

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Leishmaniose visceral na região sul do Brasil: pesquisa epidemiológica,
educativa e *screening* de princípios ativos naturais frente a *Leishmania* spp.**

Tábata Pereira Dias

Pelotas, 2021

Tábata Pereira Dias

Leishmaniose visceral na região sul do Brasil: pesquisa epidemiológica, educativa e *screening* de princípios ativos naturais frente a *Leishmania* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Marlete Brum Cleff

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D541l Dias, Tábata Pereira

Leishmaniose Visceral na região sul do Brasi : Pesquisa epidemiológica, educativa e screening de princípios ativos naturais frente a *Leishmania spp* / Tábata Pereira Dias ; Marlete Brum Cleff, orientadora ; Fabiano Borges Figueiredo, coorientador. — Pelotas, 2021.

115 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Leishmaniose visceral. 2. Teste sorológico. 3. Sul do Rio Grande do Sul. 4. Extratos naturais. I. Cleff, Marlete Brum, orient. II. Figueiredo, Fabiano Borges, coorient. III. Título.

CDD : 636.0896

Tábata Pereira Dias

Leishmaniose visceral na região sul do Brasil: pesquisa epidemiológica, educativa e *screening* de princípios ativos naturais frente a *Leishmania* spp.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26/02/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marlete Brum Cleff (Orientador)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo
Doutor em Ciências Doutor em Ciências pelo Instituto Nacional de Doenças Infecciosas Evandro Chagas FIOCRUZ, RJ.

Prof. Dr. Mary Marcondes
Doutor em Clínica Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, FMVZ-USP,

Prof. Dr. Fernanda de Rezende Pinto
Doutora em Doutora em Medicina veterinária Preventiva pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho campus Jaboticabal

Prof. Dr. Tássia Cristina Bello de Vasconcelos
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Fluminense.

Agradecimentos

Nem sempre o que queremos é o que precisamos. Compreender essa premissa pode ser uma tarefa árdua na caminhada enquanto construímos quem somos, entre os encontros e desencontros que a vida nos proporciona. Mais do que o crescimento profissional, o mestrado foi um período de amadurecimento pessoal, de autoconhecimento, de aceitação e acolhimento. São muitas pessoas a agradecer, eu fui abençoada com cada encontro que me proporcionou repensar como reconduzir meus passos.

Agradeço a Deus por ter me acolhido em momentos de desespero em que pensei em renunciar meus sonhos e a minha mãe Marta que sempre esteve ao meu lado, acreditando em mim quando eu mesma não acreditava mais, que sempre apoiou minhas escolhas.

A minha orientadora Marlete Brum Cleff, pela paciência em lapidar essa pedra bruta e por me apresentar a comunidade do Ceval que me fez descobrir uma paixão chamada 'Saúde Coletiva'. Descortinar o nosso propósito é a única maneira de fazer o coração vibrar...

Ao meu coorientador, por toda bondade e a grandeza com que me acolheu e proporcionou a realização de um sonho chamado leishmaniose visceral canina. Preciso agradecer muito a quem tenho profunda admiração pessoal e profissional que aceitou gentilmente ser minha banca, Mary Marcondes. Eu nunca imaginei que você pudesse um dia estar presente e estou muito honrada.

Jamais poderia deixar de agradecer a todos os colegas, bolsistas e estagiários que construíram essa etapa da minha profissionalização junto a mim. E nesse quesito, agradeço carinhosamente com destaque Alessandra Aguiar, Gabriela de Carvalho Jardim, Nielle Versteg, Tainã Perez e Karine Leal pela dedicação nesse trabalho, construído a muitas mãos. Foi em vocês que encontrei o apoio quando tudo parecia fora do lugar.

Agradeço ainda aos órgãos de fomento Capes, CNPq e a UFPel pelo financiamento da minha bolsa e projeto de pesquisa e ao Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná pela doação dos testes rápidos utilizados no inquérito realizado, principalmente em meio ao momento caótico que vivemos para a pesquisa brasileira.

Que nunca me falte coragem para ir atrás dos meus sonhos! Porque uma vez que nos colocamos a caminhar eles se tornam possíveis...

“É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

Resumo

DIAS, Tábata Pereira. **Leishmaniose visceral na região sul do Brasil: pesquisa epidemiológica, educativa e *screening* de princípios ativos naturais frente a *Leishmania* spp.** 2021. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de importância mundial com tríade epidemiológica complexa e de difícil controle sendo o cão o principal reservatório urbano do parasito. Casos da enfermidade em cães costumam preceder casos em humanos, sendo assim, os inquéritos soroepidemiológicos dos animais em áreas endêmicas representam uma ferramenta essencial para realizar a vigilância epidemiológica. A primeira notificação de LV em caninos no Rio Grande do Sul ocorreu em 2009 em São Borja e desde então a doença está em expansão no estado gaúcho. O tratamento tanto em humanos como nos caninos é complexo e oneroso necessitando de pesquisas que busquem novas alternativas terapêuticas. Nesse sentido, produtos naturais são promissores, principalmente levando-se em consideração que o Brasil possui uma flora rica. Diante do exposto, foi objetivo deste trabalho realizar inquérito soroepidemiológico de cães de Pelotas e municípios limítrofes com o teste imunocromatográfico *Dual Path Platform* (DPP®) e avaliar a atividade de extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais frente a espécies de *Leishmania* spp. para triagem dos produtos estudados pelo grupo Fitopeet através do ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Foi objetivo do estudo também avaliar a composição química dos extratos que apresentaram atividade anti-*leishmania* (extrato de *Schinus terebinthifolia* (EHST) e óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) e *Origanum majorana* L. (OEOM). Na região Sul do RS, dentre os cães investigados sorologicamente com o DPP®, 1,29% (10/772) animais foram reagentes. As amostras positivas eram de animais coletados nos municípios de Pelotas, Capão do Leão, Jaguarão e São Lourenço do Sul, todos considerados endêmicos para a LVC. No *screening* realizado, o extrato de *S. terebinthifolia* (EHST) e os óleos essenciais de *R. officinalis* (OERO) e *O. majorana* (OEOM) da família Lamiaceae apresentaram atividade de inibição no crescimento de *L. infantum* e *L. braziliensis* e se mostram promissores para continuação dos estudos frente as formas amastigotas.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; teste sorológico; sul do Rio Grande do Sul; extratos naturais.

Abstract

DIAS, Tábata Pereira. **Visceral leishmaniasis: epidemiological, educational research and *screening* of natural active products against *Leishmania* spp.** 2021. 124f. Dissertation (Master's) - Veterinary Graduate Program, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Visceral Leishmaniasis (VL) is a zoonosis of worldwide importance with complex epidemiological triad and difficult to control, within the dog being the main urban reservoir of the parasite. Disease's cases in dogs tend to precede human cases, so seroepidemiological surveys of animals in harmless areas represents an essential tool to carry out epidemiological surveillance. The first notification of VL in canines in Rio Grande do Sul occurred in 2009 in São Borja and since then the disease has been expanding in the state of Rio Grande do Sul. Treatment in both humans and canines is complex and costly, requiring research to seek new therapeutic alternatives. In that regard, natural products are promising, especially taking into account that that Brazil has a rich flora. The aim of this study was perform a seroepidemiological survey of dogs from Pelotas and neighboring municipalities, with the immunochromatographic test *Dual Path Platform* (DPP®) and to evaluate the activity of hydroalcoholic extracts and essential oils against *Leishmania* spp. to trial the Fitopeet's products through the colorimetric assay of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Also, was na aim of this study to evaluate chemical composition of extracts that showed anti *leishmania* activity (*Schinus terebinthifolia* extract (EHST) and *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) e *Origanum majorana* L. essential oils (OEOM). In the southern region of RS, among all dogs investigated serologically with DPP®, 1.29% (10/772) animals were reagentes. The positive samples were from animals collected in the municipalities of Pelotas, Capão do Leão, Jaguarão and São Lourenço do Sul, all considered to be free from LVC. In the screening, the extract of *S. terebinthifolia* (EHST) and the essential oils of *R. officinalis* (OERO) and *O. majorana* (OEOM) of the Lamiaceae family showed inhibitory activity in the growth of *L. infantum* and *L. braziliensis* and show promise for further studies in the face of amastigotes.

Keywords: Visceral leishmaniasis; serological test; southern Rio Grande do Sul; natural extracts.

Lista de Figuras

Figura 1	Tríade epidemiológica da leishmaniose visceral.....	17
Figura 2	Fluxo a nível oficial e privado das suspeitas de LVC e condutas previstas.....	20
Figura 3	Linha do tempo dos testes diagnósticos de LVC (1913 – 2021).....	21

Artigo 1

Figura 1	Mapas dos estados brasileiros e da região sul do Brasil evidenciando a distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral Canina no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.....	37
Figura 2	Mapa da região sul do Brasil evidenciando a distribuição geográfica dos vetores de Leishmaniose visceral canina no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.....	38
Figura 3	Mapa da região sul do Brasil evidenciando a distribuição geográfica de Leishmaniose visceral canina (LVC) e humana (LVH).....	39
Figura 4	Distribuição geográfica da leishmaniose visceral canina (LVC) na região Sul do Brasil, evidenciando casos em diferentes municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná contabilizados a partir da literatura extraoficial.....	40
Figura 5	Mapa da região sul do Brasil evidenciando a distribuição geográfica dos flebotomíneos identificados nos municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.....	45

Artigo 2

- Figura 1 Número de amostras testadas, sororreagentes no DPP® e origem, sendo que as amostras particulares se referem as encaminhadas por médicos veterinários clínicos que realizam atendimentos em Pelotas e municípios vizinhos (Rio Grande, Jaguarão, Capão do Leão)..... 75
- Figura 2 Representação da distribuição das amostras de cães incluídos no estudo, de acordo com o município de coleta para realização do DPP®..... 76
- Figura 3 Demonstração da dispersão espacial dos cães sororreagentes no DPP® de acordo com os bairros dos municípios incluídos no estudo..... 76

Lista de Tabelas

Tabela 1	Atividade inibitória antiprotozoária de extratos polares e apolares de plantas da família Lamiaceae e Anacardiaceae contra 50% (IC50) de <i>Leishmania</i> spp.....	30
Tabela 1 – Artigo 2	Dados das amostras de pacientes caninos reagentes no teste sorológico de triagem para LVC-DPP®.....	73
Tabela 1 – Artigo 3	Atividade inibitória antiprotozoária de extratos polares e apolares de plantas da família Lamiaceae e Anacardiaceae contra 50% (IC50) de <i>Leishmania</i> spp.....	82
Tabela 2 – Artigo 3	Cromatograma e estruturas químicas de compostos identificados no óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> e suas respectivas massas moleculares (m/z), tempos de retenção (min) e área (%).....	83

Lista de Abreviaturas e Siglas

BR	Brasil
CAAF	Citologia Aspirativa por Agulha Fina
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
DAT	Teste de Aglutinação em Gota
DATASUS	Departamento de informática do Sistema Único de Saúde do Brasil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP®	<i>Dual Path Platform</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHOM	Extrato Hidroalcoólico de <i>Oreganum majorana</i>
EHOV	Extrato Hidroalcoólico de <i>Oreganum vulgare</i>
EHRO	Extrato Hidroalcoólico de <i>Rosmarinus officinalis</i>
EHTV	Extrato Hidroalcoólico de <i>Schinus terebinthifolia</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FITOPEET	Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Produtos Naturais na Clínica Médica Veterinária
HCV-UFPEL	Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Pelotas
HP	Histopatologia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC50	Índice de Citotoxicidade de 50%
IHQ	Imunohistoquímica
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LTA	Leishmaniose tegumentar Americana

LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVH	Leishmaniose visceral humana
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais
mL-Lb	Mililitro- <i>Leishmania braziliensis</i>
mL-Li	Mililitro- <i>Leishmania infantum</i>
MS	Ministério da Saúde
OEOM	Óleo Essencial de <i>Oreganum majorana</i>
OERO	Óleo Essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>
OIE	Organização Internacional da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONG	Organização Não-Governamental
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
OSH	Ovariosalpingohisterectomia
PAC	Programa de Aceleração do Crescimento
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
POA	Porto Alegre
PR	Paraná
PVC-LV	Plano de Prevenção e Controle da Leishmaniose Visceral Canina
qPCR	<i>Polymerase chain reaction in real time</i>
RFC	Reação de Fixação do Complemento
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta

rK28	Quimera resultante da combinação de antígenos K9, K26 e K39
rK39	Epítopo imunodominante de 39 aminoácidos reconhecido por células B
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
SDPF	Imunofluorescência no eluato de sangue dessecado em papel filtro
SES	Secretaria Estadual da Saúde
SINAN	Sistema de Notificação e Agravos de Doenças
SMF	Sistema Fagocítico Mononuclear
SMS	Secretaria Municipal da Saúde
SP	São Paulo
SUS	Sistema Único de Saúde
Ug	Micrograma
WSAVA	<i>World Small Animal Veterinary Association</i>

Sumário

1 Introdução.....	17
2 Objetivos.....	32
3 Artigos.....	33
3.1 Artigo 1.....	33
3.2 Artigo 2.....	51
3.3 Artigo 3.....	77
4 Considerações Finais.....	93
Referências.....	94
Anexos.....	116

1 Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de relevância mundial e no Brasil representa uma das seis enfermidades protozoárias mais relevantes segundo a Organização Mundial da Saúde (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2019), contabilizando mais de 90% dos casos notificados das Américas (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2019). Se caracteriza como um grave problema de saúde pública devido a sua ampla distribuição geográfica, grande número de casos e gravidade das formas clínicas (BRASIL, 2006).

Trata-se de uma doença vetorial, com tríade epidemiológica complexa (Figura 1), que envolve os flebotomíneos da subfamília Plebotominae como vetores, principalmente as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (no Brasil), diferentes hospedeiros vertebrados como a espécie canina (*Canis lúpus familiaris*) e, o protozoário *Leishmania infantum* como agente etiológico (STEVERDING, 2017).

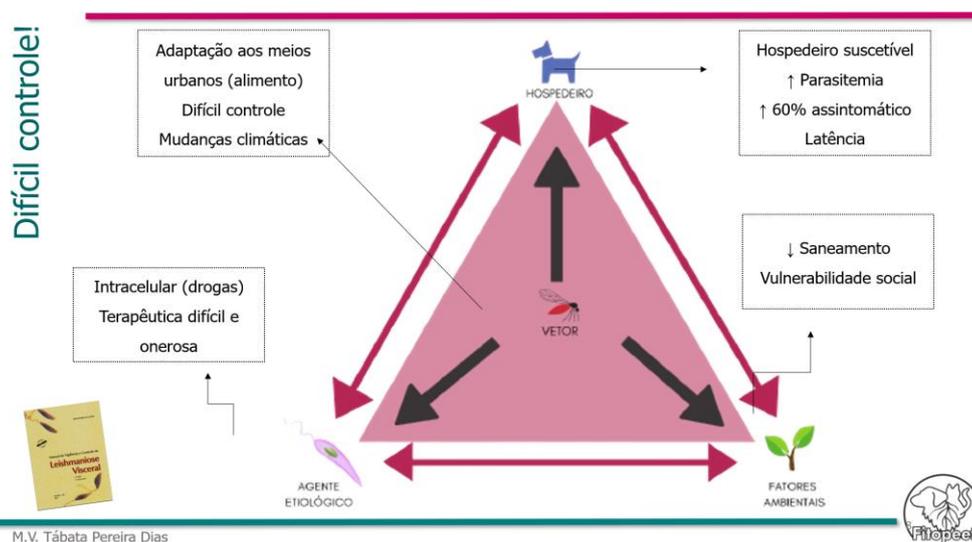


Figura 1. Tríade epidemiológica da leishmaniose visceral. Representação esquemática da tríade epidemiológica da LV composta pelo vetor da família Phebotominae, agente etiológico *Leishmania infantum*, fatores ambientais e hospedeiro vertebrado, com o principal reservatório em área urbana (*Canis lúpus familiaris*) evidenciado. Adaptado de NEVES, *et al.* (2005).

Na América do Sul a LV apresenta característica de transmissão zoonótica, ou seja, é transmitida de animais para o vetor e deste para humanos, com o homem representando um hospedeiro ocasional e os animais, principalmente o cão, no ambiente urbano, como reservatório do protozoário (ALVAR *et al.*, 2004 DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006) diferente do que ocorre em alguns países do Velho Mundo como a Índia onde o agente etiológico da enfermidade é a *Leishmania donovani* e observa-se um padrão de transmissão antroponótico, com a transmissão ocorrendo do humano para o vetor e deste para outro humano (CHAPPUIS *et al.*, 2007), sem envolvimento epidemiológico relevante dos animais no ciclo.

É uma doença que afeta principalmente indivíduos imunossuprimidos sendo a falta de medidas de controle e as coinfeções, principalmente com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), fatores que aumentam a incidência e a letalidade da LV (SOUSA-GOMES, 2011). A enfermidade tem alto custo para o Estado devido ao tratamento prolongado, o que o torna oneroso e afeta as famílias, principalmente aquelas em vulnerabilidade social, com implicações diretas incluindo custos relacionados ao deslocamento para o tratamento e indiretas como a perda de renda familiar devido a incapacitação do paciente (CARVALHO, 2019).

O ciclo de vida de *L. infantum* inclui duas formas do parasito, sendo uma intracelular (no hospedeiro vertebrado), chamada de amastigota, quando o flagelo é internalizado e a forma flagelada, que se encontra no inseto vetor, denominada promastigota (LAINSON & SHAW, 1988; NEVES *et al.*, 2005). As fêmeas dos flebotomíneos ao realizarem o repasto sanguíneo nos vertebrados inoculam a forma infectante do protozoário na pele. Após a fagocitose as *leishmanias* se multiplicam intracelularmente, principalmente dentro de células do sistema fagocítico mononuclear (SMF) (KAYE & SCOTT, 2011; REIS, *et al.* 2009).

Na sequência, os parasitos disseminam-se pelos sistemas linfático e vascular, infectando outros monócitos e macrófagos do sistema retículo endotelial, resultando na infiltração da medula óssea, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia entre outros sinais clínicos (SANTOS-GOMES *et al.*, 2000; SILVA, 2007).

Para fins de diagnóstico e tratamento, é importante ressaltar que a infecção não é sempre sinônimo de doença, o que constitui juntamente com o longo período de incubação da leishmaniose visceral canina (LVC) - que pode variar de meses a anos – em grande número de animais assintomáticos, implicando na dificuldade de se

realizar o diagnóstico precoce da infecção (RIBEIRO, 2007; BRASIL, 2006; NOGUEIRA & RIBEIRO, 2015).

Os sinais clínicos da LVC estão intimamente associados a polarização da resposta imune do organismo frente ao parasito. *L. infantum* é um protozoário intracelular e respostas de perfil humoral (Th2), com produção de altos títulos de anticorpos não são eficientes no combate a infecção (GIUNCHETT *et al.*, 2008). Por esse motivo, quando ocorre maior ativação da resposta com perfil Th2, o paciente desenvolve os sinais clínicos. Já quando a resposta é predominante de perfil celular (Th1), os animais não costumam apresentar sinais clínicos mas podem ser reagentes na investigação sorológica, indicando a infecção (FIGUEIREDO *et al.*, 2018; GIUNCHETT *et al.*, 2008; GRIMALDI *et al.*, 2012).

O diagnóstico da LVC é complexo e segue um fluxo sistemático (Figura 2) com objetivo de identificar a infecção ou doença a partir da suspeita clínica, seja para fim epidemiológico ou terapêutico. Apesar da enfermidade constar na lista de doenças de notificação compulsória da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), na prática, esse fluxo não está bem determinado, causando confusão entre os profissionais médicos veterinários quanto a conduta mais assertiva a seguir (BRASIL, 2006. MORAIS, 2020).

