas.

4.4.4 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - ELISA

O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*.

Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controle do teste e das amostras) são adicionados posteriormente. Os anticorpos específicos no soro vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado reagente é aquele que apresente o valor da densidade ótica igual ou superior a três desvios-padrão do ponto de corte (Cut-Off) do resultado do controle negativo (Ministério da Saúde, 2006b).

4.4.5 Identificação de Espécies de *Leishmania*

Os espécimes foram obtidos por meio de procedimento usando *punch* de 5mm, e imediatamente submetidas à fixação em formalina tamponada por no mínimo 24 horas. Em seguida estas amostras foram desidratadas em gradiente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, conforme procedimento padrão. As amostras foram processadas, sendo realizados cinco cortes histológicos de 3µm de espessura utilizando-se micrótomo (Leica Microsystems RM 2025). Os cortes histológicos foram coletados com auxílio de pinças estéreis e transferidos diretamente para microtubos de 1,5 mL, previamente identificados.

A desparafinização das amostras de biopsia foi realizada através do aquecimento dos cortes em lâminas sobrepostas em agitador magnético com aquecimento para o derretimento da parafina. O tecido de pele foi cuidadosamente transferido para um microtubo de 1,5mL e adicionado 20 µL de solução de proteinase K, sendo as amostras incubadas em banho-seco a 56°C por 1h, seguida de incubação de 200 µL de tampão de lise a 90°C por mais 1h.

Extração de DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo da Pomega ReliaPrep™ DNA Miniprep System de acordo com o fabricante, com algumas modificações.

Após o período de incubação os tubos contendo 200µL da solução de lise Cell Lysis Buffer (CLD) e 20µL de proteinase K (PK) foram homogeneizados durante 10 segundos. Foi adicionado Binding Buffer (BBA). As amostras foram transferidas para colunas de purificação

acopladas a tubos de coleta e submetidas à centrifugação a 13.000 rpm por 1 min. Os resíduos resultantes foram descartados, sendo em seguida adicionados 500 µL de Column Wash Solution (CWD) às colunas, que foram novamente centrifugadas a 13.000 rpm por 1 min. Nesta etapa, os resíduos foram descartados e realizada a adição de 500 µL de Column Wash Solution (CWD) às colunas, que foram homogeneizadas e submetidas à nova centrifugação. Após o descarte dos resíduos, as colunas foram transferidas para novos microtubos de 1,5mL, adicionadas de 50 µL de água livre de nucleases e, após cinco minutos de incubação, centrifugadas a 13.000 rpm por cinco minutos. O DNA extraído foi identificado com data do processamento e o código da extração, sendo mantidos a -20°C.

Reação em Cadeia de Polimerase - PCR

Após a extração, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação por PCR utilizando a plataforma Biorad™. A PCR foi realizada com o kit da Qiagen Top Taq Master Mix Kit de acordo com o protocolo do fabricante. A amplificação do DNA da região espaçador interno transcrito 1 (ITS-1) foi realizada com os primers LITSR (5'-CTGGATCATTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCCACTT-3') (Schönian et al., 2011). As reações foram realizadas num volume final de 25µL, sendo 5µL de amostra de DNA e 5µL de coral load, 13 µL do reagente Universal Master mix (Qiagen, USA), 1 µL de cada um dos iniciadores LITSR e L5.8S. A amplificação ocorreu utilizando o seguinte protocolo: desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, e desnaturação de 95°C por 40 segundos; anelamento de 53°C por 45 segundos; extensão de 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 6 minutos. Dois controles positivos foram usados com cepa de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* e, para controle negativo, foram usados apenas reagentes da PCR, sem a adição de DNA.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizado em espectrofotômetro e digitalizado através do software L.PIX Locus Biothecnology (Thermofisher – USA), usando um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.4.6 Imunohistoquímica para os marcadores HIF-1α e VEGF

As amostras submetidas à imunohistoquímica (IMQ), inicialmente foram submetidas a desparafinizações com xilol I II e III, cinco minutos cada. Seguido da hidratação com álcool decrescente absoluto à 70%, cinco minutos cada e lavado três vezes com água destilada. Para recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato a 10mµ, pH 6, três ciclos de três minutos cada

em microondas com potência baixa. Seguida de três lavagens de 5 minutos em PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20. Bloqueio de sítios inespecíficos foi executado por meio do Serum Blocking Solution do kit Histostain® - SP, Broad Spectrum (HRP); incubado durante 30" em câmara úmida. Os anticorpos primários (VEGF/HIF-1 α) anti-VEGF policlonal de coelho (EUA) / anti-HIF-1 α policlonal de coelho (EUA), foram diluídos em 1:400 em solução tamponada de PBS-BSA 1% em câmara úmida por 14 – 16 horas (overnight) a 4°C. Seguida de três lavagens com PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20. O consumo de peroxidase endógena foi realizado por meio da incubação com H₂O₂ 5% em metanol por 45". Seguida de três lavagens com PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20. Após esta etapa, as lâminas de tegumento foram incubadas com anticorpo secundário (kit Histostain® - SP, Broad Spectrum - HRP, Invitrogen) por 30 minutos, seguido do HRP – Streptavidin por 30 minutos. Seguida de três lavagens com PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20. A reação foi revelada com cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 15 minutos no escuro e contra corados pela hematoxilina de Harris (HE) dois minutos. Em seguida as lâminas foram desidratadas com álcool crescente 70% á absoluto, cinco minutos cada. Seguida da diafanização em xilol I e II durante cinco minutos cada. E por fim a montagem e as lâminas foram analisadas em microscópio óptico, utilizando-se a objetiva de 40x.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas foram apresentadas por meio de frequências relativas e absolutas. A idade foi apresentada pela média e desvio padrão e as demais variáveis contínuas foram apresentados como mediana e quartis. A associação entre a intensidade da inflamação e a caracterização celular foi realizada através do teste de Qui quadrado para tendência linear. A associação entre as variáveis ordinais foi avaliada através do teste não-paramétrico de correlação de Spearman com a seguinte interpretação: 0-0,19 correlação desprezível; 0,20-0,39 fraca; 0,40-0,59 moderada; 0,60-0,79 substancial; e 0,80- 1,00 muito forte. Para comparações entre subgrupos dicotômicos de variáveis ordinais, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Todos os testes foram bicaudados e os valores finais de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram conduzidas em linguagem R (R Core Team, 2021).

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de ética em Uso de Animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o protocolo (1983220520) em anexo, seguido

as resoluções normativas da CONCEA e Diretriz Brasileira para o cuidado e utilização de animais em atividade de ensino e de pesquisa (DBCA). Os proprietários dos animais foram convidados a participar da pesquisa e, após o aceite, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, autorizando a utilização do material coletado para fins científicos.

5 ANÁLISE DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1 – ALPHA EM LESÕES DE LEISHMANIOSE CANINA

Introdução

Leishmaniose visceral canina (LVC) são doenças emergentes com alta prevalência nos países latino-americanos, causadas principalmente pela *Leishmania (L.) infantum*. A LVC tem um grande impacto na saúde pública brasileira visto que, os cães domésticos são os reservatórios peri-domiciliares de LV mais importantes nas áreas urbanas e periurbanas (Reis et al., 2009).

LVC apresenta uma grande diversidade de manifestações clínicas, que vão desde sinais clínicos, alterações bioquímicas / hematológicas e histológicas até alterações histopatológicas. A carga parasitária varia em diferentes cães infectados e de acordo com órgãos-alvo, como pele, medula óssea, baço, fígado e gânglios linfáticos. Além disso, a presença de sinais como alopecia, dermatite, onicogribose, perda de peso e esplenomegalia ocorrem em pelo menos 50% dos cães infectados (Giunchetti et al., 2019).

A hipóxia é uma característica comum em tecidos lesados e infectados. O fator induzível por hipóxia 1α (HIF- 1α) medeia respostas celulares à hipóxia como também o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Araújo et al., 2012). O VEGF é uma citocina passível de ser induzida por hipóxia, cujos mecanismos patogênicos ainda não estão esclarecidos.

Existem evidências que também algumas formas de *Leishmania* spp., como a *L. donovani*, pode ser capaz de ativar o fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1) que regula a ação do VEGF no intuito de auxiliar sua adesão e sobrevivência em macrófagos (Singh et al., 2012).

O efeito do HIF- 1α em fagócitos mononucleares na leishmaniose pode apresentar-se como fator protetor na leishmaniose cutânea, enquanto na leishmaniose visceral, como fator prejudicial (Schatz, Neubert, Rieger, Jantsch, 2018).

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi caracterizar *in situ* os marcadores da inflamação fator induzido por hipóxia alfa (HIF- 1α) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), para fins de esclarecimento da patogênese e construção de alternativas no diagnóstico canina, através da técnica de imunohistoquímica.

Resultados

A descrição do perfil epidemiológico mostrou que 10 (62%) cães eram do sexo masculino, seis (38%) do sexo feminino e quatro não tiveram sexo identificado. Todos os cães eram sem raça definida, com média de 7 anos de idade, variando entre 3 e 9 anos. Quanto as análises qualitativas, podem ser demonstradas da seguinte forma: presença de alopecia, onicogribose, dermatite descamativa generalizada e ulcerativa local, descamação local ou generalizada (Tabela 1). A partir desses achados, seis cães foram classificados como assintomático, nove como oligossintomático e cinco classificados como polissintomático. A avaliação clínica revelou que a maioria dos cães tinham dermatites, lesões ulcerativas. Outros aspectos clínicos foram observados, como linfadenomegalia, anaplasma, erliquiose, dirofilariose em alguns cães.