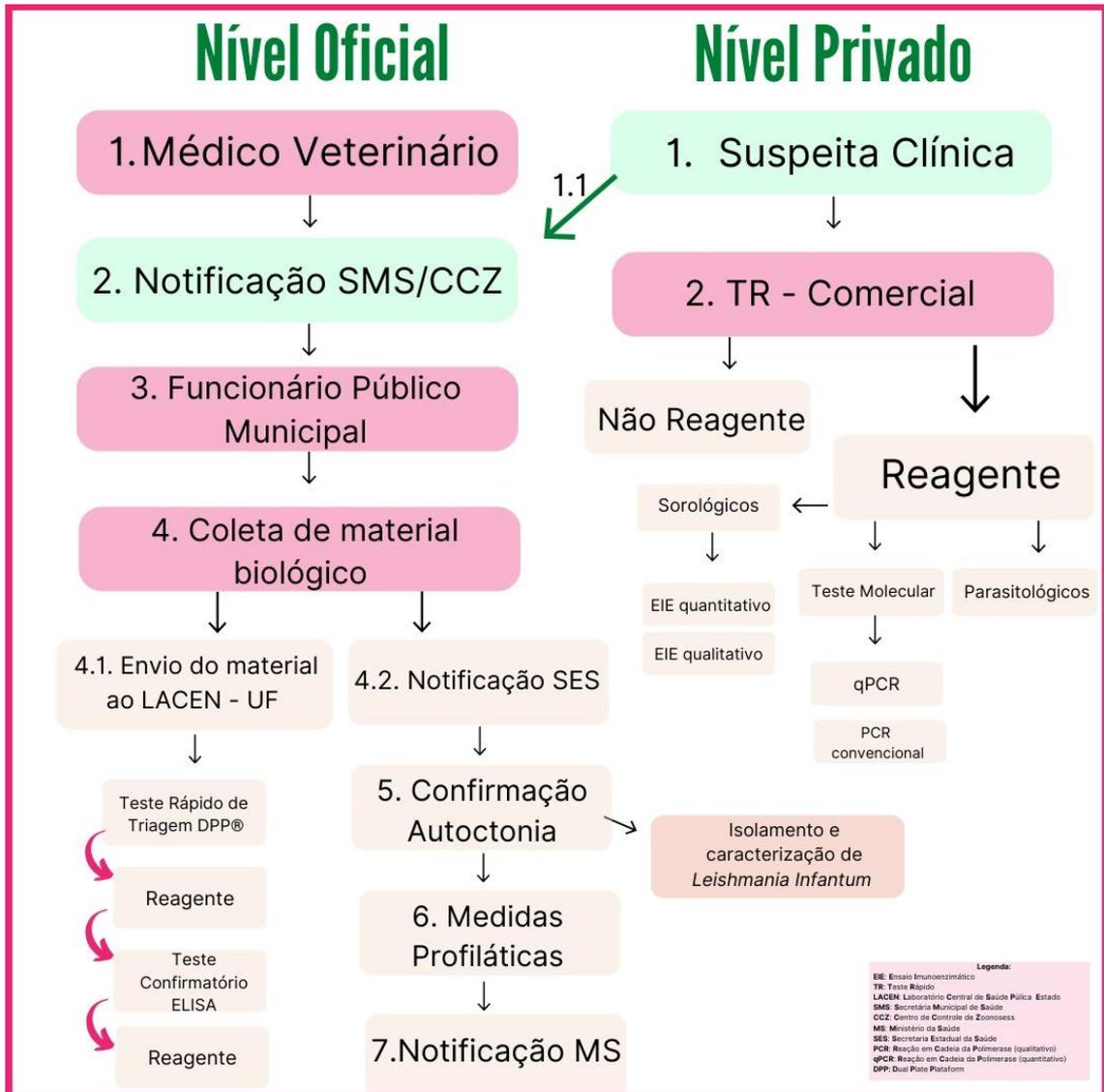


Figura 2. Fluxo a nível oficial e privado das suspeitas de LVC e condutas previstas. A nível oficial os profissionais médicos veterinários (1) devem comunicar suas suspeitas de LVC aos órgãos oficiais do nível municipal de onde residem. Esses locais podem variar conforme características do município, mas sempre estão relacionados a Secretarias Municipais de Saúde (SMS) (1-2). Diante disso, o profissional da esfera pública (3) irá coletar amostra de material biológico (4) do animal suspeito e encaminhar para o Laboratório Central de Saúde Pública correspondente a unidade federativa (LACEN-UF) (4.1) para realização do teste de triagem (DPP®) e na sequência, quando este for reagente (5), a realização do teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Esse protocolo ocorre em áreas não endêmicas onde não há disponibilização dos testes de triagem nas SMS, naqueles que possuem apenas o teste de ELISA é realizado no LACEN-UF. Após, os resultados reagentes são notificados ao médico veterinário clínico responsável, o tutor, a Secretaria Estadual da Saúde (SES) e ao Ministério da Saúde (MS) (6) para planejamento e execução das medidas profiláticas necessárias. Nas clínicas veterinárias, a nível privado, o fluxo descrito acima deveria ocorrer concomitante (1.1) a possibilidade de diagnóstico em estabelecimentos particulares para o tratamento dos pacientes. No entanto, o que se observa é a não comunicação aos órgãos oficiais resultando em grande número de subnotificações que interfere diretamente na estimativa da real prevalência da LVC nos municípios, e a execução do fluxo de testes rápidos comerciais, ELISA e PCR (*Polymerase Chain Reaction*) são os mais utilizados pelos profissionais. Adaptado do BRASIL, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011.

O diagnóstico pode ser realizado através de técnicas parasitológicas diretas, que são consideradas padrão ouro, evidenciando o agente ou através de técnica molecular para identificar o material genético (DNA) do protozoário. Mas devido a praticidade, as técnicas sorológicas são as mais utilizadas e incluem o teste imunoenzimático (ELISA), teste imunocromatográfico (DPP® - *Dual Path Platform*) a nível oficial e testes rápidos (TR) comerciais nas clínicas veterinárias e, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) na busca de anticorpos anti-*leishmania* (BRASIL, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). É importante ressaltar que para um diagnóstico mais assertivo os resultados dos testes não devem ser considerados isoladamente, mas interpretados associados ao exame clínico e aos dados epidemiológicos para a enfermidade (MICHALSKY *et al.*, 2007).

Para melhorar a operacionalização e eficácia, o protocolo oficial para diagnosticar a LVC a partir de 2011 foi modificado (Nota técnica N°01/2011 – CGDT CGLAB/DEVIT/SVS/MS) com a substituição do ELISA pelo DPP® para triagem dos animais, tornando-se o ELISA o teste confirmatório (Figura 3).

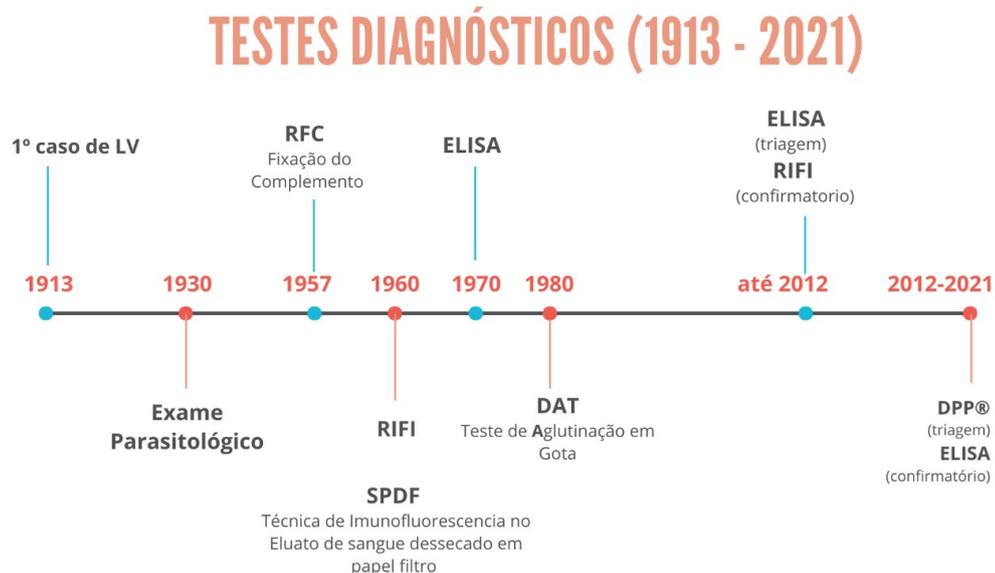


Figura 3. Linha do tempo dos testes diagnósticos de LVC (1913 – 2021). O primeiro teste diagnóstico para LVC utilizado desde o início da ocorrência da LV no Brasil foi o parasitológico, através da observação dos parasitos em amostras biológicas. Durante os anos seguintes outras técnicas foram experimentadas como a reação de fixação do complemento (RFC), imunofluorescência indireta (RIFI) e técnica de imunofluorescência no eluato de sangue dessecado em papel filtro com diferentes antígenos para sensibilização. Com o estabelecimento da técnica de ELISA em 1970 e o teste de aglutinação em gota em 1980. A partir de 2003 foi utilizado o ELISA como diagnóstico de triagem e o RIFI como confirmatório, uma vez que pareciam ser as melhores técnicas disponíveis. Os pesquisadores continuaram a buscar uma técnica de diagnóstico que oferecesse melhor sensibilidade para a triagem e especificidade para confirmação da infecção e/ou doença nos cães, sendo assim, a

partir de 2012 iniciou-se o protocolo com o DPP® para triagem e o ELISA como teste confirmatório. Fonte: construção própria.

Os inquéritos epidemiológicos caninos sempre representaram uma ferramenta importante instituída pelo Plano de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) mas as técnicas diagnósticas foram alteradas ao longo do tempo (Figura 3). Até a década de 1930 os diagnósticos eram realizados através de exames diretos (punção de fígado, baço e raspado de pele) apenas. Em 1957, após extração de antígeno do bacilo da tuberculose, foi realizada a tentativa de diagnosticar a doença através da técnica da reação de fixação do complemento (RFC), no entanto, a mesma não se mostrava eficiente, uma vez que ocorria a títulos baixos (1:80) reações cruzadas com a doença de Chagas e leishmaniose tegumentar americana (LTA), necessitando de outras metodologias para confirmação (ALVES & BEVILACQUA, 2004), deixando o diagnóstico mais oneroso.

Na década de 1960, a RIFI passou a ser utilizada (ALVES & BEVILACQUA, 2004), apresentava sensibilidade variando entre 68-100% e especificidade com variação de 52-100% (COURA-VITAL *et al.*, 2014). Ainda na polêmica do diagnóstico, pesquisadores sugeriram o controle do reservatório canino a partir da imunofluorescência no eluato de sangue dessecado em papel filtro (SDPF), o que possibilitaria, segundo eles, a redução entre 0,5 e 1% da prevalência (MONTEIRO *et al.*, 1994 *apud* BRAGA *et al.*, 1998). Mas, não houve consenso entre os estudiosos e Silva *et al.*, (2011) afirmaram que cães infectados não poderiam ser identificados pela RIFI no SDPF porque ocorreria a manutenção da transmissão.

A partir da década de 1970, surgiu a técnica sorológica ELISA que se mostrava pouco específica (83-98%) e com alta sensibilidade (91-97%), embora esta última esteja condicionada a escolha do antígeno para sensibilização da placa (ALVES & BAVILACQUA, 2004; MAIA & CAMPINO, 2008; COURA-VITAL *et al.*, 2014) e da resposta imunológica do canino a ser testado.

Durante muitos anos, a recomendação do MS foi o uso do ELISA para triagem de animais e posterior confirmação dos sororreagentes pelo RIFI (BRASIL, 2006). No entanto, em ambos testes há ocorrência de reações cruzadas com diversos agentes (ALVES & BAVILACQUA, 2004; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; ZANETTE *et al.*, 2014) como *Trypanossoma cruzi* (ROSYPAL *et al.*, 2003; PETERSEN, 2009), *Trypanossoma canis* (BARROS *et al.*, 2012) *Babesia canis* (LAURENTI, 2009), *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (GOMES *et al.*, 2008; GENNARI *et al.*, 2006)

o que sempre foi motivo de polêmica entre os pesquisadores, uma vez que o diagnóstico sororreagente do animal implicava na medida sanitária da eutanásia.

No final da década de 1980 o teste de aglutinação em gota (DAT) foi adaptado para o diagnóstico de LVC, mas havia limitações importantes como o longo tempo de incubação (18 horas) e a necessidade de diluições em série, dificultando o emprego da técnica quando a operação envolvia grande número de amostras (MAIA & CAMPINO, 2008).

Existem diversos outros métodos diagnósticos sem aplicação prática, utilizados mais a nível acadêmico por serem onerosos, pouco práticos e com necessidade de infraestrutura laboratorial, como o xenodiagnóstico (MAIA & CAMPINO, 2008), que pode ser empregado para determinar a importância epidemiológica do reservatório infectado, além da possibilidade de avaliação do paciente sob diferentes formas clínicas da doença (MICHALSKY *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2011).

A legislação vigente no Brasil quanto ao diagnóstico da LVC, recomenda o teste sorológico de triagem DPP® com o antígeno recombinante rK28, através da nota técnica N°01/2011 – CGDT CGLAB/DEVIT/SVS/MS quando substituiu o ELISA pelo teste imunocromatográfico para triagem, e o RIFI pelo ELISA para confirmatório. Em área geográfica da notificação do primeiro caso de LVC, após realização dos testes sorológicos, deve ser realizado ainda o PCR e a cultura do agente etiológico para identificação do mesmo (BRASIL, 2006).

Os métodos parasitológicos representam o padrão-ouro de diagnóstico (citologia e cultura *in vitro*) e têm como finalidade detectar formas amastigotas através da biópsia por aspiração com agulha fina (CAAF) de determinados órgãos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). A citologia consiste na visualização das formas amastigotas (MOREIRA *et al.*, 2002; LAURENTI, 2009) em esfregaços de aspirados de linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados pelas técnicas de Giemsa, panótico rápido ou Leishman (LAURENTI, 2009).

Apesar da especificidade de 100% dessas técnicas, a sensibilidade depende do grau de parasitismo do hospedeiro, tipo de material biológico coletado para análise, processamento, coloração e do treinamento e experiência do recurso humano. Além disso, quando o parasitismo é intenso, o diagnóstico pode ser considerado rápido e seguro, porém, em animais considerados assintomáticos, que representam mais de 60% dos caninos infectados, ele é duvidoso (LAURENTI, 2009; LAURENTI *et al.*, 2013; BRASIL, 2006).

A cultura *in vitro* é comumente utilizada com propósitos acadêmicos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009), sendo indicada quando ocorre a notificação do primeiro caso autóctone na região para a caracterização da espécie de *Leishmania* sp.

A PCR é altamente específica e sensível, sendo o método mais adequado na detecção da infecção na fase aguda e no monitoramento da cura parasitológica dos portadores (MICHALSKY *et al.*, 2007). Amostras oriundas de medula óssea, linfonodo, baço e pele são mais sensíveis quando comparadas com urina, sangue total e *buffy coat* (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009) para essa técnica. A PCR também discrimina as espécies de *Leishmania* sp. presentes em flebotomíneos e carrapatos (DANTAS-TORRES, 2007).

Esse método é indicado em caso de exportação de cães para áreas não endêmicas, doação de sangue ou coabitação com indivíduos imunodeprimidos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). A eficácia da técnica depende de alguns fatores tais como *primers* utilizados, número de cópias amplificadas da sequência alvo, método de extração do DNA, material biológico e protocolo utilizado (MAIA & CAMPINO, 2008).

Atualmente, o rk39 (epítopo imunodominante de 39 aminoácidos reconhecido por células B clonado de *L. infantum*), seria o mais potente e promissor antígeno recombinante (FIGUEIREDO *et al.*, 2018). Este é utilizado em testes imunocromatográficos como um método qualitativo e de triagem (ALVES & BEVILACQUA, 2004), de modo a diagnosticar amostras reagentes (LIMA *et al.*, 2010).

O teste sorológico imunocromatográfico, utilizado para triagem neste trabalho foi validado por Figueiredo *et al.*, (2018), apresentando alta sensibilidade, fator essencial para realização de inquéritos soroepidemiológicos, visando diminuir o número de falsos negativos, evitando desta forma a permanência de animais reagentes como fontes de infecção (GRIMALDI *et al.*, 2012).

Apesar da alta sensibilidade do DPP®, sabe-se que a eficácia do teste em animais assintomáticos não é a mesma para àqueles sintomáticos, uma vez levada em consideração a prevalência da enfermidade quando analisa-se os valores preditivos positivos (MICHALSKY *et al.*, 2007; LEMOS *et al.*, 2008; MAIA & CAMPINO, 2008, FIGUEIREDO *et al.*, 2018). Alguns autores consideram o teste baseado nesse antígeno pouco específico, o que aumentaria o número de falsos-positivos diagnosticados. Esse fato poderia estar associado à reação cruzada com algum fator presente no sangue canino (REITHINGER *et al.*, 2002). Reações cruzadas com

antígenos recombinantes são pouco prováveis (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009), mas no estudo de Zanetti (2006) estas reações foram observadas em casos de erliquiose, coinfeção erliquiose/babesiose, toxoplasmose, neosporose e coinfeção toxoplasmose/neosporose.

Os testes rápidos são ágeis e permitem a execução de medidas em tempo real, uma vez que oferecem facilidade para o transporte (SILVA *et al.*, 2013), necessitam de mínimo treinamento de recursos humanos (LEMOS *et al.*, 2008) e não requerem laboratórios com equipamentos específicos (OTRANTO *et al.*, 2005). A fim de executar as medidas de controle e prevenção, o diagnóstico precoce é fundamental (SAVANI *et al.*, 2003; OTRANTO *et al.*, 2005). Contudo, em se tratando de cães assintomáticos, não existem testes diagnósticos considerados padrão ouro, o que implica na necessidade de aperfeiçoamento dos mesmos (OTRANTO & DANTAS-TORRES, 2013).

Souza e colaboradores (2004) afirmam que a variedade de técnicas imunodiagnósticas, os inúmeros antígenos disponíveis e os diferentes critérios empregados para definição do ponto de corte, reduzem a concordância entre os resultados dos estudos de distintos pesquisadores e dificultam a comparação dos dados epidemiológicos. Desse modo, são necessários métodos diagnósticos que auxiliem na detecção precoce de cães infectados e, que possibilitem uma vigilância mais eficiente (SCALONE *et al.*, 2002; GRIMALDI *et al.*, 2012).

A sensibilidade de um teste pode variar de acordo com o curso clínico da infecção, a variabilidade genética e a resposta imune do hospedeiro (GRIMALDI *et al.*, 2012). Não existe na América do Sul, em virtude da presença permanente do flebotômico, um padrão de prevalência definido (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). Na Europa, estudos demonstram que cães com idade inferior a três e superior a oito anos possuem picos mais altos de prevalência da doença (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Cães clinicamente saudáveis mas soropositivos, com título de anticorpos baixos, devem ser novamente testados. Em caso de confirmação do resultado sororreagente, devem ser monitorados a cada três ou seis meses com o objetivo de avaliar a progressão da infecção. Se, durante o monitoramento for constatado aumento do título, manifestação de sinais clínicos e anormalidades clínico patológicas, o cão deve ser considerado doente (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Em áreas onde a transmissão da LVC não está confirmada, apenas a sorologia é insuficiente para conclusão do diagnóstico, sendo necessário avaliar também dados clínicos, epidemiológicos e parasitológicos (SAVANI *et al.*, 2003). Os inquéritos epidemiológicos baseados no diagnóstico laboratorial devem ser incentivados, porque auxiliam na avaliação da extensão do problema (ALVES & BEVILACQUA, 2004), no diagnóstico precoce da instalação da doença e da circulação do parasito na população, o que resulta na escolha de medidas mais assertivas para contenção e prevenção da leishmaniose. Dessa maneira, é imprescindível compreender o funcionamento de cada método diagnóstico e suas limitações, com o intuito de definir não somente o teste mais apropriado mas também, sua interpretação diante de um contexto específico (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Além da polêmica quanto as técnicas diagnósticas, a principal medida sanitária adotada pelos órgãos oficiais para os cães reagentes – a eutanásia - e a proibição do tratamento dos cães infectados e/ou doentes também são motivos de debates calorosos. Até a nota técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA de 2016, era proibido o tratamento de animais com LVC no Brasil, uma vez que não havia drogas com registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os animais apresentam cada vez mais importância para as pessoas, passando a serem considerados como membros da família (RODRIGUES *et al.*, 2018; REMOR *et al.*, 2020) e como parte da evolução da sociedade, é compreensível que a visão perante a eles se modifique, o que reflete diretamente em questões práticas anteriormente imunes a questionamentos, como é o caso da medida sanitária da eutanásia dos cães infectados e/ou doentes recomendada pelo MS desde a chegada da LVC no país.