O diagnóstico de LVC foi previamente confirmado pelos testes parasitológicos e sorológicos. No entanto, a PCR utilizando biopsias de lesões cutâneas não foi capaz de detectar o DNA de *Leishmania* spp.

A avaliação histopatológica dos tecidos de cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp. consistiu em dermatite ulcerativa crônica grave associada a estruturas parasitárias intralesionais consistentes com *Leishmania* amastigotas (Figura 2).

Na análise histológica foi constatado que 6 (30%) das lesões apresentaram forte intensidade (>50%) da dermatite papilar. E 5 (25%) das lesões apresentaram forte intensidade (>50%) na dermatite reticular. Com relação a proliferação vascular papilar, 2 (10%) apresentaram forte intensidade (>50%). E 10 (50%) apresentaram forte intensidade (>50%) da proliferação vascular reticular.

Na análise imunohistoquímica os níveis de intensidade dos marcadores HIF-1 α e VEGF, os resultados mostraram que a maioria das lesões apresentaram forte intensidade (>50% campo) 10 (56%) para HIF-1 α e 10 (50%) para VEGF (Figura 3 e 4). Enquanto 2 (11%) apresentaram intensidade leve (<25% campo) para HIF-1 α e 2 (10%) apresentaram intensidade moderada (25-50% campo) para VEGF (Tabela 2). O perfil de leucócitos (macrófagos p=0,001; linfócitos p=0,009; plasmócitos p=0,002; polimorfonucleares p=0,020; e eosinófilos p=0,001) foi significativamente associado a inflamação dermatite (Tabela 3).

A análise de Spearman demonstrou que quanto maior a carga parasitaria maior a intensidade da inflamação papilar (p<0,001) (Gráfico 1) e inflamação reticular (p<0,001) (Gráfico 2). Não houve associação entre os marcadores HIF-1 α e VEGF com a dermatite, e

entre VEGF com proliferação vascular, assim como também entre HIF-1 α e VEGF e a carga parasitária. Não houve correlação entre os marcadores HIF-1 α e VEGF (Gráfico 3).

Discussão

Neste estudo, exame parasitológico direto revelou a presença de *Leishmania* sp. em cães clinicamente com pele saudáveis, bem como na pele lesional, independentemente do status da clínica, sugerindo que a migração de parasitas da pele para as vísceras (Queiroz et al., 2011). Não foi detectado DNA de *Leishmania* em nenhuma das lesões cutâneas. Isso pode ter ocorrido devido à escassez de material biológico nos blocos de lesão parafinados utilizando 3 μ m de espessura. Causas não naturais de variabilidade como: mão de obra, método de trabalho e meios de medição do material genético são fatores que podem interferir na qualidade e quantificação do DNA extraído do material biológico em blocos de parafina (Scorsato; Telles, 2011).

Detectamos seis cães assintomático, nove oligossintomático e cinco polissintomático, sendo deste último, três destes apresentaram leve a intensa reação inflamatória com uma carga de amastigota de *Leishmania* em numerosas células mononucleares na derme, particularmente macrófagos, indicando que a carga parasitária pode estar associada com a intensidade de inflamação. Entre os assintomáticos e os oligossintomáticos observamos que reação inflamatória e a carga parasitária variou de leve a intensa. A alta carga parasitária se relaciona com a imunossupressão mediada por linfócitos, a apesar de a presença ou ausência de sintomas não depender da carga parasitária (Catuongo et al., 2020). De acordo com Chagas (2019) o tecido cutâneo apresenta a correlação mais forte com o escore clínico em comparação aos demais tecidos, sendo o mais indicado para o diagnóstico e monitoramento da infecção por *Leishmania infantum* em animais sem manifestações clínicas ou com diferentes graus de severidade da doença.

O granuloma de macrófago intacto sem necrose, lise de macrófago com necrose e ativação de macrófago com formação de granuloma são respostas do hospedeiro contra *Leishmania*. Apesar da leishmaniose ser considerada infecções granulomatosas (Giorgio et al., 2020), nenhum granuloma induzido durante a leishmaniose foi observado nas lesões.

Neste estudo, demonstramos que o HIF-1 α está presente nas lesões cutâneas de *Leishmania* ricas em macrófagos, corroborando com o estudo de Fraga et al. (2012). Assim como o VEGF também foi comumente encontrado em lesões cutâneas de cães. Estudos exibiram quantidades substanciais de HIF-1 α e VEGF em lesões cutâneas agudas em humanos infectados com *Leishmania* sp. e camundongos infectados com *L. major* (Weinkopff et al.

2019). A infecção de macrófagos por *L. donovani* ou *L. amazonensis* tem resultado no acúmulo de HIF-1 α (Singh et al., 2012). Na análise de Spearman, não houve correlação entre HIF-1 α e VEGF, assim como, entre a carga parasitária, proliferação vascular e a dermatite. Em contrapartida, em outro estudo houve correlação do HIF-1 α entre VEGF e outras proteínas (Fraga et al., 2012).

Os macrófagos e eosinófilos são os tipos de células predominante que expressa HIF-1 α e VEGF durante a infecção por *Leishmania*, conforme já foi relatado (Weinkopff et al. 2019). A expressão de HIF-1 α em fagócitos mononucleares favorece o desenvolvimento de leishmaniose visceral no baço e medula óssea (Schatz et al., 2016). Os macrófagos desempenham um papel duplo na infecção, uma vez que não servem apenas como hospedeiros permissivos, mas também como células efectoras anti- *Leishmania* (Volpedo et al., 2021).

Os monócitos, junto com os neutrófilos, são as primeiras populações de células imunes a serem recrutadas após a infecção de *Leishmania* (Volpedo et al., 2021). Granulócitos polimorfonucleares são rapidamente atraídos para o local da infecção, desempenhando um papel bastante prejudicial na leishmaniose tegumentar (Schatz et al., 2016).

O papel da resposta imune da progressão da leishmaniose visceral e cargas parasitárias representa uma abordagem importante para a compreensão da imunopatologia na LVC. Cães com formas clínicas graves de LVC e alta densidade parasitária apresentaram aumento do infiltrado inflamatório na pele, composto principalmente por células mononucleares (Giunchetti et al., 2019). O aumento da gravidade da LVC foi associado a altas cargas parasitárias.

Conclusões

A maioria dos cães foram classificados como oligossomáticos apresentando como principais sintomas, alopecia, onicogrifose, dermatite descamativa generalizada e ulcerativa local, descamação local ou generalizada. As lesões apresentaram fortes níveis de intensidade dos marcadores HIF-1 α e VEGF. Os leucócitos foram significativamente associados a inflamação da dermatite. Este estudo revela que a dermatite do tipo não granulomatosa de cães favorece a manutenção do parasito em cargas elevadas na derme, o que poderia facilitar a sua disseminação pelas vísceras. A dermatite está clinicamente associada a presença de diferentes leucócitos. Este é o primeiro estudo envolvendo os marcadores HIF-1 α e VEGF em cães com leishmaniose visceral. A participação destes marcadores pode estar envolvida no controle ou na manutenção do parasito no cão, isso pode ser contextualizado com estudos futuros. O estudo

morfológico das células e de suas citocinas produzidas no processo inflamatório sugere que eles podem ou não participar do controle do agente infeccioso. O método molecular para detecção de DNA de *Leishmania* a partir de biopsia parafinada das lesões cutâneas não foi capaz de amplificar nas amostras positivas confirmadas pelo parasitológico, apresentando limitações quanto à espessura dos cortes dos blocos de biopsia. Recomenda-se que a PCR seja realizada em biopsias de lesões em blocos parafinados utilizando-se a espessura micrótomo $\geq 10\mu\text{m}$.

Métodos

Amostras

Vinte cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. foram obtidos no Departamento de Parasitologia do hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) resgatados dos municípios de Recife e Petrolina, Pernambuco, Brasil. Uma amostra de biopsia de pele para cada animal foi coletada no período de 2020 e 2021.

As biopsias de lesões de cutâneas da região de cotovelo para investigação histopatológica e identificação molecular da espécie parasitária, esses materiais foram coletados no ambulatório do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV-UFRPE) e Centro de Vigilância Ambiental (CVA) de Petrolina.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética em Uso de Animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o protocolo (1983220520). Os proprietários dos animais foram convidados a participar da pesquisa e, após o aceite, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, autorizando a utilização do material coletado para fins científicos.

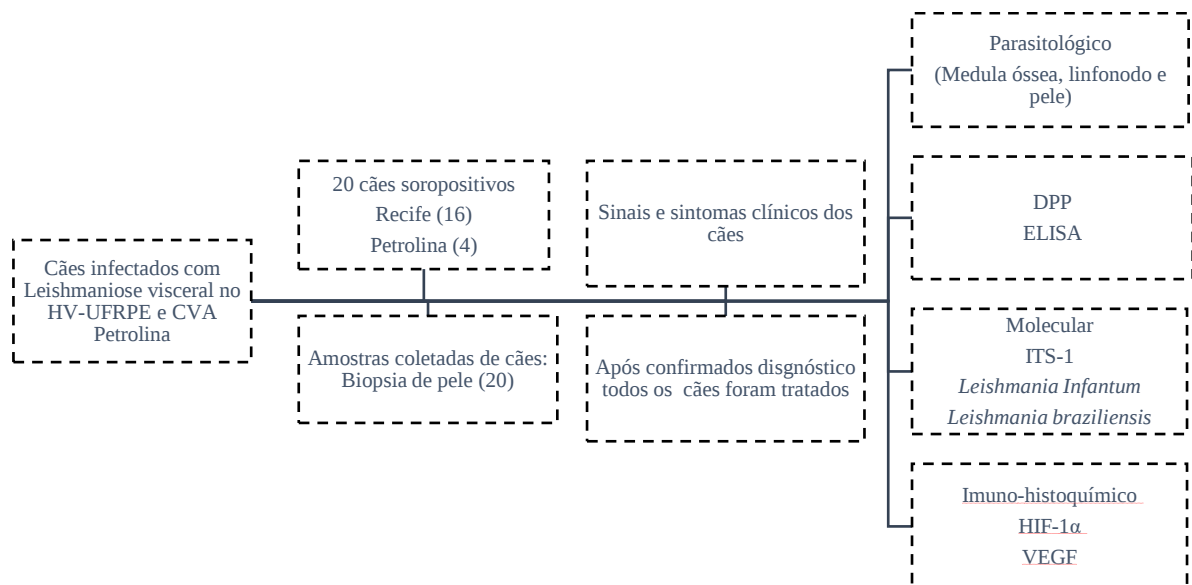
A coleta de biopsia das lesões foi realizada em total de 20 amostras de 20 cães com diagnóstico parasitológico de leishmaniose confirmado, sendo 16 cães coletados do município de Recife e quatro do município de Petrolina. Todas as biopsias foram coletadas de lesão em cotovelos dos cães estudados.