É importante ressaltar que no seu surgimento (1913), os animais não representavam para os tutores o que hoje representam. Para solucionar o risco sanitário que a doença implicava, a luz do conceito de saúde pública, que visa a saúde e bem-estar humana acima de tudo, é compreensível que a medida menos onerosa e (vista pelo olhar da época) como melhor executável no sentido de custo-benefício, fosse a retirada dos reservatórios através da eutanásia para conter a progressão do ciclo (SILVA *et al.*, 2013).

No entanto, com a mudança do pensamento social, advindo da evolução temporal e advento da saúde coletiva, que trouxe um novo conceito de saúde (*One Health*), a eutanásia como principal medida sanitária de controle para a LVC não se mostra adequada e a atitude do Estado apenas causa repulsa, medo e desordem

quando realiza-se o diagnóstico dos primeiros casos em áreas consideradas livres, dificultando o trabalho dos profissionais da saúde e o objetivo principal da vigilância (ZUBEN & DONALISIO, 2016).

Desta forma, com apelo da sociedade, após reunião de especialistas sobre o tema, foi liberado através da nota técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MA o tratamento com a droga leishmanicida Milteforam® (Virbac Brasil) no Brasil. Apesar de não propiciar cura parasitológica, a droga diminui substancialmente a carga parasitária no animal, diminuindo assim o potencial de transmissão dos caninos (BANETH & SHAW, 2002). Contudo, o tratamento não é disponível a todos os animais infectados, principalmente pelo custo do fármaco, do acompanhamento médico veterinário e dos exames necessários para o monitoramento da enfermidade.

Assim, diversos grupos de pesquisa investem na busca e descoberta de novos princípios leishmanicidas/leishmaniostáticos ou coadjuvantes, que possam contribuir no tratamento e uma possível cura parasitológica dos animais, podendo este futuramente ser um argumento sólido para a diminuição da eutanásia de soropositivos.

O tratamento dos animais é possível desde que o tutor se responsabilize pelo mesmo e tenha condições financeiras para execução (RISCO, 2017). Apenas o Milteforan® é autorizado como terapêutica para LVC, embora sejam utilizados outros medicamentos associados após o estadiamento da doença (BRASILEISH, 2018). Em humanos, dentre as terapias disponíveis para o tratamento da LV, algumas estão em uso por mais de 70 anos e todas apresentam limitações, quer seja pela toxicidade, quer seja pelo aumento do número de cepas resistentes ou pelo alto custo (SOUZA *et al.*, 2012; ECHEVERRI, 2020).

A ausência de uma vacina contra leishmaniose humana e a existência de uma vacina veterinária que não protege os cães da infecção contra *L. infantum* - recentemente incluída na categoria 'não essencial' pelo WSAVA (*World Small Animal Veterinary Association*) (DAY *et al.*, 2020) - são fatores que reforçam a necessidade de pesquisas na área de bioprospecção. É reconhecido que populações em vulnerabilidade social são as mais acometidas pela enfermidade e não possuem poder aquisitivo para imunizar seus animais, por esse motivo esse recurso não é uma ferramenta eficaz para diminuir o ciclo de transmissão substancialmente, principalmente nessas áreas com menos recursos.

Diante do exposto, se faz necessário melhorar as estratégias terapêuticas existentes, tanto para humanos como para os animais, assim como desenvolver novas alternativas de fármacos para o tratamento (CORRAL *et al.*, 2012; WHO, 2018). Nesta perspectiva, os produtos naturais são a fonte mais promissora para o desenvolvimento de novas drogas e a literatura tem demonstrado resultados promissores, seja com extratos brutos, óleos essenciais ou outros derivados de plantas que apresentaram ação efetiva contra *Leishmania* spp. (HARVEY, 2008; HARVEY; EDRADA-EBEL & QUINN, 2015; ORYAN, 2015).

O Brasil possui flora rica e diversificada, fonte de potenciais princípios ativos para esse objetivo. Para milhões de pessoas, medicamentos fitoterápicos e terapêutica tradicional são a única fonte de assistência para tratamento de doenças, o que é culturalmente aceitável e se torna atraente diante dos altos custos da assistência médica (WHO, 2013). O Programa de Controle de Doenças Tropicais da OMS considera a investigação de plantas como essencial para o tratamento de doenças parasitárias, como é o caso das leishmanioses (GARCÍA *et al.*, 2010).

A necessidade de alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses e a importância atribuída às plantas medicinais como fonte valiosa de novos princípios ativos, conduziu à realização de estudos com vários produtos extraídos de plantas em espécies de *Leishmania* spp. (KAYE, 2011; GLUENTZ *et al.*, 2010). Entre esses produtos estão os extratos de diferentes tipos e substâncias puras das classes de metabólitos secundários, como os alcalóides, flavonoides, terpenos, saponinas, quinonas, chalconas; foram descritos com atividade antileishmanial contra diferentes espécies do parasito (LAVAUD *et al.*, 1995; OKETCH-RABAH *et al.*, 1997; MISHRA *et al.*, 2011).

Dentre os produtos do metabolismo vegetal mais promissores para a pesquisa na busca de novos compostos ativos estão os óleos essenciais. Estes, segundo definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (Brasil, 1999) “são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico e podem apresentar-se isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados”. Estes óleos podem ser encontrados em todos os órgãos vegetais, sendo mais frequentes em frutos, flores, folhas e raízes. Ocorrem em diversos gêneros de plantas superiores, inferiores e microrganismos (BRENNAN *et al.*, 2003).

O Fitopeet (Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Produtos Naturais na Clínica Médica Veterinária da UFPel) desenvolve pesquisas com extratos vegetais

diversos a dez anos objetivando a detecção de moléculas promissoras de plantas pertencentes às famílias Lamiaceae, Fabaceae e Solanaceae. Foram encontrados nos trabalhos resultados contra diferentes patógenos, incluindo *Sporothrix* spp. resistentes ao itraconazol (WALLER *et al.*, 2016), espécies de *Candida* spp. (CLEFF *et al.*, 2010), *Malassezia* spp. (GIORDANI, 2013), *Aspergillus* spp. dermatófitos (CLEFF *et al.*, 2010), assim como bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* resistentes a antibióticos de eleição no tratamento convencional (GUTERRES, 2015) e atividade antiparasitária em *Ancylostoma* spp. (AZAMBUJA, 2015) e *Dioctophyme renale* (PERERA, 2016).

Ainda, o grupo Fitopeet também avaliou e identificou em seus estudos os compostos majoritários em extratos polares e óleos essenciais extraídos de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana* e *Origanum vulgare*, que pelas evidências no amplo espectro de ação em patógenos diversos incentivaram a investigação frente a *Leishmania* spp. Além disso, levando em consideração que os produtos naturais sofrem variações conforme os locais de extração e sazonalidade é relevante a pesquisa por grupos de pesquisadores que utilizem plantas de diferentes origens para a validação dos resultados, o que justifica inclusive, a testagem das mesmas classes de produtos naturais.

Neste trabalho foram testados os extratos etanólicos, hidroalcoólicos e óleos essenciais de seis espécies de plantas (*Schinus terebinthifolia*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis* e *Origanum majorana*) de duas diferentes famílias: Lamiaceae e Anacardiaceae frente a formas promastigotas de *L. infantum* e *L. braziliensis* conforme pode ser visualizado na Tabela 1. Trata-se do primeiro teste (teste de citotoxicidade) realizado na cronologia da bioprospecção frente a *Leishmania* spp., considerado a triagem dos produtos utilizando a forma promastigota, que se replica mais facilmente em laboratório.

Diferentes extratos da mesma planta podem ser obtidos e eles são constituídos por diferentes concentrações dos produtos o que pode influenciar na ação frente aos patógenos e a viabilidade para uso futuro (industrialização). Os extratos são soluções concentradas, obtidas a partir de matérias primas vegetais (raiz, caule, folhas, frutos e sementes) secas e trituradas (BRASIL, 2014) sendo um processo dividido em duas etapas: a separação dos metabólitos secundários da planta por um solvente, por exemplo, álcool e etanol (utilizados neste trabalho) e a concentração por meio da eliminação do solvente (SANTOS, 2013).

Tabela 1. Atividade inibitória antiprotozoária de extratos polares e apolares de plantas da família Lamiaceae e Anacardiaceae contra 50% (IC50) de *Leishmania* spp.

Plantas Medicinais				<i>Leishmania</i> sp.
Família botânica	Espécie botânica	Nome popular	Tipo de extrato	
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolia</i>	Aroeira	Hidroalcoólico (0,96g)	<i>L. infantum</i>
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolia</i>	Aroeira	Hidroalcoólico (0,96g)	<i>L. braziliensis</i>
Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Etanólico (0,78g)	<i>L. infantum</i>
Lamiaceae	<i>Origanum. Vulgare</i>	Orégano	Etanólico (0,78g)	<i>L. braziliensis</i>
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Etanólico	<i>L. infantum</i>
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Etanólico	<i>L. braziliensis</i>
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Óleo essencial (3 anos)	<i>L. infantum</i>
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Óleo essencial (3 anos)	<i>L. braziliensis</i>
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Óleo essencial (12-2ml)	<i>L. infantum</i>
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Óleo essencial (12-2ml)	<i>L. braziliensis</i>
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	Hidroalcoólico	<i>L. infantum</i>
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	Etanólico	<i>L. braziliensis</i>
Lamiaceae	<i>Salvia officinalis</i>	Sálvia	Etanólico	<i>L. infantum</i>
Lamiaceae	<i>Salvia officinalis</i>	Sálvia	Etanólico	<i>L. braziliensis</i>
Lamiaceae	<i>Origanum majorana</i>	Manjerona	Etanólico	<i>L. infantum</i>
Lamiaceae	<i>Origanum majorana</i>	Manjerona	Etanólico	<i>L. braziliensis</i>

Lamiaceae	<i>Origanum majorana</i>	Manjerona	Óleo essencial (15-2ml)	<i>L. infantum</i>
Lamiaceae	<i>Origanum majorana</i>	Manjerona	Óleo essencial (15-2ml)	<i>L. braziliensis</i>

2 Objetivo Geral

Investigar a presença de cães soropositivos e estabelecer a presença de infecção autóctone por *L. infantum* no município de Pelotas e cidades limítrofes e verificar a susceptibilidade de *Leishmania* spp. a extratos vegetais.

2.1 Objetivos específicos

- Revisar a situação e a expansão da leishmaniose visceral na região sul do Brasil;
- Realizar vigilância sentinela e verificar a presença da infecção em cães através do teste de triagem preconizado pelo MS - DPP® - em área considerada indene para leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul;
- Conhecer e avaliar a situação epidemiológica da leishmaniose visceral canina na cidade de Pelotas e municípios limítrofes;
- Investigar a ação de extratos vegetais sobre isolados de *Leishmania* spp. in vitro.
- Avaliar diferentes concentrações dos extratos vegetais sobre *Leishmania* spp. a fim de determinar a melhor concentração ativa.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Leishmaniose visceral na região sul do Brasil: análise crítica frente a evolução epidemiológica

Tábata Pereira Dias, Nielle Versteg, Gabriela Carvalho Jardim, Laura Vieira Borges, Karine Bastos Leal, Renata Pierobom Gressler, Fabiano Borges Figueiredo, Marlete Brum Cleff.

Publicado na revista *Research Society and Development*

Leishmaniose visceral na região sul do Brasil: análise crítica frente a evolução epidemiológica

Visceral leishmaniasis in southern Brazil: critical analysis of epidemiological evolution

Leishmaniasis visceral en el sur de Brasil: análisis critic frente a la evolución epidemiológica

Recebido: 00/01/2022 | Revisado: 00/01/2022 | Aceito: 00/01/2022 | Publicado: 00/01/2022

Tábata Pereira Dias

<https://orcid.org/0000-0003-3537-5374>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
tabata_pd@yahoo.com.br

Nielle Versteg

<https://orcid.org/0000-0001-6912-0359>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
nielle.versteg@gmail.com

Gabriela Carvalho Jardim

<https://orcid.org/0000-0003-4731-7235>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
gabrieladecarvalhojardim@gmail.com

Laura Vieira Borges

<https://orcid.org/0000-0003-2048-915X>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
lauravborges@gmail.com

Karine Bastos Leal

<https://orcid.org/0000-0002-2578-6332>
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Renata Pierobom Gressler

<https://orcid.org/0000-0003-0842-0539>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil

Fabiano Borges Figueiredo

<https://orcid.org/0000-0001-6861-0997>
Instituto Carlos Chagas, Brasil
fabiano.figueiredo@fiocruz.br

Marlete Brum Cleff

<https://orcid.org/0000-0001-9082-5185>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
marletecleff@gmail.com

Resumo

A leishmaniose visceral (LV) foi considerada indene na região sul do país até 2006, quando houve a primeira notificação de caso autóctone canino no município de São Borja no Rio Grande do Sul. Nos estados de Santa Catarina e Paraná, a autoctonia em caninos ocorreu nos anos 2010 e 2012 respectivamente. Na região sul, por ser de instalação recente, além das poucas notificações, observa-se a falta da inclusão da enfermidade nos diagnósticos diferenciais na clínica humana e veterinária, sendo a prevalência da LV maior que o registro de casos notificados. Assim, objetivou-se revisar a situação da LV humana e canina (LVC) e a presença dos vetores na região sul do país. Foram consideradas publicações oficiais sobre a doença entre 2009 e 2020 e consultadas as bases de periódicos *online*. Foram encontradas informações conflitantes quanto ao número de casos e localidade da infecção, que podem ser consequência da mudança na padronização dos registros de LV humana, da descentralização e falta de uniformidade nos registros de LVC, além da divulgação dos diagnósticos através de boletins epidemiológicos anuais desatualizados. Requer atenção da vigilância e dos pesquisadores o flebotomíneo *Lutzomyia gaminarai*, espécie endêmica no sul do Brasil, pela proximidade filogenética com a *Lutzomyia longipalpis*.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; Inquérito epidemiológico; Doenças tropicais negligenciadas.

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) was considered non-endemic in the southern region of the country until 2006 when there was the first notification of an autochthonous canine case in the municipality of São Borja in Rio Grande do Sul. The states of Santa Catarina and Paraná the autochthony in canines occurred in the years 2010 and 2012 respectively. In the southern region, due to its recent installation in addition to the few notifications, there is a lack of inclusion of the disease in differential diagnoses in human and veterinary clinics being the prevalence of VL is greater than the record on notified cases. Thus, the objective was to review the situation of human and canine VL and the presence of vectors in the southern region of the country. Official publications on the disease between 2009 and 2020 were considered and online journal data bases were consulted. Conflicting information was found regarding the number of cases and location of the infection, which maybe a consequence of the change in the standardization of human VL records, decentralization and lack of uniformity in CVL records, in addition to the dissemination of diagnoses through out dated annual epidemiological bulletins. The sandfly *Lutzomyia gaminarai*, an endemic species in southern Brazil, requires attention from surveillance and researchers due to its phylogenetic proximity to *Lutzomyia longipalpis*.

Keywords: *Leishmania infantum*; Epidemiologic survey; Neglected tropical diseases.

Resumen

La leishmaniasis visceral (LV) fue considerada indemne en la región sur del país hasta 2006, cuando hubo la primera notificación de un caso canino autóctono en el municipio de São Borja, Rio Grande do Sul. En los estados de Santa Catarina y Paraná, la autoctonía en caninos ocurrió en 2010 y 2012 respectivamente. En la región sur, como fue instalada recientemente, además de las pocas notificaciones, hay falta de inclusión de la enfermedad en los diagnósticos diferenciales en la clínica humana y veterinaria, con prevalencia de LV superior al registro de casos notificados. Así, el objetivo fue revisar la situación de la LV humana y canina (LVC) y la presencia de vectores en la región sur del país. Se consideraron las publicaciones oficiales sobre la enfermedad entre 2009 y 2020 y se consultaron las bases de datos de revistas en línea. Se encontró información contradictoria en cuanto al número de casos y localización de la infección, lo que puede ser consecuencia del cambio en la estandarización de los registros de LV en humanos, la descentralización y falta de uniformidad en los registros de LVC, además de la difusión de diagnósticos a través de boletines epidemiológicos anuales desactualizados. La mosca de la arena *Lutzomyia gaminarai*, una especie endémica del sur de Brasil, requiere la atención de la vigilancia y los investigadores, debido a su proximidad filogenética a *Lutzomyia longipalpis*.

Palabras-clave: *Leishmania infantum*; Encuesta epidemiológica; Enfermedades tropicales desatendidas.

1. Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose vetorial que tem como agente etiológico no Novo Mundo a *Leishmania infantum*, transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, tendo o cão como principal reservatório vertebrado na área urbana (Morais et al., 2020). A partir da década de 80, a LV deixou de ter caráter eminentemente rural e passou a ocorrer em áreas periurbanas e urbanas, em decorrência de processos de urbanização sem planejamento, falta de saneamento básico e empobrecimento da população, propiciando ambiente favorável para multiplicação do vetor (Bevilacqua et al., 2001).

Além disso, o trânsito de pessoas com animais infectados de áreas endêmicas para áreas indenes sem fiscalização sanitária favorece a dispersão da doença através da circulação do parasito possibilitando, uma vez que haja vetor competente, que o ciclo de transmissão se complete (Palatnik & Day, 2011). Portanto, fatores associados a alterações ambientais, naturais ou antropocêntricas, aceleram o processo de contato dos hospedeiros com vetores e parasito (Souza et al., 2008). Assim, a LV se tornou uma das principais enfermidades de importância em saúde pública, considerando sua magnitude, transcendência e pouca sensibilidade às medidas de controle (Silva et al., 2019).

O aparecimento de leishmaniose visceral humana (LVH) normalmente é precedido pela enzootia em caninos, e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (Aruda, 2009). Por esse motivo, o monitoramento de reservatórios passou a ser foco de preocupação para os órgãos de saúde pública (Silva et al., 2019). A vigilância e o controle da LV foram implantados no Brasil (BR) no ano de 2004, visando atividades em todos os eixos da cadeia da transmissão da doença (BRASIL, 2006). Entretanto, apesar das medidas de controle da infecção canina e humana serem praticadas no BR, a ocorrência de LV tem aumentado no transcorrer dos anos (Silva et al., 2019; Brasil, 2006; OMS/OPAS, 2019).

Em virtude de ser uma enfermidade emergente na região sul do país, com impossibilidade de erradicação do vetor e com tendência de expansão para municípios indenes, se faz necessário que os profissionais da área da saúde tenham conhecimento a respeito da epidemiologia da doença para que incluam em suas suspeitas clínicas a LV. Assim, foi objetivo deste trabalho revisar e fazer uma análise crítica frente à evolução da LVH, leishmaniose visceral canina (LVC) e da presença dos vetores na região sul do país, que contempla três das 27 unidades federativas do BR: Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR), levando em consideração a complexidade e relevância da enfermidade em saúde pública.

2. Metodologia

Foi realizada uma revisão narrativa crítica (Vosgerau & Romanowski, 2014) a partir de dados do sistema de saúde e literatura existentes, referentes à LV na região sul do Brasil. Assim, foram consideradas publicações oficiais sobre a enfermidade, publicadas entre 2009 e 2020, incluindo boletins das Secretarias Estaduais de Saúde (SES) do RS, SC e PR, dados epidemiológicos disponibilizados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (*Sinan net*) e Laboratórios Regionais de Saúde das unidades federadas (LACEN-UF). Ainda, foram consultados dados extraoficiais, através da literatura científica (artigos científicos, teses, dissertações), em busca da epidemiologia da doença nos estados referidos para o mesmo período, nas bases de dados Google Acadêmico, MEDLINE (*National Library of Medicine, USA*), SciELO (*Scientific Electronic Library Online*), LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) *Science Direct* e Periódicos Capes. A seguinte combinação de termos de pesquisa em inglês e português foram usadas: “leishmaniose visceral canina *and* epidemiologia *and* região sul do Brasil”, “LVC *and* epidemiologia *and* RS *or* SC *or* PR”, “leishmaniose visceral humana *and* Santa Catarina *or* Paraná *or* Rio Grande do Sul”, “LVC autóctone *or* alóctone *and* RS *or* SC *or* PR”, “*Leishmania Infantum* *or* leishmaniose visceral *or* calazar *and* RS *or* SC *or* PR”, “*Lutzomyia* *or* flebotomíneo *and* RS *or* SC *or* PR”.