Para cada animal, o estado clínico foi avaliado e os achados foram registrados em formulário específico, antes da coleta das amostras. Os seguintes sinais / sintomas foram investigados: perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, dermatite ulcerativa / seborreica, alopecia generalizada ou localizada, onicogribose. A partir desses achados, cada animal foi classificado como assintomático (sem sinais / sintomas sugestivos de CVL),

oligossintomático (um a três sinais clínicos, por exemplo, cães com adenopatia linfóide, perda de peso e cabelo opaco) e polissintomático (mais de três sinais / sintomas).

Após avaliação clínica, as coletas de biópsia de pele dos cães foram realizadas e cada amostra foi identificada de forma precisa e devidamente transportada para o laboratório, onde foram processadas em blocos de parafinas e armazenadas em freezer (-20°C) até o processamento, conforme visualizados no fluxograma (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma de coleta e diagnóstico em cães com leishmaniose visceral.



Fonte: Autor (2021).

Parasitológico e sorológico

Todos os cães do estudo foram previamente positivos pelo método parasitológico (aspirado de linfonodo, medula óssea e pele), pelo método sorológico através de imunoensaio cromatográfico Dual Path Platform (DPP®) e pelo método de ELISA, realizados através da triagem na rotina clínica do hospital veterinário.

Foram coletados biópsia de lesão cutânea para realização de testes parasitológicos de pele na região do cotovelo de cada animal prospectivamente. O teste parasitológico da lesão cutânea foi realizado método Panótico Rápido (Webinar Panótico® Laborlinc), seguindo o protocolo do fabricante.

Para o diagnóstico histopatológico, os cortes histológicos foram corados com HE seguindo os procedimentos histológicos padrões.

Procedimentos

Os espécimes foram obtidos por meio de procedimento usando *punch* de 5mm, e imediatamente submetidas à fixação em formalina tamponada por no mínimo 24 horas. Em seguida estas amostras foram desidratadas em gradiente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, conforme procedimento padrão. As amostras foram processadas, sendo realizados cinco cortes histológicos de 3µm de espessura utilizando-se micrótomo (Leica Microsystems RM 2025). Os cortes histológicos foram coletados com auxílio de pinças estéreis e transferidos diretamente para microtubos de 1,5 mL, previamente identificados.

Imunohistoquímica

As biópsias de lesão cutânea da região do cotovelo de cada animal foram submetidas à imunohistoquímica (IMQ), inicialmente foram submetidas a desparafinizações com Xilol I II e III, cinco minutos cada. Seguido da hidratação com álcool decrescente absoluto á 70%, cinco minutos cada e lavado três vezes com água destilada. Para recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato a 10mµ, pH 6, três ciclos de três minutos cada em microondas com potência baixa. Seguida de três lavagens de 5 minutos em PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20. Bloqueio de sítios inespecíficos foi executado por meio do Serum Blocking Soluction do kit Histostain® - SP, Broad Spectrum (HRP); incubado durante 30” em câmara úmida. Os anticorpos primários (VEGF/HIF-1α) foram diluídos em 1:400 em solução tamponada de PBS-BSA 1% em câmara úmida por 14 – 16 horas (overnight) a 4°C. Seguida de três lavagens com PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20. O consumo de peroxidase endógena foi realizado por meio da incubação com H2O2 5% em metanol por 45”. Seguida de três lavagens com PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20. Após esta etapa, as lâminas de tegumento foram incubadas com anticorpo secundário (kit Histostain® - SP, Broad Spectrum - HRP, Invitrogen) por 30 minutos, seguido do HRP – Streptavidin por 30 minutos. Seguida de três lavagens com PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20. A reação foi revelada com cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 15 minutos no escuro e contra corados pela hematoxilina de Harris (HE) dois minutos. Em seguida as lâminas foram desidratadas com álcool crescente 70% á absoluto, cinco minutos cada. Seguida da diafanização em xilol I e II durante cinco minutos cada. E por fim a montagem e as lâminas foram analisadas em microscópio óptico, utilizando-se a objetiva de 40x.

Reação em Cadeia de Polimerase – PCR

A desparafinização das amostras de biópsia foi realizada através do aquecimento dos cortes em lâminas sobrepostas em agitador magnético com aquecimento para o derretimento da parafina. O tecido de pele foi cuidadosamente transferido para um microtubo de 1,5mL e

adicionado 20 µL de solução de proteinase K, sendo as amostras incubadas em banho-seco a 56°C por 1h, seguida de incubação de 200 µL de tampão de lise a 90°C por mais 1h.

O DNA foi extraído seguindo o protocolo da Promega ReliaPrep™ DNA Miniprep System de acordo com o fabricante, com algumas modificações. Após a extração, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação por PCR utilizando a plataforma Biorad™. A PCR foi realizada com o kit da Qiagen Top Taq Master Mix Kit de acordo com o protocolo do fabricante. A amplificação do DNA da região espaçador interno transcrito 1 (ITS-1) foi realizada com os primers LITSR (5'-CTGGATCATTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCCACTT-3') (Schönian et al., 2011). As reações foram realizadas num volume final de 25µL, sendo 5µL de amostra de DNA e 5µL de coral load, 13 µL do reagente Universal Master mix (Qiagen, USA), 1 µL de cada um dos iniciadores LITSR e L5.8S. A amplificação ocorreu utilizando o seguinte protocolo: desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, e desnaturação de 95°C por 40 segundos; anelamento de 53°C por 45 segundos; extensão de 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 6 minutos. Dois controles positivos foram usados com cepa de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* e, para controle negativo, foram usados apenas reagentes da PCR, sem a adição de DNA.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizado em espectrofotômetro e digitalizado através do software L.PIX Locus Biothecnology (Thermofisher – USA), usando um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

Análises estatísticas

As variáveis categóricas foram apresentadas por meio de frequências relativas e absolutas. A idade foi apresentada pela média e desvio padrão e as demais variáveis contínuas foram apresentados como mediana e quartis. A associação entre a intensidade da inflamação e a caracterização celular foi realizada através do teste de Qui quadrado para tendência linear. A associação entre as variáveis ordinais foi avaliada através do teste não-paramétrico de correlação de Spearman com a seguinte interpretação: 0-0,19 correlação desprezível; 0,20-0,39 fraca; 0,40-0,59 moderada; 0,60-0,79 substancial; e 0,80- 1,00 muito forte. Para comparações entre subgrupos dicotômicos de variáveis ordinais, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Todos os testes foram bicaudados e os valores finais de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram conduzidas em linguagem R (R Core Team, 2021).

Lista de abreviaturas

HIF-1 α - Fator Induzível por Hipóxia 1 α

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

LV – Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

HV-UFRPE – Hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco

CVA – Centro de Vigilância Ambiental

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DPP - Dual Path Platform

ELISA – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

ITS-1 - Espaçador Interno Transcrito 1

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

Declarações**Aprovação ética e consentimento para participar**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o protocolo (1983220520). O consentimento dos proprietários dos animais foi obtido, após aceitação, com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, autorizando a utilização do material e dados clínicos coletados para fins científicos.

Consentimento para publicação

Não se aplica

Disponibilidade de dados e materiais

Conjuntos de dados gerados durante e / ou analisados durante o estudo atual estão disponíveis junto ao autor correspondente, mediante solicitação.

Conflito de interesse

Os autores declaram nenhum tipo de conflito de interesse.

Contribuições dos autores

ESL Desenvolveu concepção e desenho experimental, **CRPS e SG** analisou os dados. **LMB, YCVA e JMF** realizaram experimentos e interpretaram dados, **JPM, LCA e FJSR** conceberam e projetaram pesquisas. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães –IAM FIOCRUZ pela realização dos testes moleculares. E a Universidade Federal Rural de Pernambuco –UFRPE pelo material da análise de imunohistoquímica.

Limitações do estudo

As limitações deste estudo incluem o número limitado de cães, a falta de informação sobre o tempo de evolução da lesão.

Referências

1. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Mar 15;128(1-3):87-95.
2. Giunchetti RC, Silveira P, Resende LA, Leite JC, Melo-Júnior OAO, Rodrigues-Alves ML, et al.. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Vet Parasitol*. 2019 Jul;271:87-97.
3. Araújo AP, Arrais-Silva WW, Giorgio S. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: a potential model for chronic hypoxia. *Acta Histochem*. 2012 Dec;114(8):797-804.
4. Singh AK, Mukhopadhyay C, Biswas S, Singh VK, Mukhopadhyay CK. Intracellular pathogen *Leishmania donovani* activates hypoxia-inducible factor-1 by dual mechanism for survival advantage within macrophage. *PLoS One*. 2012;7(6):e38489.

5. Schatz V, Neubert P, Rieger F, Jantsch J. Hypoxia, Hypoxia-Inducible Factor-1 α , and Innate Antileishmanial Immune Responses. *Front Immunol.* 2018 Feb 22;9:216.
6. Queiroz NMGP, da Silveira RCV, de Noronha Jr ACF, Oliveira TMFS, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Detection of *Leishmania* (L.) *chagasi* in canine skin. *Veterinary Parasitology.* 2011, 178;1-8.
7. Scorsato AP, Jeq Telles. Factors that interfere with the quality of DNA extracted from biological samples stored in paraffin blocks. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2011, 47 (5), 541-548.
8. Catuongo MS, Burna AN, Brunel AF, Díaz B, Negrette SM. Relationship between parasitic load and Th1 lymphocytes in dog skin biopsies with leishmaniasis. *Rev vet,* 2020, 31 (1), 3-7.
9. Chagas UMR, Evaluation of parasitic load in dogs, naturally infected by *Leishmania infantum*, for the improvement of molecular diagnosis and monitoring of infection / Ursula Maira Russo Chagas - Dissertation (master' s) - Belo Horizonte, 2019.
10. Giorgio S, Gallo-Francisco PH, Roque GAS, Flóro E Silva M. Granulomas in parasitic diseases: the good and the bad. *Parasitol Res.* 2020 Oct;119(10):3165-3180.
11. Fraga CAC, Oliveira MVM, Alves LR, Viana AG, Souza AA, Carvalho SFG, De Paula AMB, Botelho ACC, Guimarães ALS. Immunohistochemical profile of HIF-1 α , VEGF-A, VEGFR2 and MMP9 proteins in tegumentary leishmaniasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2012;87,5, 709-713.
12. Weinkopff T, Roys H, Bowlin A, Scott P. *Leishmania* Infection Induces Macrophage Vascular Endothelial Growth Factor A Production in an ARNT/HIF-Dependent Manner. *Infect Immun.* 2019 Oct 18;87(11):e00088-19.
13. Schatz V, Strüßmann Y, Mahnke A, Schley G, Waldner M, Ritter U, Wild J, Willam C, Dehne N, Brüne B, McNiff JM, Colegio OR, Bogdan C, Jantsch J. Myeloid Cell-Derived HIF-1 α Promotes Control of *Leishmania major*. *J Immunol.* 2016 Nov 15;197(10):4034-4041.
14. Volpedo G, Pacheco-Fernandez T, Bhattacharya P, Oljuskina T, Dey R, Gannavaram S, Satoskar AR, Nakhasi HL. Determinants of Innate Immunity in Visceral Leishmaniasis and Their Implication in Vaccine Development. *Front Immunol.* 2021 Oct 12;12:748325.

15. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL et al. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. *Parasitology*, 2011; 138(4):405-425.

Tabela 1 - Características biológicas e laboratoriais de cães do município de Recife e Petrolina entre 2020 e 2021

Id	Sexo	Idade	Raça	Peso (Kg)	Descrição Dermatológica	Inflamação (HE)	Proliferação vascular	G R A	M A C	L I N F	P L A S	P M N	E O S	AMA (HE)	Parasitológico de pele	Sorológico	HIF-1 α	VEGF
R01	F	SI	SRD	SI	-	3+ DP/2+DR	Neg	Neg	1+	1+	1+	1+	1+	3+DP/2+DR	+	+	Neg	3+DR
R02	M	SI	SRD	SI	-	2+DR	2+(DR)	Neg	1+		1+		1+	1+	+	+	Neg	3+DR
R03	M	6 anos	SRD	10,4	Alopecia abdominal, onicogribose, dermatite descamativa generalizada e ulcerativa local (orelha)	1+DP/3+DR	1+DR	Neg	1+		1+	1+	1+	1+DP/3+DR	+	+	3+(vaso)	2+DR
R04	M	SI	SRD	SI	-	1+DR	1+DR	Neg	1+	1+	1+			1+DR	+	+	1+DR	Neg
R05	F	3 anos	SRD	19	Onicogribose e Linfadenomegalia generalizada	1+DR	Neg	Neg	1+			1+		Neg	+	+	3+DR	Neg
R06	F	SI	SRD	SI	-	1+DP/1+DR	3+ DR	Neg	1+	1+		1+		3+DP/1+DR	+	+	Neg	3+DP/DR
R07	M	8 anos	SRD	14,2	Alopecia generalizada, onicogribose, paroniquia presente, úlcera local (ponta da orelha)	3+DR	3+ DR	Neg	1+	1+	1+	1+	1+	3+DR	+	+	3+DP/DR(diss em)	Neg
R08	F	SI	SRD		-	3+DP/3+DR	3+ DR	Neg	1+	1+	1+	1+	1+	3+DP/DR	+	+	Neg	3+DP/DR
R09	M	9 anos	SRD	14	Alopecia local, úlcera dorso	3+DP/2+DR	3+ DR	Neg	1+	1+	1+	1+	1+	3+DP/2+DR	+	+	3+DP/2+DR	3+DP/1+DR
R10	F	SI	SRD		-	3+DP	1+DR	Neg	1+	1+			1+	3+DP	+	+	Sem lam 1+DR (vaso)	2+DP
R11	M	5 anos	SRD	15,3	Descamação generalizada, Dermatite descamativa e Onicogribose (SNAP, 4DX, anaplasma, Erliquiose, dirofilariose)	1+DR	1+DR	Neg	1+		-	1+	-	2+DR	+	+		3+DR
R12	M	SI	SRD	31,7	Descamação local (orelha)	3+DP/2+DR	1+DR	Neg	1+	1+	1+	1+	1+	3+DP/2+DR	+	+	3+DP/3+DR	3+DP/DR
R13	F	5 anos	SRD	17,4	Onicogribose, úlcera localizada (orelha)	3+DR	3+DR	Neg	1+	1+	1+	1+	1+	3+DR	+	+	3+DP(foco)	1+DP
R14	M	9 anos	SRD	SI	Alopecia generalizada, onicogribose, dermatite descamativa e ulcerativa e generalizada	2+DP	2+DR	Neg	1+	1+	1+	1+	-	Neg	+	+	3+DP (2 focos)	Neg

R15	M	8 anos	SRD	SI	Lesão Ucerativa, Dermatite descamativa e Onicogribose	3+DP/3+D R	3+DP/DR	Neg	1+	1+	1+	1+	1+	3+DP/DR	+	+	3+DR	3+DP/DR
R16	M	7 anos	SRD	SI	Dermatite descamativa difusa (Linfadenomegalia localizada (poplíteo))	2+DR	3+DR	Neg	1+	1+	1+	1+		2+DP/DR	+	+	Sem lam	Neg
P01	SI	SI	SRD	SI	Dermatite descamativa	Neg	3+DR	Neg	-				-	Neg	+	+	3+DR(vaso)	3+DR(vaso)
P02	SI	SI	SRD	SI	Dermatite descamativa	Neg	3+DP/DR	Neg	-				-	Neg	+	+	3+DP/DR	3+DP/DR
P03	SI	SI	SRD	SI	Lesão Ucerativa e Dermatite descamativa	Neg	2+DR	Neg	-				-	Neg	+	+	Neg	Neg
P04	SI	SI	SRD	SI	Lesão Ucerativa e Dermatite descamativa	1+DR	1+DR		1+	1+	1+	1+	-	Neg	+	+	2+DR	Neg

Id. Identificação; R01 – R16. Identificação de cães de Recife; P01 – P04 Identificação de cães de Petrolina. SI. Sem Identificação; SRD. Sem raça definida; HIF-1 α . Fator induzido por hipóxia 1 – Alpha; VEGF. Fator de crescimento endotelial vascular. HIF-1 α e VEGF: 1+ < 25%/Campo; 2+ > 25% e < 50%/Campo; 3+ > 50%/Campo. DP. Dermatite papilar; DR. Dermatite reticular. GRA. Granuloma; MAC. Macrófagos; LINF. Linfócitos; PLASM. Plasmócitos; PMN. Polimorfonucleares; EOS. Eosinófilos; AMA. Amastigotas. Resultado positivo (+), Resultado negativo (Neg /-).

Fonte: Autor (2021).