Adicionalmente, outros estudos foram levantados a partir das listas de referências dos trabalhos localizados nas bases de dados. A seleção seguiu as etapas de exclusão dos duplicados, leitura dos títulos, resumos e análise na íntegra. Foram excluídos trabalhos sobre aspectos clínicos ou desenvolvimento de métodos de diagnóstico. Só foram considerados animais sororreagentes para LVC aqueles trabalhos que seguiram o protocolo vigente da época segundo o Ministério da Saúde (MS), tanto para os dados oficiais, quanto extraoficiais, sendo que até 2012 utilizou-se o teste Imunoenzimático (ELISA) para triagem seguido da Imunofluorescência Indireta (RIFI) para confirmação e, a partir de 2012 (NT conjunta nº 1 de 2011 - CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS), foi considerado o teste Imunocromatográfico *Dual Path Platform* (DPP®) para triagem e ELISA como confirmatório.

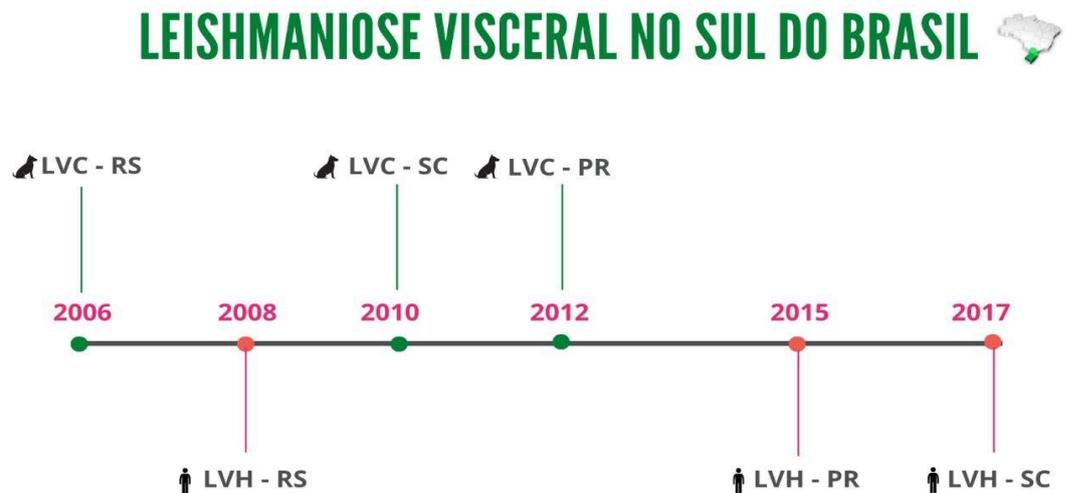
A partir dos dados de distribuição da LVH e LVC obtidos dos artigos científicos e dados oficiais, foram elaborados três mapas através do programa SIRGAS (2000).

3. Resultados e Discussão

3.1 Ocorrência de LVH e LVC na região sul do Brasil

A LV está distribuída em 21 unidades federadas do BR e foi considerada indene na região sul do país até 2006 e 2009, quando houve a primeira notificação de caso autóctone canino e humano, respectivamente, no RS (Figueiredo et al., 2012; CEVS, 2011; Azevedo et al., 2009). Em 2010 o estado de SC notificou seu primeiro caso canino e em 2017 houve registros de casos humanos (DIVE, 2018). No estado do PR a notificação do primeiro caso de LVC ocorreu mais tardiamente, em 2012, e em 2015 o registro do primeiro caso autóctone de LVH (SESA, 2018; Trench et al., 2016) como evidencia a Figura 1.

Figura 1. Cronologia da notificação dos casos autóctones de leishmaniose visceral canina e humana nos três estados da região sul do Brasil.

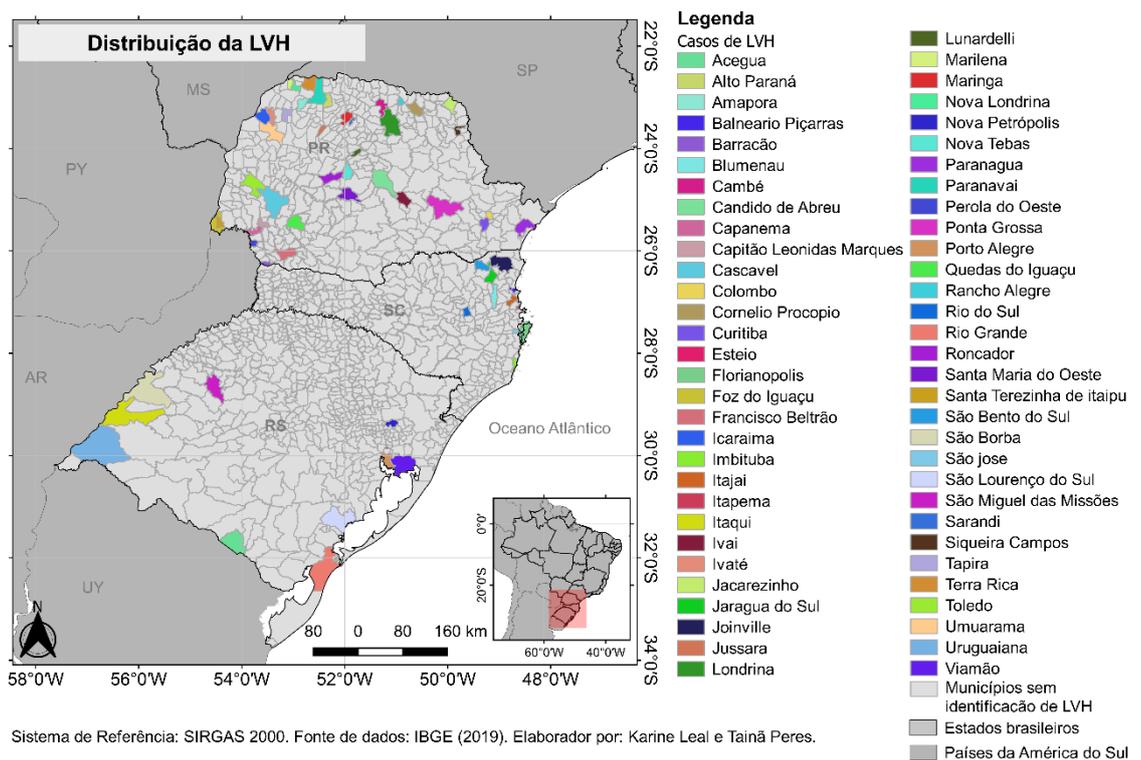


Fonte: Autores (2021).

Na região sul, a LV ocorre principalmente em cidades que fazem fronteira com Uruguai (UY), Paraguai (PY) e Argentina (AR) (Thomaz-Soccol et al., 2018; Salomón et al., 2008; Salomón et al., 2011), como pode-se observar na Figura 2. Em 2019, segundo o informe epidemiológico das Américas (OMS/OPAS, 2020) houve redução de 27% (937) dos casos de LVH no BR, no entanto houve aumento de casos na AR, no PY e no UY e foi realizada a primeira notificação pela Bolívia, embora a transmissão autóctone já tivesse sido confirmada em anos anteriores. Considerando o aumento de casos de LVH em países fronteiriços com a região sul e a eminência de casos em municípios brasileiros, fatores como a migração de trabalhadores e animais infectados para construção da rota leste-oeste do gasoduto Bolívia-Brasil, associados ao desmatamento da década de noventa, são discutidos como prováveis causas da emergência da LV no estado do PR (Thomaz-Soccol et al., 2018; OMS/OPAS, 2017;

Oliveira et al., 2006; Grill & Zurmendi, 2017). Observa-se que a LVH na região sul do BR (Figura 2) tem ampla distribuição geográfica, com destaque para o estado do PR segundo dados extraídos a partir da literatura extraoficial.

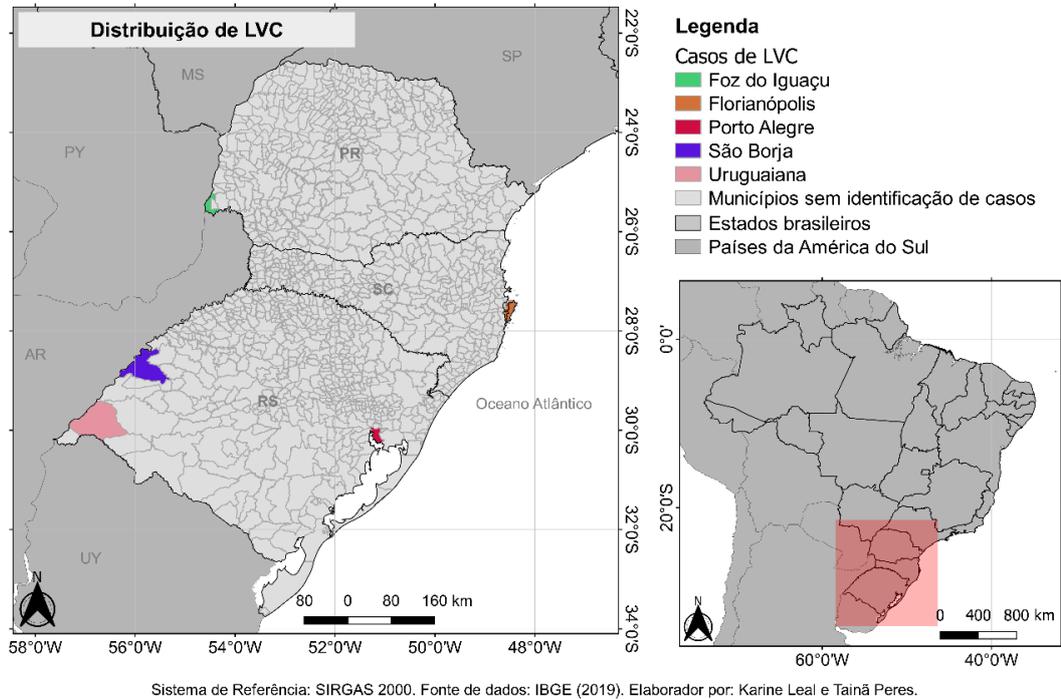
Figura 2. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral humana (LVH) na região Sul do Brasil, evidenciando casos em diferentes municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná contabilizados a partir da literatura extraoficial.



Fonte: Karine Leal & Tainã Peres (2021).

A notificação de LVH no país é realizada através do Sinan *net* após suspeita pelo profissional de saúde. Já nos casos de LVC, a notificação não segue um fluxograma definido claramente, o que evidencia na prática, em áreas não endêmicas, a falta de preparo dos municípios para agirem frente às suspeitas. A vigilância de casos de LVC ocorre de maneira ativa em áreas endêmicas, conforme preconizado pelo Plano de Prevenção e Controle da Leishmaniose Visceral - PVC-LV (Brasil, 2006) e passiva em áreas indenes. Na Figura 3 observa-se o número reduzido de municípios com casos notificados de acordo com a literatura oficial, evidenciando o alto índice de subnotificações pelos profissionais médicos veterinários aos órgãos oficiais, apesar de ser uma enfermidade de notificação compulsória (Brasil, 2006; OMS/OPAS, 2020; Zuben & Donalisio, 2016).

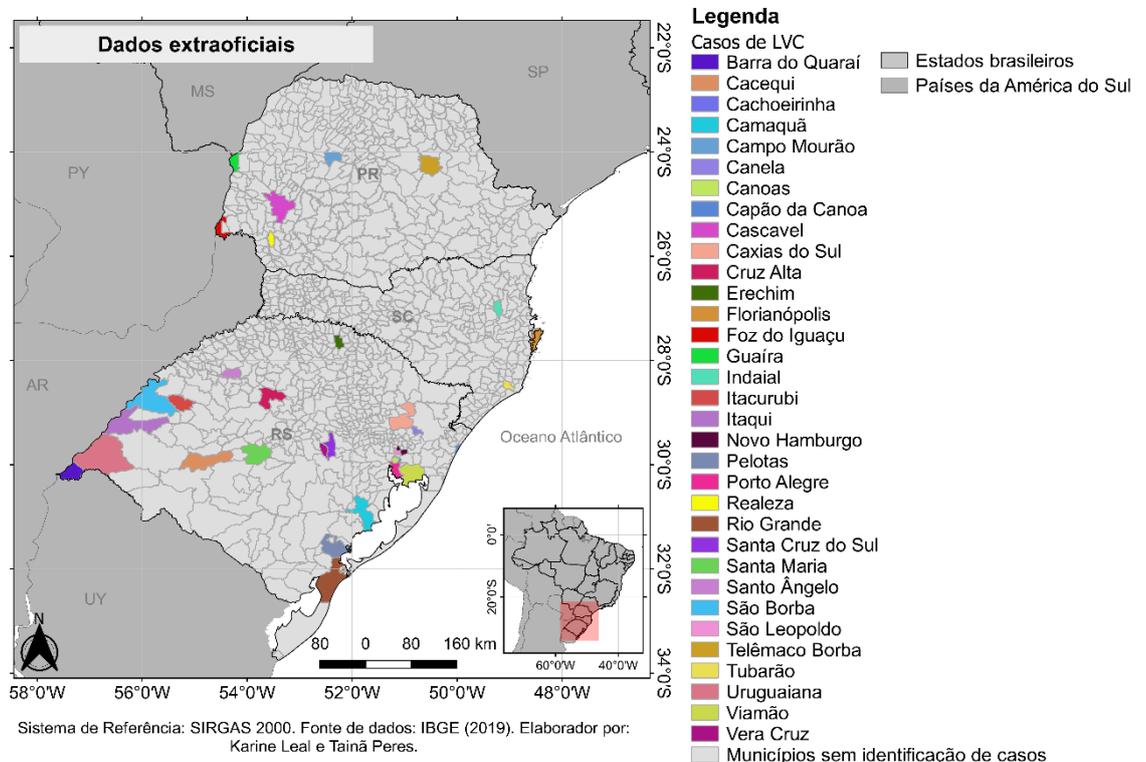
Figura 3. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral canina (LVC) na região Sul do Brasil, evidenciando casos em diferentes municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná contabilizados a partir da literatura oficial.



Fonte: Karine Leal & Tainã Peres (2021).

Na avaliação dos dados disponibilizados pela literatura extraoficial a distribuição de casos confirmados de LVC na região sul do BR (Figura 4) é superior àquela apresentada pelos dados oficiais (Figura 3), sendo o RS o estado do Sul com maior discrepância na distribuição de casos de LVC, conforme evidenciado quando comparadas as Figuras 3 e 4.

Figura 4. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral canina (LVC) na região Sul do Brasil, evidenciando casos em diferentes municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná contabilizados a partir da literatura extraoficial.



Fonte: Karine Leal & Tainã Peres (2021).

A caracterização da distribuição geográfica das enfermidades é considerada um elemento essencial na pesquisa epidemiológica e requer atenção da vigilância dos órgãos oficiais. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde /Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), as análises de dados de doenças nos níveis nacionais e subnacionais devem ser o mais desagregado possível, por isso, se faz necessário que os países identifiquem suas áreas de transmissão ao terceiro ou quarto nível administrativo, caracterizando e monitorando os focos de enfermidades em sua menor unidade geográfica (Pasquali et al., 2019).

A SES é responsável pelas políticas de saúde e seguem diretrizes do MS, este último, é responsável por determinar políticas a partir de especialistas de diferentes áreas do país. O estado repassa as exigências do MS, mas o município tem autonomia para fazer suas próprias políticas. Fato que reforça a necessidade de uma comunicação mais eficaz entre as esferas do poder quanto à transformação dos dados em informações, o que parece ser deficiente diante das incongruências encontradas nessa revisão.

3.2 LV no RS

O RS tem por limite o estado de SC ao norte, faz fronteira com a AR ao oeste e com o UY ao sul, o estado foi considerado indene para LV até 2006, quando houve a notificação do primeiro caso autóctone canino em São Borja (CEVS, 2011; Azevedo et al., 2009), localidade onde previamente já havia sido detectado o vetor *Lutzomyia*

longipalpis (Brasil, 2016). Acredita-se que o trânsito de pessoas e animais infectados da AR, país que teve notificação previamente ao RS, em Posadas-Misiones (2006) (SALOMÓN et al., 2008) e, o risco de transmissão vetorial autóctone em Virasoro-Corrientes (2008) (DIVE, 2018) sejam as explicações mais plausíveis da chegada da LVC ao estado, uma vez que animais sororreagentes foram notificados em cidades fronteiriças como São Borja (São Tomé) e Uruguaiana (Passo de los Libres) (Monteiro, 2010).

O primeiro estudo referente a hipótese da presença de *Leishmania* spp. no RS foi em 1998, os pesquisadores Pocai et al. (1998) relataram cinco prováveis casos de LVC em Santa Maria, através de histopatologia (HP) e imunohistoquímica (IHQ) de animais necropsiados oriundos de cidades vizinhas. Em 2003, Marcondes e colaboradores (2003), estudaram 204 cães do mesmo município, utilizando a técnica de RIFI, com animais relacionados aos cães descritos por Pocai et al. (1998). No entanto, todas as amostras foram negativas, não corroborando com os resultados positivos anteriores (Pocai et al., 1998). Posteriormente, utilizando a técnica de IHQ, as amostras de Pocai et al. (1998) foram reavaliadas por Monteiro et al. (2010), sendo identificadas como positivas para *Rangelia* spp. e negativas para *Leishmania* spp. corroborando com o diagnóstico de Marcondes et al. (2003).

A partir dos estudos iniciais, casos alóctones esporádicos da doença foram diagnosticados (Souza et al., 2014), servindo de alerta para regiões indenes. Nesse contexto, Krauspenhar et al. (2007) ao suspeitarem da enfermidade em um cão residente em Cruz Alta-RS, confirmaram a LVC através de ELISA e da visualização de formas amastigotas em *imprints* de medula óssea do paciente. Contudo, a partir do histórico do animal, concluiu-se que o cão poderia ter se infectado em área endêmica (Alagoas-AL) e manifestado os sinais clínicos no RS, até então, ainda considerado área livre.

Dados divulgados pelo Sinan *net* em agosto de 2020, que compilam os casos da LVH no RS no período de 2007 a 2019, contabilizaram 37 casos autóctones e seis alóctones, totalizando 43 casos notificados em 12 anos (MS, 2020). Os casos autóctones de LVH notificados estão distribuídos em São Borja, Uruguaiana, Itaqui, Porto Alegre (POA) e Viamão, já os alóctones estão distribuídos nos municípios de Caxias do Sul (1), POA (3), Rio Grande (1) e São Lourenço do Sul (1) (CEVS, 2020).

Nesse trabalho, ao realizar a busca nos sistemas do Datasus, Sinan *net* e boletins epidemiológicos (CEVS, 2011; CEVS, 2020; OIE, 2021) municipais e estaduais, as informações se mostraram conflitantes. No período de 2001-2019, contabilizou-se 37 casos autóctones no Datasus, 40 no Sinan *net* e 31 nos boletins epidemiológicos (CEVS, 2011; MS, 2020; CEVS, 2020; OIE, 2021).

Embora as divulgações dos dados ocorram em tempos diferentes conforme a esfera pública, e que informações possam ser perdidas no limbo temporal entre a notificação e confirmação dos casos, esperava-se encontrar congruência entre os dados federais (Sinan *net* e Datasus). Uma vez que casos indeterminados (quando não consta a informação oficial que permita a confirmação final do diagnóstico e/ou informações epidemiológicas) são computados a parte. Para esse mesmo período, por exemplo, há três (3) casos indeterminados, sem classificação quanto à área de infecção do paciente. Outro motivo possível para a discrepância nos resultados, no período analisado, é a metodologia de entrada dos dados pelo Sinan *net*, que até 2007 considerava apenas a UF de notificação e não a de infecção em suas divulgações.

A partir da descentralização do Sistema Único de Saúde (SUS), os serviços de saúde de alta complexidade não estão disponíveis em todos os municípios, e os usuários são encaminhados para a unidade mais próxima, onde provavelmente se deram essas notificações de LVH (Pinafo et al., 2020). Assim, podem ocorrer perdas no rastreamento de informações epidemiológicas dos pacientes.

A falta de comunicação entre as esferas de gestão do SUS dificulta o trabalho da vigilância, a percepção real da prevalência e gravidade das enfermidades, implicando diretamente nas ações de controle e prevenção locais. No entanto, não se pode desconsiderar que os sistemas de informação de saúde são recentes e estão em processo de aprimoramento (Zuben & Donalisio, 2016; Marcondes & Day, 2019; Brasil, 2005). A notificação da LVC ocorre de forma menos centralizada comparada à notificação de LVH e, apesar da enfermidade constar na lista de doenças de notificação compulsória da Organização Internacional de Saúde Animal (OIE), o fluxo para notificar as suspeitas de LVC, na prática, ainda não está bem estabelecido (Morais, 2020).