Tabela 2 - Descrição das características dos cães e de suas lesões dermatológicas

Variáveis	N = 20
Sexo	-
Masculino	10 (62%)
Feminino	6 (38%)
Idade	6.67 ± 2.06 / 7.00 (5.00-8.00)
Inflamação papilar	0.00 (0.00-3.00)
Ausente	11 (55%)
<25% / campo	2 (10%)
25-50% / campo	1 (5.0%)
>50% / campo	6 (30%)
Inflamação reticular	1.50 (0.75-2.25)
Ausente	5 (25%)
<25% / campo	5 (25%)
25-50% / campo	5 (25%)
>50% / campo	5 (25%)
Inflamação (3+)	2.00 (1.00-3.00)
Ausente	3 (15%)
<25% / campo	5 (25%)
25-50% / campo	3 (15%)
>50% / campo	9 (45%)
Proliferação vascular papilar	0.00 (0.00-0.00)
Ausente	18 (90%)
>50% / campo	2 (10%)
Proliferação vascular reticular	2.50 (1.00-3.00)
Ausente	2 (10%)
<25% / campo	6 (30%)
25-50% / campo	2 (10%)
>50% / campo	10 (50%)
Proliferação vascular (3+)	2.50 (1.00-3.00)
Ausente	2 (10%)
<25% / campo	6 (30%)
25-50% / campo	2 (10%)
>50% / campo	10 (50%)
Macrófagos	-
Ausente	3 (15%)

Variáveis	N = 20
Presente	17 (85%)
Linfócitos	-
Ausente	7 (35%)
Presente	13 (65%)
Plasmócitos	-
Ausente	7 (35%)
Presente	13 (65%)
Polimorfonucleados	-
Ausente	6 (30%)
Presente	14 (70%)
Eosinófilos	-
Ausente	10 (50%)
Presente	10 (50%)
Amastigota papilar	0.00 (0.00-3.00)
Ausente	11 (55%)
<25% / campo	1 (5.0%)
25-50% / campo	1 (5.0%)
>50% / campo	7 (35%)
Amastigota reticular	1.50 (0.00-2.25)
Ausente	7 (35%)
<25% / campo	3 (15%)
25-50% / campo	5 (25%)
>50% / campo	5 (25%)
Amastigota (3+)	2.50 (0.00-3.00)
Ausente	6 (30%)
<25% / campo	2 (10%)
25-50% / campo	2 (10%)
>50% / campo	10 (50%)
HIF-1α	3.00 (0.25-3.00)
Ausente	5 (28%)
<25% / campo	2 (11%)
25-50% / campo	1 (5.6%)
>50% / campo	10 (56%)
VEGF	2.50 (0.00-3.00)
Ausente	7 (35%)
<25% / campo	1 (5.0%)

25-50% / campo	2 (10%)
>50% / campo	10 (50%)
Dados apresentados como n (%), mediana(p25-p75) ou média $\pm$ desvio padrão	

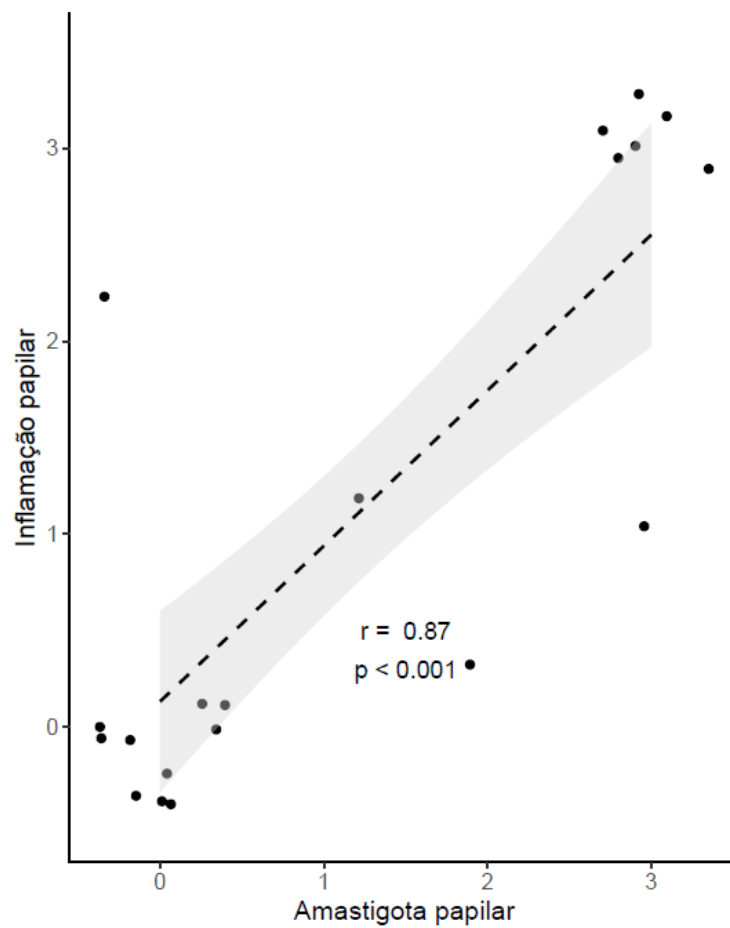
Fonte: Autor (2021).

Tabela 3 – Avaliação do perfil de leucócitos entre categorias de inflamação (3+)

Categorias inflamação (3+)							
Variáveis	0 (N = 3)	1+ (N = 5)	2+ (N = 3)	3+ (N = 9)	P- valor	Mediana (p25-p75)	P- valor
Macrófagos					0.001		0.005
Ausente	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		0.0 (0.0-0.0)	
Presente	0 (0%)	5 (100%)	3 (100%)	9 (100%)		3.0 (1.0-3.0)	
Linfócitos					0.009		0.015
Ausente	3 (100%)	2 (40%)	1 (33%)	1 (11%)		1.0 (0.0-1.5)	
Presente	0 (0%)	3 (60%)	2 (67%)	8 (89%)		3.0 (2.0-3.0)	
Plasmócitos					0.002		0.006
Ausente	3 (100%)	3 (60%)	0 (0%)	1 (11%)		1.0 (0.0-1.0)	
Presente	0 (0%)	2 (40%)	3 (100%)	8 (89%)		3.0 (2.0-3.0)	
Polimorfonucleados					0.020		0.032
Ausente	3 (100%)	1 (20%)	1 (33%)	1 (11%)		0.5 (0.0-1.75)	
Presente	0 (0%)	4 (80%)	2 (67%)	8 (89%)		3.0 (1.25-3.0)	
Eosinófilos					<0.001		<0.001
Ausente	3 (100%)	5 (100%)	2 (67%)	0 (0%)		1.0 (0.25-1.00)	
Presente	0 (0%)	0 (0%)	1 (33%)	9 (100%)		3.0 (3.0-3.0)	
0-ausente, 1+ <25%; 2+ 25-50%; 3+ >50%							

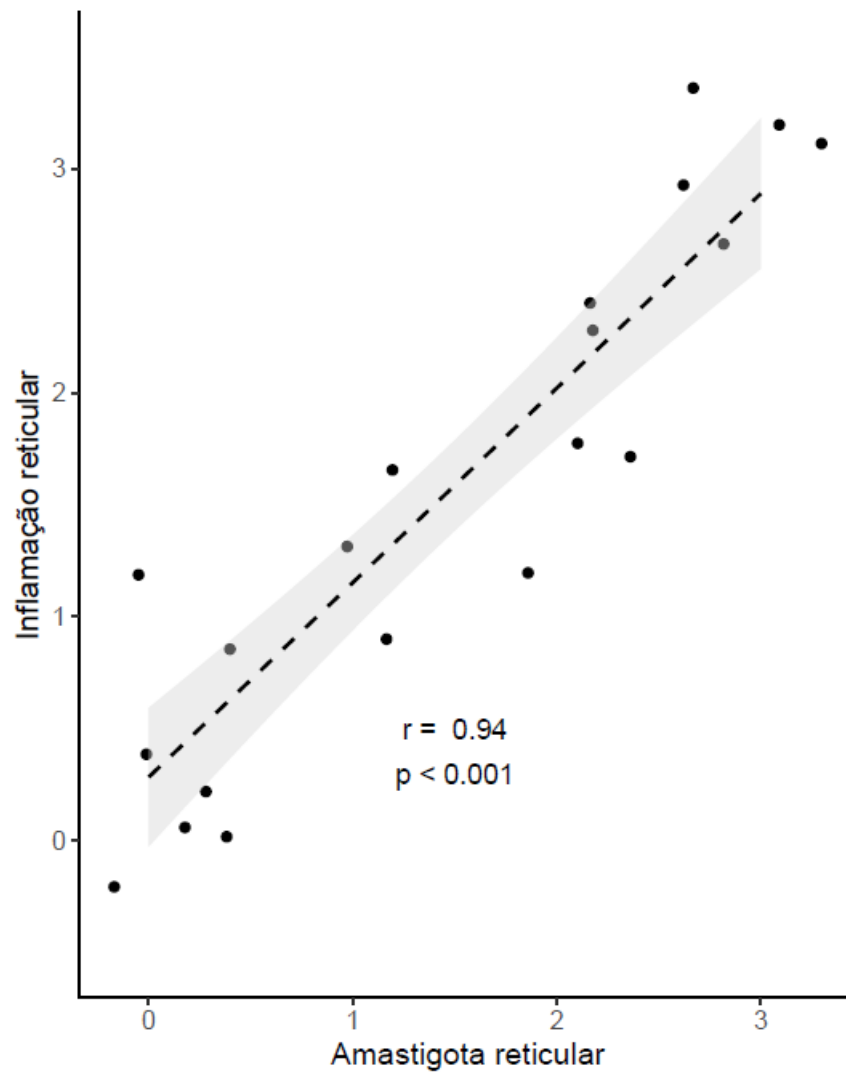
Fonte: Autor (2021).

Gráfico 1 - Análise de correlação de Spearman entre a presença de inflamação papilar e a carga parasitária (amastigotas) na derme papilar de cães leishmaniose visceral.



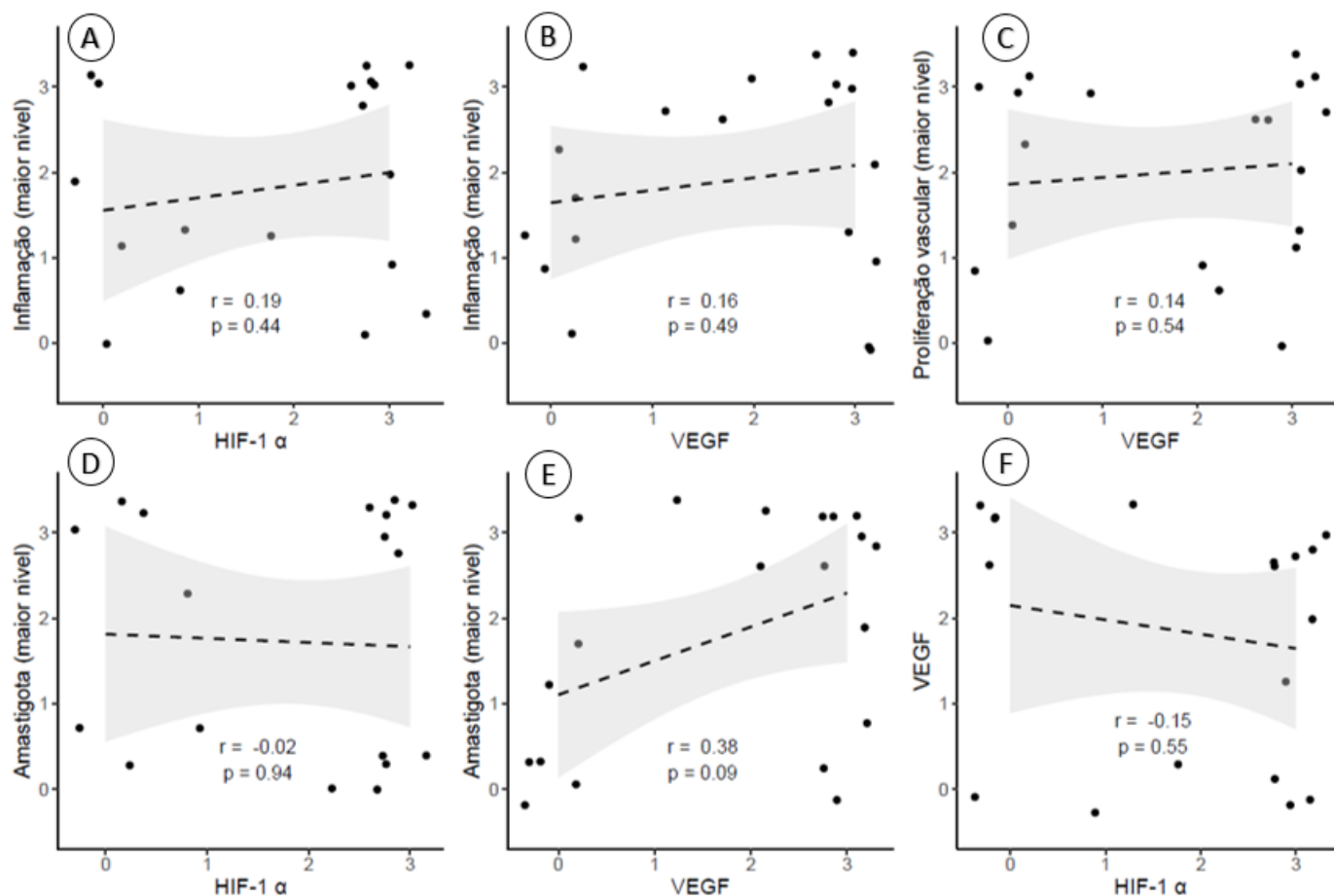
Fonte: Autor (2021).

Gráfico 2 - Análise de correlação de Spearman entre a presença de inflamação reticular e a carga parasitária (amastigotas) na derme reticular de cães leishmaniose visceral.



Fonte: Autor (2021).

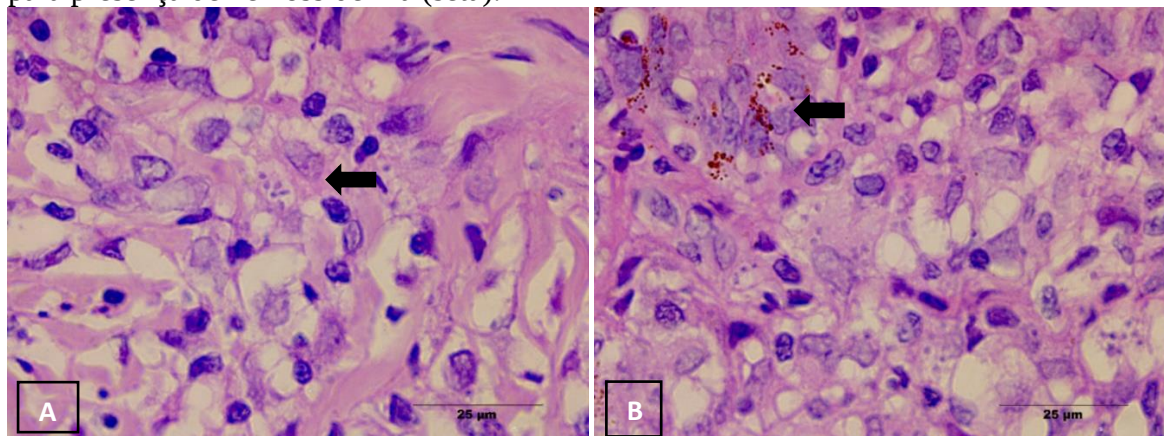
Gráfico 3 - Análise de correlação de Spearman entre marcadores HIF-1 α e VEGF e as variáveis em dermatite com maior intensidade em cães com leishmaniose visceral.



A – Relação entre HIF-1 α e a inflamação da dermatite, B - relação entre VEGF e a inflamação da dermatite, C – relação entre VEGF e proliferação vascular, D – relação entre a carga parasitária e níveis de HIF-1 α , E - relação entre a carga parasitária e níveis de VEGF e F – relação entre os marcadores HIF-1 α e VEGF em cães com leishmaniose visceral.

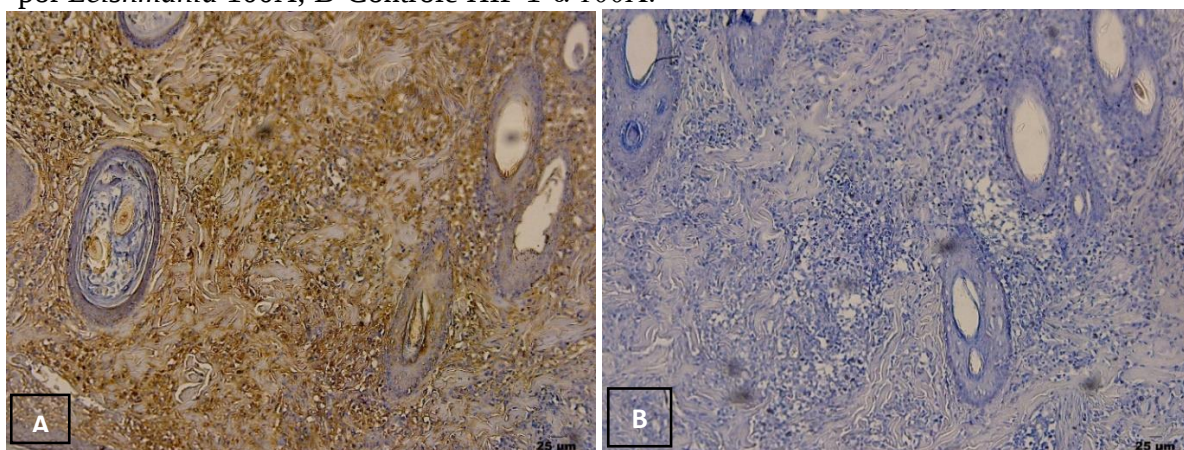
Fonte: Autor (2021).

Figura 2 - Fotomicrografias das alterações histopatológicas na derme de cães com leishmaniose visceral. A- Coloração HE de dermatite reticular de cães infectados com *Leishmania* 400X, com destaque para amastigotas no interior de macrófagos (seta), B- Coloração HE de dermatite reticular de cães infectados por *Leishmania* 400X com destaque para presença de hemossiderina (seta).



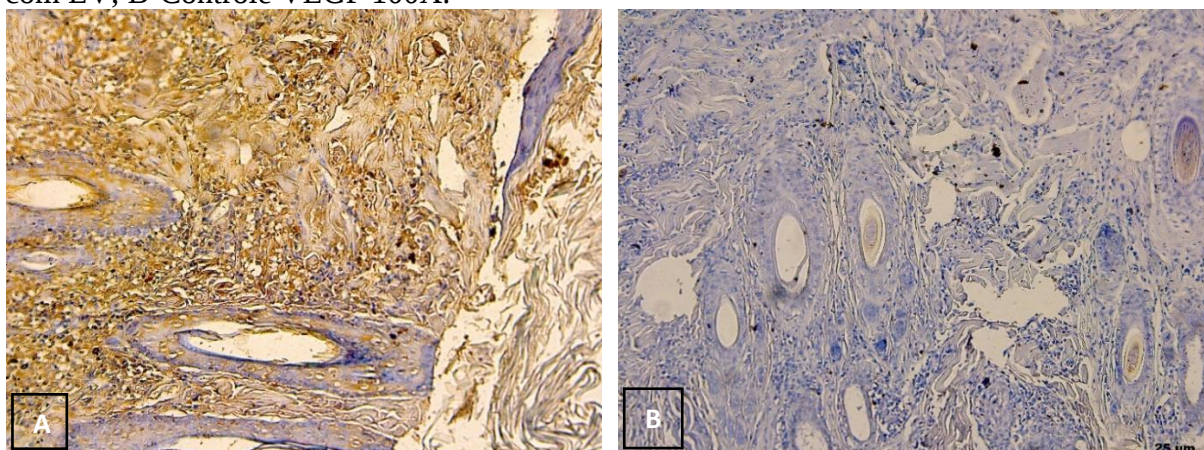
Fonte: Autor (2021).