De maneira generalista, primeiramente, as suspeitas são notificadas pelo médico veterinário a instância municipal de saúde (que pode receber diferentes denominações e funções, dependendo de variáveis como o tamanho do município), como: Centro de Controle de Zoonoses – CCZ e Secretaria Municipal do Meio Ambiente, entre outras, o que causa confusão nos profissionais, principalmente em municípios considerados indenes. Este profissional do município realizará a coleta e enviará o material biológico ao LACEN-UF para realização dos testes sorológicos e notificará a SES. Com o resultado positivo, a SES notifica o MS para que as medidas profiláticas possam ser planejadas (Brasil, 2006).

Cada município possui sua própria organização quanto à compilação e divulgação dos dados, o que gera dificuldade em evidenciar a real prevalência da LVC. O que não é um problema restrito ao BR e sim a toda América Latina. Segundo Marcondes & Day (2019), isso ocorre devido à falta de publicações sobre a prevalência da LV em alguns países, limitações quanto a metodologia dos estudos que não identificam a espécie de *Leishmania* spp. envolvidas e a maioria dos animais serem assintomáticos (Morais et al., 2020).

Os casos de LVC são mais numerosos que os de LVH e denunciam a falta na contenção da sua expansão no território gaúcho. Uma vez que casos caninos precedem os casos humanos, quanto maior o número de cães infectados, existindo um vetor competente na localidade, maior o risco da exposição da população (Gontijo & Melo, 2004).

Em 2017 (últimos dados disponíveis), foram diagnosticados 477 cães sororreagentes, pelo LACEN-RS, com distribuição em 21 cidades, sendo a maior prevalência nos municípios de POA (27,9%), Uruguaiana (20,8%) e São Borja (17,6%) (Barros et al., 2018). A cidade de Uruguaiana é considerada uma zona de transmissão para a doença desde 2009, com o registro do primeiro caso autóctone de LVC (Deboni, Barbosa & Ramos, 2011) e a identificação da presença do vetor. Escobar et al. (2018), ao avaliarem 454 cães em Uruguaiana detectaram 57,48% (n= 261) de animais sororreagentes, confirmados através de testes sorológicos realizados no LACEN-RS. O município é dividido em 25 bairros, dos quais 24 tiveram notificação de casos caninos sororreagentes e, quatro deles (4/24) representam 50% do total de animais diagnosticados. Segundo os autores, os resultados podem ser associados às boas condições para adaptação do vetor, justificada pela presença de área verde maior que 10m², considerado como fator de risco (OR=2,53) para LVC (Escobar et al., 2018).

Em 2011, segundo o Centro Estadual de Vigilância em Saúde do RS (CEVS-RS), os municípios de Barra do Quaraí, Itaqui, Garruchos, Pirapó e Porto Xavier foram considerados áreas de risco para a doença e, na sequência, Itaqui notificou o primeiro caso autóctone de LVH (Sinan *net*, 2020). Em 2013, Hirschmann e colaboradores avaliaram 165 cães de 12 municípios gaúchos encontrando três cães sororreagentes em Dom Pedrito (1), Rio Grande (1) e São Francisco de Assis (1), evidenciando a circulação do parasito nesses municípios, até então não considerados para buscas epidemiológicas pela vigilância. Entretanto, não havia informação no estudo se os casos eram autóctones ou alóctones, apenas de que foram notificados aos órgãos oficiais.

Em revisão sobre a enfermidade no RS entre 2008 e 2014, Souza et al. (2014) contabilizaram 34 casos de LV incluindo LVH e LVC em boletins oficiais e literatura científica, sendo a maioria autóctone dos municípios de São Borja (11/34) e POA (7/34). É relevante destacar que 20 dos 34 casos foram encontrados na literatura científica, sendo que 24 eram LVC (70,59%) e 10 eram LVH (29,41%). Também se verifica que os casos de LVH foram precedidos pelos casos caninos, corroborando com a literatura (Gontijo & Melo, 2004).

No estudo de Riboldi et al. (2018), foram identificados cães sororreagentes em POA e cidades metropolitanas. No total foram avaliados 405 animais provenientes de canis de Canoas, São Leopoldo, Novo Hamburgo e POA, totalizando 10 cães sororreagentes apenas no DPP®, cinco somente no ELISA e dois em ambos os testes. Quanto a essa discrepância entre os testes, Laurenti et al. (2009;2014) destacaram que o DPP® apresenta acurácia de 92,7% detectando animais sintomáticos e assintomáticos em áreas endêmicas, mas não em áreas indenes, o que pode justificar a não congruência nos resultados dos testes. Testes imunocromatográficos, como o DPP®, são empregados para triagem pela praticidade a campo e por diminuir a proporção de falsos negativos, visto que as amostras são submetidas ao teste confirmatório (Figueiredo et al., 2012).

3.3 LV em SC

O estado de SC faz divisa com PR, RS e fronteira com a AR. Através de dados do Sinan *net* e Datasus, observa-se o surgimento de casos de LVH em SC desde 2010, nos municípios de Jaraguá do Sul e Florianópolis. Em 2012 e 2013 casos isolados foram identificados em Blumenau, depois em 2016 nos municípios de Joinville e Florianópolis houve notificações (Sinan *net*, 2020; Datasus, 2020). No entanto, apenas em 2017 Florianópolis notificou o primeiro caso autóctone de LVH (Sinan *net*, 2020; Datasus, 2020). Já as primeiras confirmações de casos autóctones de LVC ocorreram em 2010, no Canto dos Araçás e na Lagoa da Conceição, classificando assim a capital como área de transmissão da doença (Figueiredo et al., 2012; Steindel et al., 2013; DIVE, 2010).

Florianópolis possui característica ambiental de Mata Atlântica, sendo favorável à proliferação dos flebotomíneos nativos (DIVE, 2018). Segundo o Guia de Orientação da Vigilância da LVC de SC (2018), o favorecimento da proliferação das espécies nativas de vetores na região, supostamente explicaria a manutenção da transmissão da enfermidade entre os cães, uma vez que não foi identificado a *Lu. longipalpis*.

Ao realizar a busca dos dados oficiais de LVH de SC no período de 2001-2019, observou-se discrepância entre os dados do Sinan *net* e Datasus, semelhante à situação do RS. No Datasus foram contabilizados 12 casos autóctones, três (3) alóctones e quatro (4) indeterminados, totalizando 19 casos de LVH no estado. No Sinan *net*, a totalidade de casos foi de seis (6), observando-se discrepância de 50% dos casos autóctones entre os dois sistemas, indicando a necessidade de melhorar o fluxo de informações e divulgação dessas, que servem de base para o planejamento de ações preventivas. Segundo o Datasus, os municípios que contam com notificações de

casos autóctones em SC são nove: Balneário Piçarras, Blumenau, Florianópolis, Itajaí, Itapema, Jaraguá do Sul, Joinville, Rio do Sul e São José.

O Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Florianópolis, realizou um inquérito sorológico em cães em 2017, incluindo 36 bairros da cidade e detectou 339 animais soropositivos (~3,4%), indicando a expansão da doença (Pasquali et al., 2019) por toda a ilha. Especialmente no extremo oeste de Santa Catarina, região de fronteira com Argentina, há transmissão autóctone de *L. infantum*, confirmada por pesquisas em cães presentes na região, os quais serviriam como sinalizadores da existência do ciclo epidemiológico do parasito. Dos 252 cães analisados por Maziero e colaboradores (2014), 17,1% (n=43) foram positivos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 19,8% (n=50) por ELISA e 21,8% (n=55) apresentaram fragmentos de DNA do protozoário por PCR. Do total, 19% (n=48) dos animais foram positivos por dois métodos (sorológico e molecular) e destes, 16,7% (n=42) apresentaram manifestações clínicas compatíveis com LVC.

A Diretoria de Vigilância Epidemiológica de SC (DIVE, 2018), contabilizou em Florianópolis 547 cães sororreagentes no período de 2011 a 2019. Estudos recentes indicam que as cidades de São Miguel do Oeste e Descanso, região oeste de SC, são municípios silenciosos (Maziero et al., 2014) e vulneráveis para ocorrência da enfermidade (DIVE, 2018). Florianópolis é conhecida pelo turismo, com fluxo de pessoas de diversas partes do país anualmente. Além do fluxo migratório intenso, possui densa mata atlântica próxima à região de praias, onde permanecem os turistas. A circulação de pessoas e animais, oriundos de áreas endêmicas como dito anteriormente, associado à falta de controle sanitário interestaduais desses animais e, ao contato com possíveis vetores competentes em áreas de mata, podem viabilizar a ocorrência do ciclo de transmissão da LV, inclusive com a adaptação de novos vetores (Dias et al., 2013).

3.4 LV no PR

O estado do PR tem por limites os estados de SC, Mato Grosso do Sul (MS) e São Paulo (SP) ao norte, além de fazer fronteira com a AR ao sul e PY a oeste. O primeiro caso de LVH autóctone registrado no PR foi em 2015, em Foz do Iguaçu (Junior et al., 2015), cidade que faz divisa com PY e AR, estando situada na tríplice fronteira. Entretanto, casos alóctones foram diagnosticados no estado desde 2001 (Sinan *net*) e, desde 2012 já havia sido identificado o vetor *Lu. longipalpis* no município de Foz do Iguaçu (SESA, 2018).

Diferente do que era esperado pelos pesquisadores quanto à instalação da LV no PR, a doença não teve sua dispersão epidemiológica pela contiguidade de epidemias de outras regiões, sendo em 2012 notificada a presença de vetores na região da tríplice fronteira, longe das regiões epidêmicas (Pasqualli, et al., 2019). Ainda, Pasqualli et al. (2019), inferem que a dispersão de *L. infantum* no centro sul do BR pode ter ocorrido segundo três diferentes rotas: da Bolívia aos estados do Mato Grosso (MT), MS e SP através da construção do gasoduto Bolívia-Brasil de 1998 a 2005; do PY para o BR após 2012, através de Foz do Iguaçu e Santa Terezinha do Itaipu ou ainda, que houve o surgimento de um novo *cluster* de *L. infantum* no oeste catarinense e ocorreu sua dispersão para o sul do PR a partir de 2013.

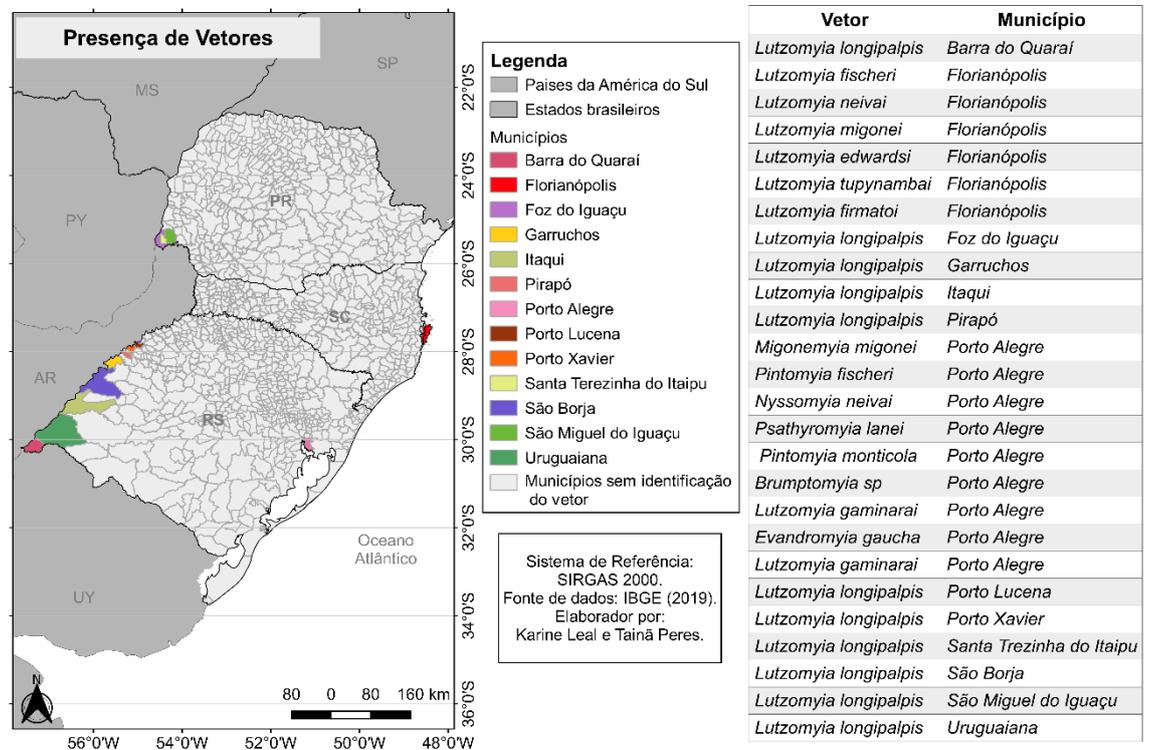
Dados do Sinan *net* no período de 2001-2019, contemplam 28 casos autóctones de LVH no PR e 15 alóctones, totalizando 43 casos. E novamente, quando busca-se a comparação dos dados não há congruência entre estes, encontrando-se 62 casos notificados no Datasus sendo 20 autóctones, 25 alóctones e 17 indeterminados.

Em 2008, foram avaliadas 364 amostras sanguíneas de cães no CCZ de São José dos Pinhais, região metropolitana de Curitiba, os animais não apresentavam sinais clínicos compatíveis com a doença, sendo diagnosticado um cão sororreagente (Frehse, 2008). Tomaz-Soccol et al. (2009), diagnosticaram 14 cães sororreagentes de 20 animais suspeitos, no entanto, esses apresentavam sinais clínicos característicos da enfermidade, diferentemente dos cães avaliados por Frehse et al. (2008), ainda os animais tinham histórico de viagens para áreas endêmicas, considerados casos importados de Minas Gerais, MT, MS, Tocantins Sergipe e Ceará (Thomaz-Soccol et al., 2009).

3.5 Distribuição geográfica dos flebotomíneos identificados na região sul do Brasil

As espécies do gênero *Lutzomyia* spp. estão distribuídas em todo país, sendo evidenciadas na região sul do BR em 2008 (Souza et al., 2008; Brasil, 2016). A Figura 5 apresenta a distribuição geográfica dos flebotomíneos identificados na região sul do BR. Observa-se que a espécie *Lu. longipalpis* é a mais comum entre os municípios, sendo a mais ocorrente no RS, embora seja encontrada também no PR, onde foram verificados apenas vetores dessa mesma espécie. Os municípios de Florianópolis e POA apresentam maior diversidade de flebotomíneos nativos identificados, sem a identificação da *Lu. longipalpis*, principal espécie incriminada como vetor da LV.

Figura 5. Mapa da região sul do Brasil evidenciando a distribuição geográfica dos flebotomíneos identificados nos municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.



Fonte: Karine Leal & Tainã Peres (2021).

Em POA o vetor *Lu. longipalpis* não foi identificado, como ocorreu em outros municípios gaúchos com notificação de LVC/LVH, como São Borja e Uruguaiana. Segundo informação divulgada no boletim municipal de

saúde do RS em junho de 2017, o monitoramento do vetor na cidade é realizado desde 2010, quando foram observados os primeiros casos de LVC no bairro Agronomia e em partes da região sul de POA.

Eckert & Souza (2010), em estudo realizado na cidade de Estrela (RS), observaram que as características ambientais onde foram encontrados flebotomíneos eram de mata nativa, junto a instalações comerciais e habitações humanas. A presença de vetores (Souza et al., 2015) também foi detectada em áreas do peridomicílio, com presença de vegetação de mata nativa em Santa Cruz do Sul e, em áreas de mata ciliar no distrito de Santa Bárbara, município de Caçapava do Sul (Souza et al., 2015).

Segundo Souza et al., (2014), após inquérito entomológico foram identificados no bairro Agronomia em POA diversas espécies de flebotomíneos e, em 2015 confirmado o isolamento de *L. infantum*, ano em que a espécie *Nyssomyia neivai* representou 93,16% dos exemplares amostrados. No período entre 2003 e 2016, não foi encontrada *Lu. longipalpis* nos bairros de POA com mata nativa (Souza et al., 2017). Na capital gaúcha, assim como Florianópolis, encontram-se outros vetores que requerem mais investigações quanto a sua competência na transmissão da enfermidade. *Migonemyia migonei* e *Pintomyia fischeri* são exemplos de espécies com alto grau de antropofilia (Galvis–Ovallos et al., 2017). Essas espécies representaram juntamente com *Ny. neivai* os maiores quantitativos de captura em levantamentos realizados em POA (Steindel et al., 2013; DIVE, 2010; DIVE, 2018; Guimarães et al., 2016) e em Florianópolis (Palatnik & Day, 2011).

Segundo Guimarães et al. (2016), *Mg. migonei* faz parte das espécies de flebotomíneos permissivas e competentes a diversas espécies de *Leishmania* spp., uma vez que verificaram em seus estudos que esta é altamente suscetível ao desenvolvimento de *L. infantum* na América Latina, o que coincide com a alta antropofilia e abundância em focos de LV onde ocorre a infecção natural. Segundo Galvis-Ovallos et al., (2017), considerando que *Pi. fischeri* tem grande atração pelos caninos, a sua susceptibilidade para infecção por *L. infantum*, sua expectativa de vida infectante e a predominância da espécie em Embu das Artes (SP), são características que evidenciam o seu potencial como vetor do agente etiológico da LV.

Diferente dos municípios do RS (com exceção de POA) e PR, em Florianópolis (SC) não foi encontrado o *Lu. longipalpis*, sugerindo que outra(s) espécie(s) de flebotomíneo(s) atuem como transmissores de *L. infantum* na região. O inquérito entomológico realizado na época do surto de LV em Florianópolis, revelou 12 espécies de flebotomíneos e, foram identificados por PCR, fragmentos de DNA de *Leishmania* spp. em exemplares de *Pi. fischeri*, *Mg. Migonei* e *Ny. Neivai*. A presença do DNA do protozoário nos flebotomíneos não significa que exista a capacidade vetorial de transmissão, ou seja, que haja a modificação no trato digestivo para a forma infectante de *Leishmania* spp. (Junior et al., 2015), mas, enfatiza a necessidade do monitoramento dessas espécies.

A introdução da LV no sul do Brasil é um evento multifatorial, que ocorreu quase simultaneamente e se espalhou rapidamente para diferentes áreas, indicando uma adaptação do parasito e do vetor as condições locais. Desta forma, é urgente o levantamento entomológico e soropidemiológico atualizado em áreas de transmissão, a fim de verificar as espécies de flebotomíneos com capacidade vetorial.

4. Conclusões

A LV requer um olhar regionalizado, fator que compõe a complexidade do seu ciclo epidemiológico. A prevalência da LVC em áreas endêmicas é consideravelmente maior do que a doença clínica aparente, e um dos

motivos é a falta da transformação dos dados em informações úteis, para que o planejamento das ações de saúde seja de qualidade, a fim de melhorar a compreensão do contexto e senso de urgência na tomada de decisões.

Informações obtidas nos sistemas do Datasus, *Sinan net*, boletins epidemiológicos municipais e estaduais e literatura científica se mostraram conflitantes em relação a notificação da LVH e LVC no sul do país.

O flebotomíneo *Lu. gaminarai* é uma espécie endêmica da região sul do Brasil e já foi coletada no peridomicílio no município de POA. Esta espécie não é incriminada como vetor de *Leishmania* spp., no entanto, requer atenção dos pesquisadores e da vigilância entomológica, uma vez que apresenta proximidade filogenética com a *Lu. longipalpis*.

É oportuno que sejam implantadas medidas visando a educação epidemiológica de profissionais da saúde em relação as doenças negligenciadas, entre elas a LV. Nesse contexto, incluir as áreas consideradas indenes no planejamento é relevante, uma vez que os profissionais que atuam nessas áreas podem detectar a ocorrência precoce da enfermidade e através da notificação de casos possibilitar a implementação de medidas sanitárias para mitigação das consequências da doença.

Agradecimentos

Agradecimento aos órgãos de fomento a pesquisa Capes, CNPq, ainda a pós-graduação em Veterinária da UFPel e ao Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Paraná pela parceria firmada para realização do projeto de mestrado.

Referências

- Aruda, M. M. (2009). Leishmanioses. In: Nápoli, L., Sartor, D.R., Martins, J.P. (Orgs). *Programa de Zoonose Região Sul: Manual de zoonoses (p68-90)*. Curitiba: Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná, p. 68-90.
- Azevedo, J. S. C., Esmeraldino A. T., Ávila V.P.F., Witz, M. I., Fischer, C. D. B. & Tartarotti, A. L. (2009). Leishmaniose visceral canina autóctone no município de São Borja, Rio Grande do Sul, Brasil: relato de caso. *Veterinária em Foco*. 7(1), 52-61. http://bichosonline.vet.br/wp-content/uploads/2015/03/revista_v7_n1.pdf#page=53
- Barros, C. C., Souza, G. D., Gallas, M. & Silveira, E. F. (2018). Levantamento de casos registrados de leishmaniose visceral canina (LVC) em 2017 no Rio Grande do Sul. *XXIV Salão de Iniciação Científica e Tecnológica – EXPOULBRA*.
- Bevilacqua, P. D., Paixão, H. H., Modena, C. M., & Castro, M. C. P. S. (2001). Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53(1), 1-8. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000100001>
- Brasil (Ministério da Saúde). (2006). *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. (1a ed.)* Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil (Ministério da Saúde). (2016). *Guia de Vigilância em Saúde. (1a. ed.)* Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. (2005). Sistemas de Informações em Saúde e Vigilância Epidemiológica. In: Brasil. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Centro Estadual de Vigilância em Saúde (2011). *Boletim Epidemiológico: Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul*.13(1). Porto Alegre, RS.
- Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS). (2020). Situação epidemiológica/dados – Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Restaurado de: <https://www.cevs.rs.gov.br/lvh-situacao-epidemiologica-dados>.
- Deboni, S., Barbosa, M. & Ramos, R. (2011). Leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul. *Boletim Epidemiológico- Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul*. 13(1-8).
- Dias, E. S., Michalsky, E. M., Nascimento, J. C., Ferreira, E. C., Lopes, J. V. & Dias, C. L. D. F. (2013). Detection of *Leishmania infantum*, the Etiological Agent of Visceral Leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a Putative Vector of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Vector Ecology*. 38(1), 193-196. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12028.x>
- Eckert, J. & Souza, G.D. (2010). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Estrela e primeiro registro de *Lutzomyia pascalei* (Coutinho & Barretto) no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências*. 8(4). <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1555/985>
- Escobar, T. A., Döwich, G., Cantele, L. C. Z., Duarte, C. A. & Lübeck, I. (2018). Risk factors associated to canine visceral leishmaniasis in Uruguaiana city, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. 39(1), 211-220. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n1p211>

- Estado de Santa Catarina. Superintendência de Vigilância em Saúde Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DIVE). (2018). *Guia de Orientação Vigilância da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)*. http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia_Basico_de_Orientacao_LVC_2018.pdf.
- Figueiredo, F. B., Lima, F. E. F., Tomio, J. E., Indá, F. M. C., Corrêa, G. L. B. & Madeira, M. F. (2012). Leishmaniose Visceral Canina: dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40(1), 4-7. <https://www.redalyc.org/pdf/2890/289021814017.pdf>
- Frehse, M. S. (2008). Vigilância Ativa da Leishmaniose Visceral Canina no Município de São José dos Pinhais – PR. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Paraná. UFPR. Curitiba, Brasil. <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/16285>
- Galvis-Ovallos, F., Da Silva, M. D., Bispo, G. B., De Oliveira, A. G., Neto, J. R., Malafronte, R.D. & Galati, E. A. (2017). Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. *Parasite*, 24(2). doi: 10.1051/parasite/2017002
- Gontijo, C. M. F. & Melo, M. N. (2004). Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3), 338-349. <https://www.scielo.br/j/rbepid/a/R8mCHPzNCQw6n4npXBRxCtt/?format=pdf&lang=pt>
- Junior, A. B., Pasquali, A. K. S., Leandro, A. S., Pozzolo, E. M., Navarro, I. T., Chiyo, L., Breganó, R. M., Dias, R.C.F., Friedrich, R., Freire, R.L. & Thomaz-Soccol, V. (2015). *Manual Técnico de Leishmanioses Caninas. Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral*. (pp. 1-44). Paraná: Conselho Médico Veterinário Regional do Paraná.
- Grill, F. & Zurmendi, M. (2017). Leishmaniasis visceral en Uruguay. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 88(1), 32-38. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S1688-12492017000100007&script=sci_arttext&tlng=pt
- Guimarães, V. C. F. V., Pruzinova, K., Sadlova, J., Volfova, V., Myskova, J., Filho, S.P.B. & Volf, P. (2016). *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*, 9 (1), 1-6. doi:10.1186/s13071-016-1444-2
- Hirschmann, L. C. (2013). Leishmaniose visceral canina: Investigação clínica, laboratorial e epidemiológica em cães de canis de doze municípios do Rio Grande do Sul. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Pelotas – UFPel. Pelotas, RS, Brasil. <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/handle/123456789/2329>
- Krauspenhar, C., Beck, C., Sperotto, V., Silva, A.A., Bastos, R. & Rodrigues, L. (2007). Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 37 (3), 907-910. doi:<https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000300052>
- Lainson, R., Rangel, E. F. (Orgs). (2003). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro. Editora da Fiocruz.
- Laurenti, M. D. (2009). Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *Bepa-Boletim Epidemiológico Paulista*, 6 (67),13-23.
- Laurenti, M. D., De Santana, M.V., Tomokane, T.Y., De Lucca, H. R. L. Aschar, M, Souza, C. S. F. & Da Matta, V. L. R. (2014). Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine sero diagnosis in área of visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 205 (3-4), 444-450. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.002>
- Marcondes, C. B., Pirmez, C., Silva, E. S, Laurentino-Silva, V., Steindel, M., Santos, A.J., Smaniotto, H.& Donetto, A. (2003). Levantamento de leishmaniose visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36 (4), 499-501. doi: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000400011>
- Marcondes, M. & Day. M. J. (2019). Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Research in Veterinary Science*, 123, 261-272. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>
- Maziero, N. (2014). *Ocorrência de Leishmania infantum Em Cães Do Extremo Oeste Do Estado De Santa Catarina, Brasil* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Paraná. UFPR. Curitiba, Brasil. <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/42377?show=full>
- Ministério da Saúde. (2011). *Nota Técnica Conjunta nº01/2011* - Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) – CGDT-CGLAB/DEVIT. Brasília: Diário Oficial da União.
- Ministério da Saúde. (2020). Sistema de Informação de Agravos de Notificação (*Siman net*).
- Ministério da Saúde. (MS) (2020). *Datasus*.
- Monteiro, S. G. Stainki, D. R., Dalmolin, F., Braccini, E. T., Pinto Filho, S. T. L., Gaira, M. S., ... & Gontijo, C. M. F. (2010). Detecção de *Leishmania infantum* em cão no município de Uruguaiana, RS: uma contribuição para a discussão das leishmanioses na região sul do Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, 17 (4), 497-502. <https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA387606858&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=01025716&p=AONE&sw=w&userGroupName=anon%7E880993fd>
- Morais, N. B. D, Júnior, F. E. F. D. L., Filho, G. V. A., Costa, J. R. R., Camargo, L. E. B. D. & Romijn, P.C. (2020). Aspectos gerais da doença. In. Brasil (Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV). *Guia de Bolso Leishmaniose Visceral* (p.10-18). Brasília: Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária.
- Oliveira, A. G., Galati, E. A. B., Oliveira, O., Oliveira, G. R., Espindola, I. A. C, Dorval, M. E. C. & Brazil, R. P. (2006). Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101 (8), 869-874. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000800008>.
- Organização Mundial da Saúde/Organização Pan-Americana da Saúde. (2020). *Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas*. (9a ed.). Washington, D.C. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>

- Organização Mundial da Saúde/Organização PanAmericana da Saúde. (2019). *Informe Epidemiológico das Américas. Informe de Leishmanioses* (7a ed.). Washington, D.C. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/Leishreport2019_eng.pdf?sequence=9&isAllowed=y
- Organização Mundial da Saúde/Organização PanAmericana da Saúde. (2017). *Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. (5a ed.)*. Washington, D.C. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34111/informe_leishmaniasis_5_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- Palatnik, D. S. C. B. & Day, M.J. (2011). One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors*, 4 (1), 1-10. doi: doi:10.1186/1756-3305-4-197
- Pasquali, A. K. S., Baggio, R. A., Boeger, W. A., González-Britez, N., Guedes, D. C., Chaves, E. C. & Thomaz-Soccol, V. (2019). Dispersion of *Leishmania (Leishmania) infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13 (8), 1-20. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007639>
- Pinafo, E., Carvalho, B. G., Mendonça, F. F., Domingos, C. M. & Silva, C. R. (2020). Problemas e estratégias de gestão do SUS: a vulnerabilidade dos municípios de pequeno porte. *Ciência & Saúde Coletiva*, 25 (5), 1619-1628. doi: <https://doi.org/10.1590/1413-81232020255.34332019>
- Pocai, E., Frozza, L., Headley, S. A., Graça, D. L. (1998). Leishmaniose Visceral (Calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciencia Rural*, 28 (3), 501-505. doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-84781998000300025>
- Riboldi, E., Carvalho, F., Romão, P. R. T., Barcellos, R. B., Bello, G. L., Ramos, R. & Dallegre, E. (2018). Molecular method confirms canine *Leishmania* infection detected by serological methods in non-endemic área of Brazil. *The Korean Journal of Parasitology*, 56 (1), 1-19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5858662/>
- Salomón, O. D., Basmajdian Y., Fernández M. S. & Santini M. S. (2011). *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 (3), 381-382. <https://www.scielo.br/j/mioc/a/n58R5WtnMt7hNx3Q5DJF5r/?format=pdf&lang=en>
- Salomón, O. D., Sinagra, A., Nevot, M. C., Barberian, G., Paulin, P., Estevez, J. O. & Estevez, J. (2008). First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103 (1), 109-111. <https://www.scielo.br/j/mioc/a/hSWH4mzhQwKtzCNkNnyvmC/?format=pdf&lang=en>
- Secretaria de Estado Saúde de Santa Catarina (DIVE). (2018). *Guia de orientação para a vigilância da leishmaniose visceral canina (LVC)*. Santa Catarina: Sistema Único de Saúde Superintendência de Vigilância em Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Gerencia de Vigilância de Zoonoses e Entomologia.
- Secretaria de Saúde do Estado de Santa Catarina. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Gerência de Controle de Zoonoses (DIVE). (2010). *Nota técnica n.º 008/2010*. Florianópolis, SC.
- Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. (SESA) (2018). *Alerta epidemiológico N° 01/2018 - DVDTV/CEVA/SVS*. Superintendência de Vigilância em saúde. Vigilância Epidemiológica da Leishmaniose Visceral Humana no Paraná. Paraná.
- Silva, F. T., Silva G. O., Azevedo, G. H. M., De Sá, C. B. N., Coutinho, O. M. V. C., Arrais, B. M. & Silva, R. S. (2019) Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral no Estado do Tocantins no Período de 2007 a 2017. *Revista de Patologia do Tocantins*, 6 (2), 5-9. Doi: 10.20873/ufv.2446-6492.2019v6n2p5
- Souza, G. D., Gonçalves B. R. D., Flores, C. F., Rangel, S., Santos, E., Vilela M., Azevedo A. & Rangel, E.F. (2008). Monitoramento entomológico dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do município de Porto Alegre, RS. *Boletim Epidemiológico* 39: 5-6. Porto Alegre.
- Souza, A. P. L., Jesus, J. R. & Teixeira, M. C. (2014). Estudo retrospectivo da epidemiologia da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul: revisão de literatura. *Veterinária em Foco*, 11 (2), 112-118. <https://pesquisa.bvsalud.org/porta/resource/pt/vti-649>
- Souza, G.D., Flôres, C.F. & Bello, M.I.M.R. (2015). Estudo da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do bairro Belém Velho - Porto Alegre - RS. *Boletim Epidemiológico* 56.
- Souza, G. D. Estudo dos Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área com Leishmaniose Visceral Humana, no Bairro Morro Santana - Porto Alegre- RS. *Boletim Epidemiológico* 2017; 65(1): 5-7.
- Steindel, M., Menin, A., Evangelista, T., Stoco, P.H., Marlow, M.A., Fleith, R.C. & Grisard, E. C. (2013) Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33 (4), 490-496. <https://www.scielo.br/j/pvb/a/Jg8grVqpbwwVyPDVwHZ9BWL/?format=pdf&lang=en>
- Thomaz-Soccol, V. Gonçalves, A. L., Piechnik, C. A., Baggio, R.A., Boeger, W. A., Buchman, T. L. & Salomon, O. D. (2018). Hidden danger: Unexpected scenario in the vector-parasite dynamics of leishmaniasis in the Brazil side of triple border (Argentina, Brazil and Paraguay). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12 (4). doi: 10.1371/journal.pntd.0006336
- Tomaz-Soccol, V., Castro, E. A., Navarro, I. T., Farias, M. R., Souza, L. M., Carvalho, Y., Bispo, S. & Luz, E. (2009). Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: Implicações epidemiológicas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18 (3), 46-51. doi: <https://doi.org/10.4322/rbvpv.01803008>

Trench, F. J. P., Ritt, A. G., Gewehr, T. A., Leandro, A. S., Chiyo, L., Gewehr, M. R., Ripoli, M. & Thomaz-Soccol, V. First Report of Autochthonous Visceral Leishmaniosis in Humans in foz Do Iguaçu, Paraná State, Southern Brazil. (2016). *Annals of Clinical Cytology and Pathology*, 2 (6), 1041. <https://www.jscimedcentral.com/ClinicalCytology/clinicalcytology-2-1041.pdf>

Vosgerau, D. S. A. R. & Romanowski, J. P. (2014). Estudos de revisão: implicações conceituais e metodológicas. *Revista de Diálogo Educacional*, (14)41, 165 -189. doi: 10.7213/dialogo.educ.14.041.DS08

World Organization for Animal Health Listed diseases, infeccions and infestations in force in 2021. (2021). <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2021>.

Zuben, A. P. B. V. & Donalisio, M. R. (2016). Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. *Caderno de Saúde Pública*, 32 (6). doi: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00087415>

3.2 Artigo 2

Inquérito Soroepidemiológico canino em área indene para leishmaniose visceral (LVC) no sul do Rio Grande do Sul

Tábata Pereira Dias, Gabriela Carvalho Jardim, Tainã Costa Peres, Nielle Versteg, Fabiano Borges Figueiredo, Marlete Brum Cleff.

Submetido à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

LVC em área indene

Inquérito Soroepidemiológico de leishmaniose visceral canina (LVC) no sul do Rio Grande do Sul

Tábata Pereira Dias

Universidade Federal de Pelotas

Gabriela de Carvalho Jardim

Universidade Federal de Pelotas

Tainã Costa Peres

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Nielle Versteg

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Fabiano Borges Figueiredo

Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Carlos Chagas

Marlete Brum Cleff

Universidade Federal de Pelotas

E-mail do autor: tabata_pd@yahoo.com.br

LVC em área indene

Inquérito Soroepidemiológico de leishmaniose visceral canina (LVC) no sul do Rio Grande do Sul

RESUMO

Casos de leishmaniose visceral (LV) em humanos costumam preceder casos caninos, sendo assim, os inquéritos soroepidemiológicos dos animais em áreas indenenes representam uma ferramenta essencial para realizar a vigilância epidemiológica. O município de Pelotas é considerado indene para LV mas apresenta fatores de risco para instalação da enfermidade. Assim, o objetivo desse estudo, foi realizar inquérito sorológico com o teste imunocromatográfico de triagem DPP® em cães de Pelotas-RS e cidades limítrofes. Entre março de 2019 e janeiro de 2021 foram coletadas amostras de animais dos canis municipais de Jaguarão e Arroio Grande, do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFPel e amostras de cinco clínicas veterinárias contemplando seis municípios da região sul do RS. Dentre os 772 cães investigados sorologicamente, dez animais foram reagentes, totalizando 1,29% (10/772) do total de amostras. As amostras positivas foram de animais coletados nos municípios de Pelotas, Capão do Leão, Jaguarão e São Lourenço do Sul, todos considerados indenenes para a LVC. Assim, reitera-se a necessidade e relevância da vigilância sentinela para o auxílio no diagnóstico precoce da instalação da LV em municípios considerados indenenes, permitindo o planejamento de ações preventivas e do controle da enfermidade.

PALAVRAS-CHAVE: TR-DPP®, *Leishmania infantum*, indene, Pelotas.

PATROCÍNIO: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de importância mundial com tríade epidemiológica complexa e de difícil controle. É considerada uma enfermidade emergente por estar em franca expansão geográfica para áreas antes consideradas indenes, como o Rio Grande do Sul (RS) (OPAS/OMS, 2018). A emergência da LV vem sendo associada a fatores demográficos, ecológicos, ambientais, resistência e seleção do protozoário à terapêutica disponível, resistência dos vetores aos inseticidas, rapidez e intensidade de mobilização das populações no processo de globalização e desigualdades sociais, principalmente nos complexos urbanos que favorecem a disseminação da enfermidade (BRASIL, 2006). O Brasil possui um plano de prevenção e controle frente à LV conhecido como PVC-LV baseado em três pilares principais: diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos; diagnóstico e eutanásia dos reservatórios caninos; vigilância e controle dos vetores através de inquéritos entomológicos e controle químico (BRASIL, 2006). A notificação da suspeita da LV tanto para humanos quanto para caninos é compulsória (MORAES, 2020). Na prática, o fluxo para realizar a notificação da suspeita de leishmaniose visceral canina (LVC) não está bem estabelecido, principalmente em áreas não endêmicas, o que evidencia a falta de preparo dos municípios para agirem frente às suspeitas.

A vigilância de casos de LVC ocorre de maneira mais ativa em áreas endêmicas, conforme preconizado pelo PVC-LV através de inquéritos soropidemiológicos, no entanto, mesmo assim o índice de subnotificações é alto nessas regiões, principalmente devido a principal estratégia de controle do reservatório canino estipulada pelo Ministério da Saúde (MS) desde o surgimento da doença no país, ou seja, a eutanásia de animais infectados e/ou doentes (DANTAS-TORRES *et al.*, 2019; GRISOTTI & AMORIM, 2020).

O cão é o principal reservatório urbano da *Leishmania* sp. (MARCONDES & ROSSI, 2013) e apresenta intenso parasitismo cutâneo, servindo assim, como eficiente fonte de infecção

para os flebotomíneos (BRASIL, 2006). Segundo Quinell *et al.*, (1997), um único animal infectado pode ocasionar a infecção de até seis animais, além disso, a LVC costuma preceder a leishmaniose visceral humana (LVH). Pelos motivos expostos, considera-se que a infecção canina e os casos de LVC servem como indicadores da circulação do parasito e/ou sua transmissão (BRASIL, 2006). Sendo assim, o monitoramento dos indicadores constitui uma ferramenta essencial para vigilância da enfermidade, assim como a avaliação das medidas de controle (VASCONCELOS *et al.*, 2013) e está alinhado ao conceito de saúde única (*One Health*) (MIRÓ & LOPES-VÉLEZ, 2018).

A busca por melhorias nas técnicas de diagnóstico sorológico da LVC, diante do desafio para a saúde pública que esta representa, levou a alteração no protocolo instituído pelos órgãos oficiais. Até 2011 era recomendado pelo Ministério da Saúde (MS) a realização do teste sorológico imunoenzimático (ELISA) para triagem, e o teste sorológico de imunofluorescência indireta (RIFI) para confirmação dos casos de LVC, o que tornava o diagnóstico mais oneroso e demorado, além de requerer instalações laboratoriais e mão de obra qualificada (BRASIL, 2006). Visando a melhor operacionalização dos inquéritos soropidemiológicos a campo pelos agentes de saúde, dentre outros motivos, foi desenvolvido o teste sorológico *Dual Path Platform* - DPP®, utilizado para triagem dos animais em substituição ao ELISA que passou a ser o teste confirmatório (BRASIL, 2011). O DPP® apresenta alta sensibilidade e objetiva diminuir o número de diagnósticos falsos negativos, sendo um teste impregnado com antígeno recombinante rK28 (uma quimera resultante da combinação de antígenos K9, K26 e K39) de *L. infantum* (PATTABHI *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2018). Apesar das características e da facilidade de aplicação, o teste imunocromatográfico é motivo de polêmica e discussões quanto a sua acurácia, principalmente no que diz respeito à sua sensibilidade para detecção de animais infectados e assintomáticos (GRIMALDI *et al.*, 2012).