Figura 3 - A-Fotomicrografias da expressão de HIF-1 α em lesões dérmicas de cães infectados por *Leishmania* 100X; B-Controle HIF 1- α 100X.



Fonte: Autor (2021).

Figura 4 - A-Fotomicrografias da expressão de VEGF em lesões por *Leishmania* 100X em cães com LV; B-Controle VEGF 100X.



Fonte: Autor (2021).

6 CONCLUSÕES

- A maioria dos cães foram classificados como oligossomáticos, apresentaram alopecia, onicogribose, dermatite descamativa generalizada e ulcerativa local, descamação local ou generalizada.
- As lesões apresentaram fortes níveis de intensidade dos marcadores HIF-1 α e VEGF.
- Os leucócitos foram significativamente associados a inflamação da dermatite.
- Este estudo revelou que a dermatite do tipo não granulomatosa de cães favorece a manutenção do parasito em cargas elevadas na derme, o que poderia facilitar a sua disseminação pelas vísceras.
- A dermatite está clinicamente associada a presença de diferentes leucócitos. O estudo morfológico das células e de suas citocinas produzidas no processo inflamatório sugere que eles podem ou não participar do controle do agente infeccioso.
- Este é o primeiro estudo envolvendo os marcadores HIF-1 α e VEGF em cães com leishmaniose visceral. A participação destes marcadores pode estar envolvida no controle ou na manutenção do parasito no cão, isso pode ser contextualizado com estudos futuros.
- A PCR convencional parece não ser um bom método para detecção de espécies de *Leishmania* em blocos de biopsias parafinadas com cortes de espessura < 8 μ m.

REFERÊNCIAS

ADAMS ER, JACQUET D., SCHOONE G., GIDWANI K., BOELAERT M., et al. Leishmaniasis Direct Agglutination Testing: Using Images as Training Materials to Reduce Interreader Variability and Improve Accuracy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6.

ARAUJO, A.P.; ARRAIS-SILVA, W.W.; GIORGIO, S. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: a potential model for chronic hypoxia. **Acta Histochem.** v.114, n.8. p. 797-804. 2012.

ARAUJO, A.P.;FREZZA,T.F.;ALLEGRETTI,S.M.;GIORGIO,S. Hypoxia, hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in a murine model of *Schistosoma mansoni* infection. **Exp Mol Pathol.** n. 89, p. 327-333. 2010.

ARAUJO, A.P.; GIORGIO, S. Immunohistochemical evidence of stress and inflammatory markers in mouse models of cutaneous leishmaniasis. **Arch Dermatol Res.** 2015.

BASTOS, T.S.A. **Aspectos gerais da leishmaniose visceral**. Goiânia, 2012. Dissertação. Mestrado em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Bio-Manguinhos/Fiocruz2019. Instituto de Tecnologia em imunobiológicos. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>. Acessado dia 07/12/21.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Guia de vigilância em saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Acessado em 20 de outubro de 2021. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral /

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. **Guia de orientação para vigilância de leishmaniose visceral canina (LVC).** Santa Catarina. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico: doenças negligenciadas.** Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

CANAL CIÊNCIA IBICT. Acessado em 06/10/21. Disponível em: <https://canalciencia.ibict.br/ciencia-em-sintese1/ciencias-exatas-e-da-terra/241-a-caminho-da-cura-da-leishmaniose-visceral-canina>

CAO, D.; HOU, M.; GUAN, Y.; JIANG, M.; YANG, Y.; GOU, H. Expression of HIF-1 α and VEGF *in* colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. **BMC Cancer**, n. 9, p. 432. 2009.

CASTRO GOMES, C.M.; SOUSA, M.G.T.; MENEZES, J.P.B. *et al.* Immunopathological characterization of human cutaneous leishmaniasis lesions caused by *Leishmania*(Viannia) spp. in Amazonian Brazil. **Parasitol Res.** n. 116. p. 1423. 2017.

CATUONGO MS, BURNA AN, BRUNEL AF, DÍAZ B, NEGRETTE SM. Relacion entre carga parasitaria y linfócitos Th1 em biopsias de piel de perros com leishmaniosis. *Rer vet*, 2020, 31 (1), 3-7.

COSTA, L.N.G.; LEVY, C.E. Evaluation of PCR in the diagnosis of canine leishmaniasis in two different epidemiological regions: Campinas (SP) and Teresina (PI), Brazil. **Epidemiology and infection.** n.7.2014.

DEGROSSOLI, A. *et al.* The influence of low oxygen on macrophage response to *Leishmania* infection. **Scand J Immunol.** v.74, n.2. p. 165-75. 2011.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.J.; MENDEZ, S.; FUENT, C.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.T.; CUQUERELLA, M.; ALUANDA, J.M. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. **Am J Trop Med Hyg.** 1999; 61:652-3.

FIGUEIREDO, M.J.F.M. *et al.* Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.15, n.1, p.102-106. 2014.

FLEMMINGS, B.J.; PAPPAS, M.G.; KEENAN, C.M.; HOCKMEYER, W.T. Immune complex decomplexation of canine sera for use in a complement - fixation test for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** 1984; 5:553-9.

FRAGA, C.A.C. *et al.* Immunohistochemical profile of HIF-1 α , VEGF-A, VEGFR2 and MMP9 proteins in tegumentary leishmaniasis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 87, n. 5, p. 709-713, 2012.

FIGUEIREDO, F.B.; VASCONCELOS, T.C.B.; MADEIRA, M.F.; MENEZES, R.C.; MAIA-ELKHOURY, A.N.S; MARCELINO, A.P. *et al.* Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 11, 2018.

FREIRE, C.G.V.; MORAES, M.E. Cinomose canina: aspectos relacionados ao diagnóstico, tratamento e vacinação. **PUBVET**. v.13, n.2, a263, p.1-8, 2019.

FONSECA, A.M. **Diagnóstico de leishmaniose visceral utilizando proteínas de leishmania infantum com função desconhecida**. 2013. Dissertação. (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciência Biológicas.

GOMES, A.H.S.; MARTINES, R.B.; KANAMURA, C. T.; M. L. P. BARBO.; IGLEZIAS, S.D.; LAULETTA LINDOSO, J.A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. American cutaneous leishmaniasis: In situ immune response of patients with recent and late lesions. n. 39 p.12423. 2017.

GONTIJO, C.M.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**. 2004; 7:338-49.

GONTIJO, B.B.; PAVÃO, F.F.; SILVA, F.S.A.; SILVA, F.D.; TAVARES, C.G.; COELHO, G.L. Esporotricose e leishmania tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. **PUBVET**. v.5, n. 38, ed. 185. p. 1-19, 2011.

GORDAN, J.D.; SIMON, M.C. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. **Curr Opin Genet Dev**. v.17, n.1. p.71-7. 2007.

GODOY, K.C.S.; ANTUNES, T.R.; BRAZ, P.H.; ASSIS, A.R.; OLIVEIRA, G.G.; SILVEIRA, A.W. *et al.* Comportamento dos marcadores bioquímicos de injúria hepática nos cães com leishmaniose visceral. **PUBVET**. v. 11, n. 7, p. 670-675, 2017.

GUERIN PJ, OLLIARO P, SUNDAR S, BOELAERT M, CROFT SL, DESJEUX P *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis** 2002; 2: 494-501.

- GUERRA, J.M.; FERNANDES, N.C.C.A.; KIMURA, L.M.;SHIRATA,N.K.;MAGNO, J.A.B.;ABRANTES,M.F. et.al. Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de Leishmaniaspp. em amostras de tecidos caninos. **Rev Inst Adolfo Lutz**. p. 75 -1686, 2016.
- HARITH, A.E.; KOLK AHJ, L.A.; ARMAN, J.J. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and Elisa. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1987; 81:603-6.
- HOCKMEYER, W.T.; WELLDE,B.T.;SABWA,C.L.A. Complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen I. **Ann Trop Med Parasitol**. 1984; 78:489-93.
- ICHIHARA, E. *et al*. Targeting angiogenesis in cancer therapy. **Acta Med Okayama**. v.65, n.6. p. 353-62. 2011.
- LEAL, C. R. B. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. In: II Fórum de Discussão da Sociedade Paulista de Parasitologia: Leishmaniose visceral americana, situação atual e perspectivas futuras, 2007, São Paulo. Anais... São Paulo, 2007.
- LIMA CA, TEIXEIRA KR, MOREIRA JPFF, TEIXEIRA KR. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma revisão. **PUBVET**,v. 7, n. 25, 2013.
- LIMA CC, GRISOTTIB M. Relação humano-animal e leishmaniose: repercussões no cotidiano de indivíduos inseridos em região endêmica. **Saúde Soc**. v. 27, n. 4, p. 1261-1269, 2018.
- MARTANO, M. et al. Evaluation of Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha (HIF-1 α) in Equine Sarcoid: An Immunohistochemical and Biochemical Study. **Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 58, 2020.
- MARTINS, N.S.; SANTOS, L.S.; COELHO, G.B.; OLIVEIRA, R.A. Alterações da matriz extracelular esplênica em cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi. **Ciência Animal Brasileira**. v.16, n.1, p.103-115. 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/ DEPARTAMENTO de VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A: Normas e Manuais Técnicos. Brasília,122p., 2006b.
- MIYAKE, M., FUJIMOTO, K., ANAI, S., OHNISHI, S., KUWADA, M., NAKAI, Y., INOUE T., MATSUMURA, Y., TOMIOKA, A., IKEDA, T., TANAKA, N., HIRAO,

Y. "Heme oxygenase-1 promotes angiogenesis in urothelial carcinoma of the urinary bladder". **Oncology Reports**. v. 25, n. 3. 2011.