O controle da enfermidade nos municípios é realizado através dos inquéritos soroepidemiológicos organizados pela vigilância epidemiológica, mas essa operação não ocorre com a frequência adequada, não conseguindo detectar e prevenir a instalação da doença em municípios sem notificações prévias, naqueles considerados indenes, como é o caso de Pelotas no estado do Rio Grande do Sul (RS) e região. Esse fato deve-se principalmente à falta de insumos disponíveis para os municípios que, na visão da gestão administrativa da saúde, possui outras prioridades. Apesar de compreensível essa medida, é importante ressaltar que a LV não é uma doença passível de erradicação após sua instalação e, que os custos com prevenção são menores do que aqueles dispendidos para a contenção da doença, tornando-se relevante a vigilância sentinela em regiões consideradas indenes (ZUBEN & DONALÍSIO, 2016).

O município de Pelotas tem uma área de 1.609,708 km² e faz limite com vários municípios, incluindo São Lourenço do Sul ao norte, Canguçu e Morro Redondo a oeste, Capão do Leão e Rio Grande ao sul. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2020 a cidade tinha uma população estimada de 343.132 pessoas, sendo que em 2010 tinha uma população urbana de 306.193 e rural de 22.082. No ano de 2017, 1,11% de internações nos hospitais ocorreram por doenças associadas ao saneamento ambiental inadequado, o que representa um dos fatores de risco ligados à criação e disseminação da LV, caso existam vetores competentes na região. Ainda, como importantes fatores de risco para a instalação da LV em Pelotas, tem-se um fluxo intenso de pessoas e animais, visto que esta possui um polo universitário e faz limite com a cidade portuária de Rio Grande, que também conta com um polo universitário federal, além de estar próxima de cidades fronteiriças que já relataram casos autóctones de LV, assim como com o Uruguai (SALOMON *et al.*, 2011).

Neste sentido, as universidades podem auxiliar os municípios de maneira estratégica para o combate e a prevenção de enfermidades, principalmente naquelas que oferecem risco eminente e para as quais não há recursos especificamente destinados para a prevenção no

município, visto a disponibilidade dos mesmos, sejam eles financeiros ou humanos (KOGLIN & KOGLIN, 2019). Ainda, os inquéritos soroepidemiológicos são ferramentas diagnósticas úteis para compreender a situação de saúde-doença em uma população, possibilitando averiguar a incidência e a prevalência das enfermidades podendo ser executados com mão de obra acadêmica através dos projetos de pós-graduação (MALTA *et al.*, 2008).

Em virtude do processo de expansão da LV para a região sul do Brasil, com registro de casos autóctones em municípios próximos a Pelotas e região, como Porto Alegre, assim como no país de fronteira Uruguai e, diante das dificuldades operacionais de vigilância epidemiológica em áreas consideradas não endêmicas, objetivou-se realizar inquérito soroepidemiológico canino, avaliar a distribuição geográfica e sinais clínicos dos animais sororreagentes de Pelotas e municípios do sul do RS, assim como analisar os fatores predisponentes a enfermidade na região do estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Durante os meses de março de 2019 a janeiro de 2021 foi realizado o inquérito sorológico para LVC utilizando o teste rápido (TR) imunocromatográfico Dual Path Platform (DPP®), executado conforme instruções do fabricante (Bio-Manguinhos). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFPel (CEEA-UFPEL 92.242.080/0001-00). As amostras foram provenientes de coleta por conveniência, incluindo animais com ou sem suspeita de LVC de cães atendidos no Hospital Veterinário (HCV-UFPel), de canis municipais de dois municípios e de clínicas veterinárias parceiras. Quanto as amostras provenientes dos canis, foram coletados todos os animais que estavam presentes no dia da coleta. Para o teste, foram colhidos em média 3 ml de sangue de cada animal, por meio de venopunção das veias cefálica ou jugular e, acondicionados em tubos estéreis contendo anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético- EDTA). O sangue total foi centrifugado para obtenção de soro e armazenado no Laboratório de Análises Clínicas do (HCV-UFPel) a -4°C. Ao diagnosticar um teste reagente

estabelecia-se contato com o médico veterinário que havia encaminhado a amostra ou canil municipal para que as providências legais fossem tomadas pelos profissionais, sendo este o responsável pela notificação do caso junto a Secretaria Municipal de Saúde e, continuidade operacional para a realização do teste confirmatório (ELISA).

Foram avaliadas amostras provenientes de cães atendidos por clínicos veterinários nas cidades de Pelotas, Capão do Leão, São Lourenço do Sul, Rio Grande, Arroio Grande e Jaguarão, todos municípios da região sul do RS. Não houve homogeneidade no número de amostras referente aos municípios, uma vez que a demanda dependia do interesse dos profissionais em enviar as mesmas para realização do teste e, tratando-se de uma área teoricamente indene não é comum a inclusão da suspeita de LVC entre os profissionais. Segundo o PVLC os municípios do estudo estão classificados com transmissão de LV, sendo silenciosos, não receptivos e vulneráveis. Após a identificação de positivos no teste DPP, foram avaliados os dados de distribuição geográfica e sinais clínicos dos animais sororreagentes, através de contato com os médicos veterinários responsáveis.

RESULTADOS

Dentre os 772 cães investigados sorologicamente com o TR-DPP®, dez (10) animais foram sororreagentes, representando 1,29% (10/772) do total de amostras. A amostragem total e a distribuição de animais sororreagentes, em relação aos locais de origem das amostras, estão representados na Figura 1. Quanto ao número de cães coletados em cada local do estudo, este foi determinado de forma aleatória (amostra por conveniência), através do encaminhamento de amostras pelos médicos veterinários. Cabe ressaltar que os animais do Canil Municipal de Pelotas são atendidos pela equipe do HCV-UFPel e portanto, várias amostras deste local foram avaliadas e testadas para LVC, embora não tenha sido realizada uma coleta específica no local como ocorreu para os canis de Jaguarão e Arroio Grande. A distribuição das amostras coletadas

para realização do TR-DPP® por município (Arroio Grande, n=105; Jaguarão, n=80; São Lourenço do Sul, n=2; Pelotas, n=583; Rio Grande, n=2) está apresentada na Figura 2.

O município de Pelotas apresentou cinco (5) cães sororreagentes distribuídos entre os bairros Areal (1), Centro (1), Porto (2) e Navegantes (2). O município de Capão do Leão também apresentou uma (1) amostra sororreagente (HUV-03) no bairro Cerro do Estado. No canil municipal de Jaguarão verificaram-se três (3) amostras sororreagentes, com todos cães sororreagentes provenientes do sudeste da área urbana do município. No município de São Lourenço do Sul obteve-se uma (1) amostra sororreagente no bairro Sete de Setembro. Na Figura 3 é possível observar a distribuição espacial das amostras de cães sororreagentes no teste de acordo com os bairros dos municípios que compuseram a área de estudo.

Dentre os animais reagentes no DPP® apenas 03 tiveram suspeita clínica de LVC, sendo que os outros cães (n=7) apresentaram sinais clínicos inespecíficos ou não apresentavam nenhum sinal clínico (Tabela I). Na Tabela I é possível observar as suspeitas clínicas dos profissionais médicos veterinários que encaminharam as amostras para testagem, os sinais clínicos dos animais e a origem desses animais sororreagentes no DPP®. Para dois dos sete animais testados (CP-01 e CP-02), foi realizado o teste sorológico confirmatório ELISA pelo Laboratório Regional do Estado do RS (LACEN/RS) após a notificação pelo profissional que encaminhou a amostra para o teste à Secretaria Municipal de Saúde (SMS).

DISCUSSÃO

Este trabalho constitui-se no primeiro inquérito sorológico de LVC no município de Pelotas-RS e cidades limítrofes. Dentre os cães investigados com o TR-DPP® obteve-se 1,29% (10/772) de animais sororreagentes. Pesquisadores gaúchos e órgãos oficiais têm realizado inquéritos soroepidemiológicos no RS para melhor compreender a dinâmica da LVC no estado

(RIBOLDI *et al.*, 2018; DE CARVALHO *et al.*, 2018; TEXEIRA, 2014). Em 2017 (últimos dados oficiais disponíveis) foram diagnosticados 477 cães sororreagentes pelo LACEN/RS distribuídos em 21 cidades, sendo a maior prevalência nos municípios de Porto Alegre (27,9%), Uruguaiana (20,8%) e São Borja (17,6%) (CEVS, 2017).

No estudo realizado por Riboldi *et al.* (2018), foi descrita a prevalência de 4% de LVC na região metropolitana de Porto Alegre através de testes sorológicos, confirmados por qPCR (*Real-time Polymerase Chain Reaction*). De Carvalho e colaboradores (2018) ao avaliarem a presença do DNA de *Leishmania infantum* em amostras sorológicas (n=140) de cães sintomáticos e assintomáticos, previamente avaliados pelo DPP® e ELISA, encontraram concordância moderada entre os testes sorológicos e moleculares. Segundo os autores, a baixa acurácia encontrada nos testes sorológicos confirma a necessidade de melhores testes confirmatórios, principalmente devido à baixa carga parasitária e níveis de anticorpos anti-*Leishmania* nos animais com perfil clínico assintomático.

A alta sensibilidade é uma característica necessária ao se utilizar testes de diagnóstico como uma ferramenta de triagem para o PVC-LV (FIGUEIREDO *et al.*, 2018), e o DPP® é um teste sorológico que cumpre esse requisito, requerendo um segundo teste, mais específico, como confirmatório (LAURENTI *et al.*, 2014). O DPP® apresenta alta sensibilidade (98%) para identificação de animais com sinais clínicos e menor sensibilidade para cães assintomáticos em áreas indenes (47%) (GRIMALDI *et al.*, 2012). No entanto, Laurenti *et al.* (2014), demonstraram que em áreas endêmicas o DPP® foi capaz de detectar cães sintomáticos (89,4%) e assintomáticos (92,1%) em proporções muito próximas. Em concordância com GRIMALDI *et al.* (2012), no trabalho realizado por FIGUEIREDO *et al.* (2018) para validação do DPP®, verificou-se que a sensibilidade do teste diminuiu gradualmente com a redução da sintomatologia nos animais, atingindo nível mais baixo (75%) nos cães assintomáticos, sendo que a especificidade diminuiu gradualmente com o aumento dos sinais clínicos nos cães,

atingindo o nível mais baixo nos animais sintomáticos (56%). Apesar de reconhecidamente a sensibilidade do teste diminuir em animais assintomáticos e provenientes de áreas não endêmicas, o DPP® foi capaz de detectar dez (10) animais positivos neste estudo, sendo dois (2) deles confirmados por ELISA posteriormente pelo LACEN/RS, após notificação dos casos à Secretaria Municipal da Saúde pelo médico veterinário.

O estado do Rio Grande do Sul faz fronteira com o Uruguai a sudoeste e com a Argentina a noroeste, enquanto os estados de Santa Catarina e Paraná são fronteiriços com o Paraguai a oeste. Observou-se que três (3) animais sororreagentes tinham origem ou residiam em cidade de fronteira com o Uruguai (Jaguarão) e um (1) em cidade de fronteira com a Argentina (Uruguaiana). No canil municipal de Jaguarão foram coletadas amostras de 80 animais e verificou-se três (3) amostras sororreagentes no DPP®, sendo todos os animais provenientes do sudeste da área urbana do município. Jaguarão faz fronteira com o Uruguai, local em que já foi notificada a presença do vetor da LVC em 2010 (SALOMÓN *et al.*, 2011) e na Argentina em 2004 (SALOMÓN *et al.*, 2001), o que pode indicar uma possível migração do flebotômíneo entre países. Uma das amostras sororreagente (CP-02) desse estudo pertencia a um cão que residia em Uruguaiana/RS e frequentemente se deslocava para Pelotas com a tutora. Para esse animal foi realizado DPP® e ELISA, este último apenas pelo LACEN/RS. O animal apresentava lesões de pele, onicogribose e alterações reprodutivas. Acredita-se que o mesmo tenha se infectado no município de Uruguaiana que é endêmico para LVC, mas não pode-se afirmar com certeza uma vez que se deslocava com frequência para Pelotas.

Os animais recolhidos pela prefeitura e abrigados no canil municipal de Jaguarão são, na sua maioria errantes, portanto, sem histórico de origem, não sendo possível distinguir se são nativos de Jaguarão e se infectaram na cidade ou, se ocorreu a infecção no país vizinho e migraram para Jaguarão, onde foram recolhidos. O fluxo migratório de pessoas e animais sem controle sanitário pode favorecer a dispersão de agentes infecciosos, à semelhança do que

ocorreu com o Covid-19, que foi caracterizado inicialmente como um surto na China e em 2020 tornou-se uma pandemia (NASCIMENTO, 2020). A LVC é uma enfermidade de dispersão silenciosa, principalmente porque entre 30 e 60% dos animais são assintomáticos e não despertam suspeita clínica nos médicos veterinários e também em decorrência do longo tempo de latência do agente infeccioso da doença (BRASIL, 2006).

Entre os animais diagnosticados neste estudo como sororreagentes no DPP®, um dos cães (CP-01) era proveniente de canil comercial do município de Osório/RS e foi adquirido ainda filhote. O tutor relatou que o cão apresentava desde jovem lesões de pele que não melhoravam apesar de realizar diferentes tratamentos constantemente (não soube informar o histórico de medicamentos ao ser questionado). Neste paciente foi realizado o exame direto e evidenciado a forma amastigota dentro de macrófagos, além de ser realizado o teste confirmatório ELISA pelo LACEN/RS, no entanto, não foi possível saber se o animal se infectou em Pelotas/RS onde residia ou na localidade do canil. Seria importante para prevenção da instalação da enfermidade em áreas indenes a testagem de animais provenientes de canis comerciais que importam as matrizes de áreas endêmicas e na triagem de todos os animais doadores de sangue, uma vez que podem estar infectados e não doentes. Relevante ressaltar também que tem sido descrito, dentre as formas de transmissão da LVC, o coito (com transmissão unilateral do macho para a fêmea), a transplacentária e a transfusão sanguínea (DE FREITAS, *et al.*, 2006; NAUCKE & LORENTZ, 2012).

No que se refere a distribuição espacial das amostras sororreagentes no DPP® e análise ambiental, no município de São Lourenço do Sul, obteve-se uma (1) amostra sororreagentes (CP 04) no bairro Sete de Setembro. Esse bairro localiza-se no noroeste da área urbana do município e as análises visuais indicam que seu entorno é caracterizado por áreas destinadas à agricultura ou pecuária, ambientes com modificação antrópica para a atividade econômica e com desequilíbrio ambiental, fatores que favorecem o desenvolvimento dos vetores (COSTA,

2018). Com relação a cidade de Pelotas, todos os casos sororreagentes foram no sul do município e se localizavam em áreas urbanas, assim como em bairros próximos ao Canal São Gonçalo. É importante destacar que o ambiente úmido no entorno de Canais pode favorecer o acúmulo e a decomposição de matéria orgânica favorecendo a proliferação do flebotomíneos, caso este esteja presente. Além disso, no entorno do Canal São Gonçalo vivem comunidades em vulnerabilidade social, na sua maioria formada por recicladores da cidade que vivem em condições precárias de saneamento básico (DO AMARAL, 2012). O município de Capão do Leão também apresentou uma (1) amostra sororreagente (HUV-02) no bairro de Cerro do Estado. Esse bairro encontra-se localizado próximo a áreas rurais, a matas nativas e a corpos d'água do município.

A amostra sororreagente (HUV-02) tratava-se de um cão que vivia em um abrigo (ONG) com outros animais recolhidos de diversas localidades incluindo Pelotas e Rio Grande, além do Capão do Leão. O animal, uma fêmea jovem, foi encaminhada para cirurgia eletiva no HCV-UFPel, sendo diagnosticada também com *Dictyophyme renale*. A amostra para realização do DPP® foi encaminhada apenas para triagem, sem suspeita clínica de LVC. As coinfeções de *L. infantum* com outros patógenos podem aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento da LVC (OLIVEIRA *et al.*, 2019), no entanto, existem poucos trabalhos quanto a coinfeção com helmintos. Estudo realizado por Mistieri e colaboradores (2014) em Uruguaiana-RS, com cães destinados a eutanásia devido ao diagnóstico de LVC através de RIFI (com titulação $\geq 1:40$) e ELISA, foi identificou na necropsia o parasito *D. renale*. Segundo esse trabalho, a falta de condições higiênico-sanitárias são geralmente observadas na progressão da infecção por *D. renale* e *Leishmania* sp., sendo possível que essas condições sejam a ligação entre ambas as enfermidades. No trabalho de DA COSTA *et al.* (2019) também foi identificada coinfeção de *L. infantum* e *D. renale*, e nesse caso os autores sugeriram que o fato do animal viver em área endêmica para LVC e ter acesso a um rio onde poderia ter ingerido hospedeiros de *D. renale*

poderia explicar a coinfeção. Os mesmos autores relataram não ter havido evidências de que a coinfeção do nematódeo e o protozoário tenha aumentado a suscetibilidade a LVC, mas a alta carga parasitária de *D. renale*, associada aos achados de alterações histológicas graves e incomuns, podem ter sido em decorrência da coinfeção com *L. infantum*. Em Pelotas já foi confirmada a ocorrência de *D. renale* em amostras de solo e urina de cães e gatos, indicando que os ovos do parasito estão presentes no ambiente urbano e que caninos e felinos apresentam-se parasitados, representando um risco para a saúde pública (PERERA *et al.*, 2017). Além dessa coinfeção com *D. renale* podem ocorrer infecções com outros parasitos como *Babesia spp.* e *Anaplasma spp.*, que são transmitidos pelo *Rhipicephalus sanguineus* (RIBEIRO *et al.*, 2019).

Das duas (2) amostras coletadas em São Lourenço do Sul, uma (1) foi reagente no DPP® (CP-04). O cão foi atendido em clínica veterinária havendo à suspeita de LVC, embora o paciente apresentasse sinais clínicos inespecíficos, como inapetência e anorexia. No histórico do paciente foi possível constatar que o mesmo era natural de Minas Gerais (MG), área endêmica para LVC, e migrou para São Lourenço do Sul junto com os tutores. Pelo histórico, suspeita-se que o cão possa ter se infectado em MG e manifestado os sinais clínicos no município gaúcho.

Das amostras de cães de Pelotas, a maioria foi encaminhada para triagem, sem haver suspeita clínica de LVC, com exceção de duas (CP-01; CP-02) que foram especificamente encaminhadas pela suspeita clínica de LVC. Foram sororreagentes no total seis amostras coletadas em Pelotas. Todos os animais com DPP® reagente não eram naturais de Pelotas, sendo que um (1) realizava fluxo migratório frequente com os tutores naturais de Uruguaiana-RS (CP-02), município endêmico para LVC; um (1) animal tinha origem de um canil comercial localizado no município de Osório-RS (CP-01) e desde jovem apresentava lesões cutâneas de caráter crônico, com tentativa de diversas terapêuticas sem sucesso. Já o animal (CP-04) era natural de Curitiba-PR e apresentava alteração cardíaca (ICC), motivo da consulta na clínica

sendo o resultado positivo do teste um achado. Curitiba conta com casos alóctones de LVC desde 2004 (Thomaz-Soccol *et al.*, 2009). Em estudo realizado por pesquisadores do estado, sobre a provável origem da disseminação da LVC para região centro-sul do Brasil, foram levantadas três hipóteses: de que isso poderia ter ocorrido através da construção do gasoduto Bolívia-Brasil entre 1998-2005, com fluxo migratório intenso de trabalhadores do norte, região endêmica para a enfermidade; pelo surgimento de um novo *cluster* de *L. infantum* no oeste catarinense e sua dispersão para o sul do Paraná a partir de 2013 ou, pela dispersão pelo Paraguai pelo lado brasileiro da tríplice fronteira (PASQUALI *et al.*, 2019).