MOLINET FJ, AMPUERO JS, COSTA RD, NORONHA EF, ROMERO GA. Specificity of the rapid rK39 antigen-based immunochromatographic test Kalazar Detect(r) in patients with cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013 May;108(3):293–6. doi: 10.1590/S0074-02762013000300006.

MOSCHETTA, M.G. **Avaliação de novos marcadores prognósticos e preventivos em neoplasias mamárias de cadelas: avaliação sérica molecular do VEGF e do HIF-1 alfa**. Orientador: Dra. Débora Ap. Pires de campos Zuccari. São José do Rio preto: 2013. 77 fls. (Dissertação). Mestrado em Ciências da Saúde. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, 2013.

NUSSENZWEIG V.; NUSSENWEIG, R.S.; ALENCAR, J.E. Leishmaniose visceral nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará: inquérito sorológico utilizando a reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo de tuberculose. Observações sobre o diagnóstico e epidemiologia da doença. **O Hospital**. 1957; 52:47-69.

NEUFELD.G; COHEN.T. Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **FASEB J**. v. 13, p 9-22, 1999.

NOCITI, R. P. et al. O papel do fator de crescimento endotelial (VEGF) na formação e progressão de neoplasias mamárias de cadelas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, 2015; 39(3):341-346.

NOGUEIRA, M. R. S.; LATINI, A. C. P.; NOGUEIRA, M. E. S. The involvement of endothelial mediators in leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2016; 111(10):635-641.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. Núm. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C.: OPAS; 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>

PAHO - Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50524>

PALTRINIERI S, GRADONI L, ROURA X, ZATELLI A, ZINI E. Laboratory tests for the diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology* 2016;45: 552–578.

PAPPAS, M.G.; CANNON, L.T.; HOCKMEYER, W.T.; SMITH, D.H.; Evaluation of complement fixation procedures for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**. 1985; 79:147-51.

PAPPAS, M.G.; HAJKOWSKI, R.R.; CANNON, L.T.; HOCKMEYER, W.T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-Elisa): comparison with standard Elisa and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol.** 1984; 14:239-49.

RICCIARDOLO, FL.; SABATINI, F.; SORBELLO, V. *et al.* Expression of vascular remodelling markers in relation to bradykinin receptors in asthma and COPD. **Thorax.** n. 68. p. 803–811, 2013.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R.R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A.R.; FRANK, G.R.; GRADONI, L. Evaluation of the Leishmania recombinant k39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology.** v.104, n.4, p.275-285, 2002.

SCHATZ, V.; NEUBERT, P.; RIEGER, F.; JANTSCH, J. Hypoxia, Hypoxia-Inducible Factor-1 α , and Innate Antileishmanial Immune Responses. 2018. Feb 22; 9:216.

SCHALLIG HD, SCHOONE GJ, BEIJER EG, KROON CC, HOMMERS M, *et al.* Development of a rapid agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-Leishmania antibodies in dogs. *Vet Parasitol* 2002; 109: 1-8.

SCHLEIN, Y. Leishmania and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol Today.** 1993 Jul; 9(7):255-8.

SCHÖNIAN G, KUHLS K, MAURICIO IL *et al.* Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. *Parasitology*, 2011; 138(4):405-425.

SILVA, F.C. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Tópica: Ciências Agrárias e Biológicas.** v.1, n. 1. p. 20, 2007.

SILVA, J.C.F. **Leishmaniose visceral canina no Município de Montes Claros, Minas Gerais – Brasil.** Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais; 1997.

SISTO, M.; LISI, S.; INGRAVALLO, G. *et al.* Neovascularization is prominent in the chronic inflammatory lesions of Sjögren's syndrome. **Int J Exp Pathol.** n. 95. p.131–137, 2014.

SINGH AK, MUKHOPADHYAY C, BISWAS S, SINGH VK, MUKHOPADHYAY CK. Intracellular pathogen Leishmania donovani activates hypoxia inducible factor-1 by dual

mechanism for survival advantage within macrophage. *PLoS One*. 2012;7(6):e38489. doi:10.1371/journal.pone.0038489

SMITH, D.H.; WELLDE, B.T.; SABWA, C.L.; REARDON, M.J.; HOCKMEYER, W.T. A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen II. Results in an endemic area in Kenya. **Ann Trop Med Parasitol**. 1984; 78:495-500.

SOLANO-GALLEGO L, VILLANUEVA-SAZ S, CARBONELL M, TROTTA M, FURLANELLO T, et al. Serological diagnosis of canine leishmaniasis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan (R), ID Screen (R) and Leishmania 96 (R)), a rapid test (Speed Leish K (R)) and an internal IFAT. *Parasites and vectors* 2014;7.

SOUSA S, LOPES AP, CARDOSO L, SILVESTRE R, SCHALLIG H, et al. Inquérito soropidemiológico da infecção por *Leishmania infantum* em cães do nordeste de Portugal . *Acta Tropica*. 2011;120: 82–87.

SUNDAR S, RAI M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 951-8.

TRAVI BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir that lives among us. *PLoS Negl Trop Dis*. January 11, 2018; 12 (1): e0006082.

VAN GRIENSVEN J, DIRO E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infect Dis Clin North Am*. 2019 Mar;33(1):79-99. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.005.

WHO - World Health Organization. **Weekly Epidemiol Rec**. v. 91, n. 22, p. 285-296, 2016.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar do projeto de mestrado intitulado “AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DAS LESÕES INFLAMATÓRIAS CUTÂNEAS DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) infantum* (NICOLLE, 1908)”, sob a responsabilidade do pesquisador Profº Drº Leucio Camara Alves. Sua participação com seu animal particular é voluntária e se dará por meio de coletas de fragmento de pele através de biópsia excisional com auxílio de punch 4mm descartável, com realização de anestesia local e provável anestesia geral, desde que o paciente esteja apto para o procedimento. Serão prescritos fármacos para analgesia e ação anti-inflamatória e antisséptica a serem realizados em domicílio, além de uso do colar elisabetano durante 10 dias, quando seu animal será reavaliado clinicamente antes da retirada dos pontos.

Todo procedimento anestésico possui risco, todavia os riscos decorrentes da participação dos seu (s) animal (is) na pesquisa são mínimos. Se você aceitar participar, os resultados decorrentes do estudo com seu (s) animal (is) possibilitará a elaboração de estratégias de controle mais efetivas e diminuindo os riscos de infecção a animais e humanos.

Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem prejuízo a sua pessoa.

O (a) Sr (a) não terá despesas e também não receberá remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade e de seu (s) animal (is) não serão divulgadas, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço Rua Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos, Recife - PE, pelo telefone (81) 3320-6422.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o projeto “**Avaliação da carga parasitária das lesões inflamatórias cutâneas de cães com infecção natural por *Leishmania (leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)**” que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Este documento foi emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ____/____/____

Assinatura do participante
Impressão do dedo polegar caso não saiba assinar

Assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO A - Certificado de aprovação da CEUA / UFRPE



UNIVERSIDADE
FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da carga parasitária das lesões inflamatórias cutâneas de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle,1908)", protocolada sob o CEUA nº 1983220520 (10 000270), sob a responsabilidade de **Leucio Camara Alves** e equipe: *Letícia Maximiano Bezerra; Edna Michelly de Sá Santos; Winny Gomes de Oliveira Silva; Janilene de Oliveira Nascimento; Roseane Oliveira Feltosa; Wagner Wesley Araujo Andrade; MARIA VANUZA NUNES DE MEIRELES; Talita Nayara Bezerra Lins; Carlos Adriano de Santana Leal; Rafael Antonio do Nascimento Ramos; Cassia de Freitas; Caio Felipe Cavalcanti de Andrade Gomes; Maria de Lara Oliveira Lima* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) na reunião de 10/06/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the parasitary load of cutaneous inflammatory injuries of dogs with natural infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle,1908)", utilizing 30 Dogs (males and females), protocol number CEUA 1983220520 (10 000270), under the responsibility of **Leucio Camara Alves** and team: *Letícia Maximiano Bezerra; Edna Michelly de Sá Santos; Winny Gomes de Oliveira Silva; Janilene de Oliveira Nascimento; Roseane Oliveira Feltosa; Wagner Wesley Araujo Andrade; MARIA VANUZA NUNES DE MEIRELES; Talita Nayara Bezerra Lins; Carlos Adriano de Santana Leal; Rafael Antonio do Nascimento Ramos; Cassia de Freitas; Caio Felipe Cavalcanti de Andrade Gomes; Maria de Lara Oliveira Lima* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFRPE) in the meeting of 06/10/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2020** a **07/2022**

Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **01 a 15 anos**

N: **30**

Linhagem: **TODAS AS RAÇAS**

Peso: **01 a 60 kg**

Local do experimento: O experimento será realizado no Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

Recife, 01 de julho de 2020



Prof. Dr. Francisco de Assis Leite de Souza
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

ANEXO B - Artigo submetido a BMC Veterinary Research



Edvan Lira ▾

Seus envios

Acompanhe seus envios

Análise do fator de crescimento endotelial vascular e fator 1 induzido por hipóxia - alfa em lesões de leishmaniose canina

9 revisores convidados 08 22 de fevereiro

Autor Correspondente: Edvan Soares de Lira

Pesquisa Veterinária BMC

73a71b56-2139-4db1-9a55-355b441f7ad6 | v.1.3

Se você nos enviou algum artigo por meio de qualquer outro sistema de envio, por exemplo, Editorial Manager ou eJournalPress, faça login ou use e-mails de notificação desse sistema para obter informações de rastreamento de artigos. Ainda tem uma pergunta? [Contate-Nos](#)