Em relação as amostras coletadas no município de Rio Grande, embora estas não tenham sido reagentes, novas coletas deverão ser realizadas devido ao número de amostras (n=2) não ser representativas do município. O estudo epidemiológico de Rio Grande quanto a presença de *L. infantum* é necessário considerando-se a importância econômica do Porto do Rio Grande, sua posição estratégica, as alterações estruturais e demográficas do município nos ciclos de economia portuária quando grandes obras federais ocorrem, uma vez que costumam dispor de mão de obra miscigenada com fluxo migratório intenso de trabalhadores de todas as regiões. Nesse contexto, e, considerando localmente a semelhança das hipóteses do estudo realizado por Pasquali *et al.* (2019) quanto as prováveis vias de disseminação da LV para o sul, a cidade portuária de Rio Grande apresentou entre os anos de 2005 e 2014, um grande contingente migratório de trabalhadores oriundos de diversos estados brasileiros, principalmente do norte para construção da plataforma P53 (DORNELES, BORGES & POTTES, 2011; FEIJÓ & MADONO, 2013). Rio Grande é uma cidade historicamente com ciclos de alto desenvolvimento econômico, como esse proporcionado pela construção da P53, e declínios como foi verificado com a extinção de muitos empregos no fechamento da plataforma em 2014 (SOUZA, 2014). Pensando nessa perspectiva, uma hipótese importante de ser investigada quanto a dispersão da LV no sul do RS, seria a relação dessa migração em massa como uma

possível via de inserção da circulação de *L. infantum* na região, de maneira silenciosa devido ao fluxo migratório intenso de trabalhadores e seus animais infectados.

Além disso, a cidade oferece condições propícias para o desenvolvimento do vetor, com baixa qualidade de saneamento básico, alta umidade e alto índice de desemprego, principalmente em épocas de declínio de investimentos no município, o que resulta no aumento de pessoas em condições de vulnerabilidade social mais suscetíveis a enfermidades. Aliado a esse fato, Pelotas e Rio Grande possuem pólos universitários federais que incluíram a partir do ano 2009 o Processo de Seleção Unificado (Sisu), ação criada pelo governo federal com objetivo de facilitar o ingresso universitário. Esse fato resultou em uma mudança no perfil étnico dos universitários de todo Brasil e no RS não foi diferente, com estudantes de fora do estado representando maioria, comparado ao número de estudantes gaúchos nas universidades do Rio Grande do Sul (NOGUEIRA *et al.*, 2017).

O Sisu favoreceu a migração interestadual de estudantes universitários causando impacto na economia de cidades que se tornaram pólos universitários, mas nem todos os municípios estavam preparados estruturalmente para atender a alta demanda migratória. Esses imigrantes podem também ter contribuído para a dispersão do parasito e, uma vez que exista o vetor da LVC ou que haja o desenvolvimento da competência vetorial de um inseto nativo da região, haveria a progressão do ciclo de transmissão. Importante lembrar também que Rio Grande conta com uma área litorânea (Praia do Cassino) com grande fluxo de estrangeiros provindos de países vizinhos no verão. Destaca-se ainda que Pelotas é uma cidade próxima à fronteira com países que já notificaram casos de LVC, como o Uruguai, e que não há o estabelecimento de uma guia de trânsito para pequenos animais (GTA) que possibilite o controle sanitário desses nas viagens.

CONCLUSÃO

Assim, os resultados demonstram que a região de estudo, apesar de não ser classificada como endêmica, apresentou animais sororreagentes no teste sorológico de triagem DPP® alertando para os riscos iminentes para a região, podendo culminar, em um futuro próximo, em grave problema de saúde pública, caso medidas de adaptação e mitigação não sejam tomadas. Isso reitera a necessidade e relevância da realização da vigilância sentinela para o auxílio no diagnóstico antecipado da instalação da LVC em municípios considerados indenes, permitindo o melhor planejamento de ações preventivas e do controle da enfermidade, sabidamente não passível de erradicação. Todas as inferências citadas que poderiam interferir na implantação e evolução da LVC na região de estudo (migração de trabalhadores para construção da P53, fluxo migratório inter-países de fronteira e maior mobilidade dos estudantes no país) carecem de investigações a serem realizadas e levantam hipóteses para pesquisas futuras. Neste trabalho, na região Sul do RS, dentre os cães investigados sorologicamente com o DPP®, 1,29% (10/772) dos animais foram sororreagentes sendo as amostras provenientes dos municípios de Pelotas, Capão do Leão, Jaguarão e São Lourenço do Sul, todos considerados indenes para a LVC.

AGRADECIMENTOS

CAPES, CNPq, UFPel, Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR.

REFERÊNCIAS

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. (2006) *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Editora do Ministério da Saúde 2006, 1.^a edição 3.^a reimpressão, Série A, Normas e Manuais Técnicos. Brasília (DF) Brasil.

Brasil. Nota técnica conjunta nº 01/2011 – CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS (2011) Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Ministério da Saúde, Brasília (DF) Brasil.

Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Centro Estadual de Vigilância em Saúde (2017) Nota informativa – Situação epidemiológica da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul. Disponível online em: <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201712/08165117-nota-informativa-lvh-30-12-2017.pdf>.

Costa, SM. (2018) Impactos das mudanças climáticas e ambientais na distribuição espacial de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e no processo de expansão geográfica da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil. Tese em Biodiversidade e Saúde. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Oliveira, V da C., Junior, A. A. V. M., de Holanda Cavalcanti, M. C., de Fátima Madeira, M., Ferreira, L. C., Figueiredo, F. B., ... & Menezes, R. C. (2019) First description of parasite load and clinicopathological and anatomopathological changes in a dog naturally coinfecting with *Diectophyme renale* and *Leishmania infantum* in Brazil. In **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 18, pp. 100351.

Dantas-Torres F, Miró G, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. (2019) Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. *Trends in Parasitology*. 35, pp 97-101.

De Arruda, M. L.M., Da Exaltação, J.P.P., Dos Santos, F. P. (2014) Infestação múltipla de *Diectophyme renale* em cães portadores de leishmaniose em Uruguaiana, RS-Relato de cinco casos. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*. 36, pp. 195-198.

De Carvalho F.L.N., Riboldi, E.O., Bello, G.L., Ramos, R.R., Barcellos, R.B., Gehlen, M., Halon, M.L., Romão, P.R.T., Dallegrave, E., Rossetti, M.L.R. (2018) Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. In *Epidemiology and Infection*. 146, pp. 571-576.

De Freitas, E., Melo, M.N., da Costa-Val, A.P., Michalick, M.S. (2006) Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*, 137, pp. 159-67.

Do Amaral, G. L., Dos Santos, J.C, Do Amaral, G.L. (2012) Núcleo de Práticas Complementares ao Ensino Regular (NUPRAC): pesquisa, ensino e extensão em uma comunidade de extrema vulnerabilidade social. **Revista Didática Sistêmica**. 14, pp. 42-53.

Dorneles, C.N., Borges, D. C., Pottes, D.B. (2011) O polo naval desenvolvendo Rio Grande (Comunicação). 1º GPDR Mercosul: O papel da universidade. Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul (RS) Brasil.

Figueiredo, F.B., Vasconcelos, T.C.B., Madeira, M.F., Menezes, R.C., Maia-Elkhoury, A.N.S., Marcelino, A.P., Werneck, G.L. (2018) Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 113, pp. 1-7.

Feijó, F., Madono, D. (2013) Polo naval do Rio Grande: potencialidades, fragilidades e a questão da migração. Texto para discussão. Anais do 6º Encontro de Economia Gaúcha, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), Brasil.

Grimaldi, Jr. G., Teva, A., Ferreira, A.L., Santos, C.B., Pinto, I.S., Azevedo, C.T., Falqueto, A. (2012) Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 106, pp. 54-59.

Grisotti, M., Amorim, L.C. (2020) Entre o amor ao animal e a saúde pública: reflexões sociológicas sobre a leishmaniose visceral canina. *Estudos de Sociologia*, v. 25, n. 49.

IBGE (2018) Panorama das cidades – Pelotas. Disponível online em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/pelotas/panorama>.

Koglin, T., Koglin, J.C. (2019) A importância da extensão nas universidades brasileiras e a transição do reconhecimento ao descaso. *Revista Brasileira de Extensão Universitária*, 10, pp. 71-78.

Laurenti, M.D., Leandro, Jr. M.V.S., Tomokane, T.Y., Lucca, H.R.L., Aschar, M., Souza, C.S.F., Silva, R.M., Marcondes, M., Matta, V.L.R. (2014) Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral *leishmanias*. *Veterinary Parasitology*, 205, pp. 444-450.

Malta, D.C., Leal, M.C., Costa, M.F.L., Morais, N.O.L. (2008) Inquéritos Nacionais de Saúde: experiência acumulada e proposta para o inquérito de saúde brasileiro. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 11, pp. 159-167.

Marcondes, M., Rossi, C.N. (2013) Leishmaniose visceral no Brasil. *Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia*, 50, pp. 341-352.

Miró, G., López-Vélez, R. (2018) Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniosis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Veterinary Parasitology*, 254, pp. 151-159.

Morais, M. H. de. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária (2020) Guia de Bolso Leishmaniose Visceral, Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária, 1, pp. 194.

de Arruda Mistieri, M. L., da Exaltação Pascon, J. P., & dos Santos, F. P. (2014). Infestação múltipla de *Diectophyme renale* em cães portadores de leishmaniose em Uruguaiana, RS-Relato de cinco casos. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 36(2), 195-198.

Nascimento, K. (2020) COVID-19: a globalização do infortúnio. *Simbiótica. Revista Eletrônica*. 7, pp. 39-52.

Naucke, T.J., Lorentz, S. (2012) First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors*, 5, pp. 2-5.

Nogueira, C.M.M., Nonato, B.F., Ribeiro, G.M., Flontino, S.R.D. (2017) Promessas e limites: o sisu e sua implementação na universidade federal de Minas Gerais. *Educação em Revista*, 33, pp. 61-91.

Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS/OMS (2018) Informe de Leishmanioses Nº 6. Disponível online em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5&isAllowed=y

Pattabhi, S., Whittle, J., Mohamath, R., El-Safi, S., Moulton, G.G., Guderian, J.A., Colombara, D., Abdoon, A.O., Mukhtar, M.M., Mondal, D., Esfandiari, J., Kumar, S., Chun, P., Reed, S.G., Bhatia, A. (2010) Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, pp. 1-11.

Perera, S.C., Rappeti, J.C.S., Milech, V., Braga, F.A., Cavalcanti, G.A.O., Nakasu, C.C., Durante, L., Vives, P., Cleff, M.B. (2017) Eliminação de *Diectophyme renale* pela urina em canino com diectofimatose em rim esquerdo e cavidade abdominal-Primeiro relato no Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69, pp. 618-622.

Pasquali, A.K.S., Baggio, R.A., Boeger, W.A., González-Britez, N., Guedes, D.C., Chaves, E.C., Thomaz-Socco, V. (2019) Dispersions of *Leishmania (Leishmania) infantum* in central-

southern Brazil: Evidence from an integrative approach. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13, pp. 1-20.

Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, L.M., Dye, C. (1997) The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology*, 115, pp. 143-156.

Ribeiro, C. R., Gonçalves, C. A., Cruz, L. M., & Galera, P. D. (2019) Prevalência da leishmaniose visceral canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal–Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, 20, pp. 1-8.

Riboldi, E., Carvalho, F., Romão, P.R.T., Barcellos, R.B., Bello, G.L., Ramos, R.R., Oliveira, R.T., Araújo, Jr., J.P., Rossetti, M.L., Dallegrave, E. (2018) Molecular method confirms canine *Leishmania* infection detected by serological methods in non-endemic area of Brazil. *The Korean journal of parasitology*. 56, pp. 11.

Salomón, O.D., Basmajdian, Y., Fernández, M.S., Santini, M.S. (2011) *Lutzomyia longipalpis* no Uruguai: o primeiro relato e o potencial de transmissão da leishmaniose visceral. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, pp. 381-382.

Salomón, O. D., Sosa-Estani, S., Rossi, G. C., & Spinelli, G. R. (2001) Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniosis visceral en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 61, pp. 174-178.

Souza, S. E. D. D (2014) Pólo Naval de Rio Grande: análise de impactos na geração de empregos por nível de escolaridade no Corede Sul através da metodologia da matriz insumo produto. Tese em Economia do Desenvolvimento. Faculdade de contabilidade, administração e economia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul (RS) Brasil.

TEIXEIRA, Mariana Caetano (2014) Soroepidemiologia de *Leishmania (L.) chagasi* em cães no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Tese em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul (RS) Brasil.

Thomaz-Soccol V, Castro EA, Navarro IT, Farias MR, Souza LM, Carvalho Y, Bispo S, et al. (2009) Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 18, pp. 46-51.

Vasconcelos TCB, Alves FJ, Mendes Jr AAV, Madeira MF, Figueiredo FB. (2013) Leishmaniose visceral canina: caso alóctone no município de Resende, estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 20 n. 2.

Zuben APB, Donalísio MR. (2016) Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. *Cadernos de Saúde Pública [online]*. 32, pp. e00087415.

TABELA I - Dados das amostras de pacientes caninos reagentes no teste sorológico de triagem para LVC -DPP®.

Identificação do Animal	Sinal(is) Clínico(s)	Suspeita Clínica	Origem do canino/Local diagnóstico	Teste de Elisa para LVC (confirmatório)
*HUV – 01	Polidipsia, Hiporexia, Estenose Pulmonar	¹ ICC	² Indeterminada/Pelotas	Não realizado
HUV – 02	Hepatomegalia	Dioctofimatose	³ Capão do Leão/Pelotas	Não realizado

HUV – 03	Secreção nasal, Mucosas Hipocoradas, Tosse, Estenose Pulmonar, Tremores.	Doença Imunomediada Linfoma Gastrointestinal Cardiopatía	² Indeterminada/Pelotas	Não realizado
CJ – 01	Não consta	Sem clínica	suspeita Jaguarão-RS	Não realizado
CJ – 02	Não consta	Sem clínica	suspeita Jaguarão-RS	Não realizado
CJ -03	Não consta	Sem clínica	suspeita Jaguarão-RS	Não realizado
CP – 01	Lesões de pele, unhas, e citologia com parasito	LVC	Osório-RS	Elisa Reagente
CP – 02	Lesões de pele, onicogrifose e biópsia inconclusiva; Alterações reprodutivas	LVC	Uruguaiana-RS	Elisa Reagente
CP – 03	*Descompensa ção Cardíaca	¹ ICC	Curitiba-PR	Não realizado

CP – 04	Inapetência, Anemia	⁴ LVC	Minas Gerais	Não realizado
----------------	------------------------	------------------	--------------	------------------

*Doença Cardíaca diagnosticada previamente; ¹Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC); ²Amostra coletada em Pelotas sem origem identificada; ³Animal vivia em uma ONG no município de Capão do Leão sem origem identificada; ⁴Leishmaniose Visceral Canina; HUV: Hospital Universitário Veterinário CJ: Canil de Jaguarão CP: Clínica Particular

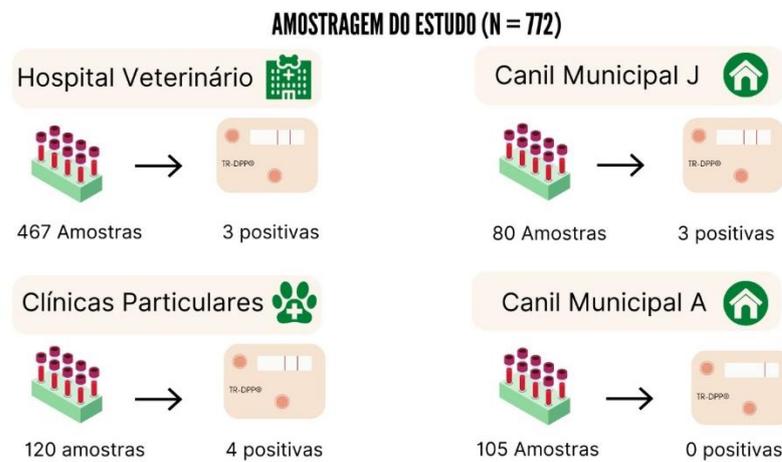


FIGURA 1 - Número de amostras testadas, sororreagentes no DPP® e origem, sendo que as amostras particulares se referem àquelas encaminhadas por médicos veterinários clínicos que realizam atendimentos em Pelotas e municípios vizinhos (Rio Grande, Jaguarão, Capão do Leão).

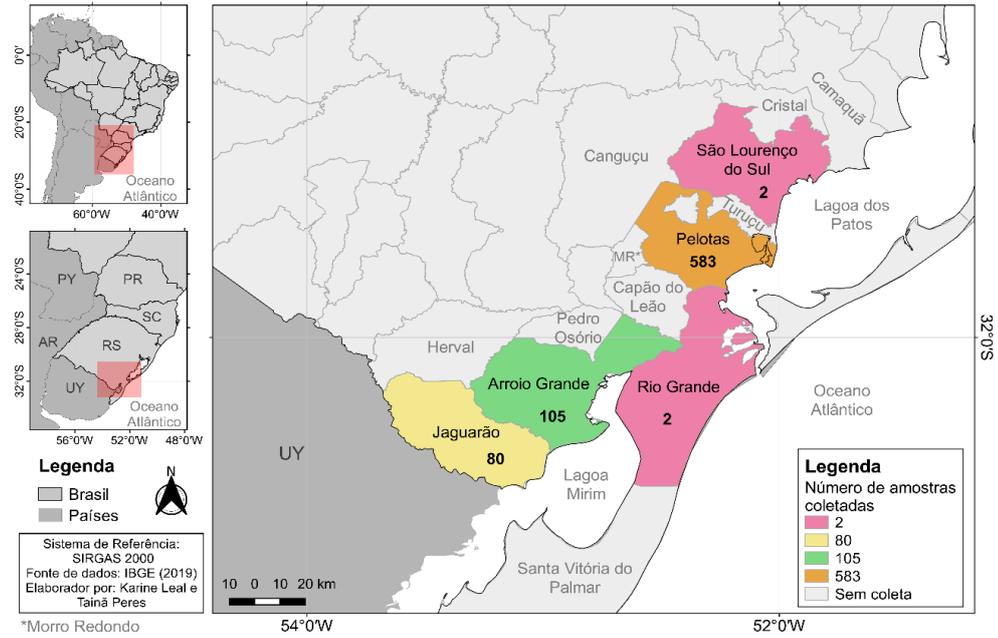


FIGURA 2 - Representação da distribuição das amostras de cães incluídos no estudo, de acordo com o município de coleta para realização do DPP®

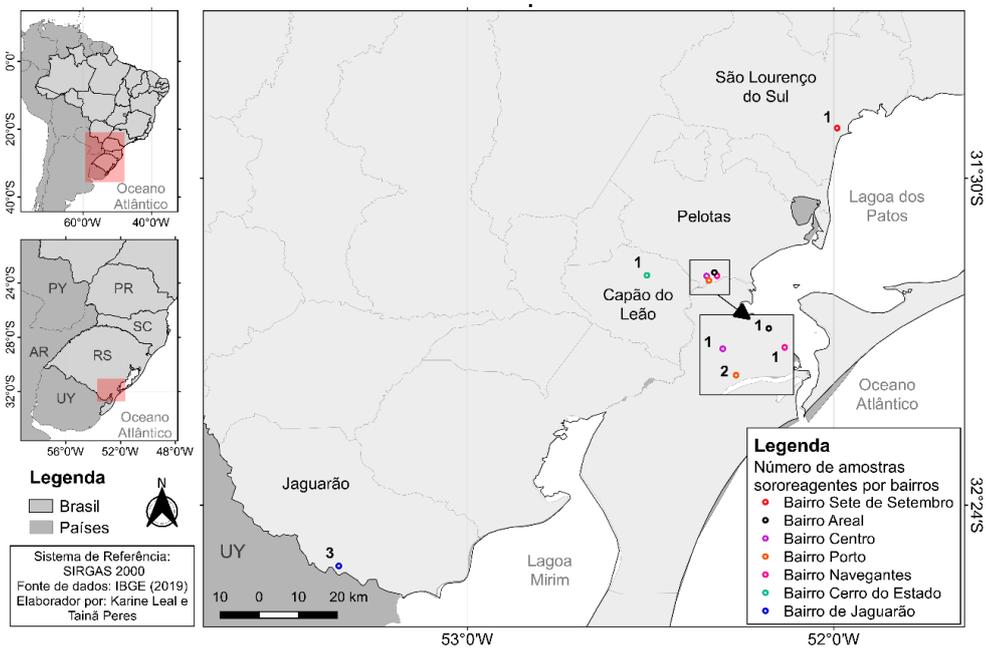


FIGURA 3 - Demonstração da dispersão espacial dos cães sororeagentes no DPP® de acordo com os bairros dos municípios incluídos no estudo.

3.3 Artigo 3

**ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA DE EXTRATOS POLARES E APOLARES DE
PLANTAS DA FAMÍLIA LAMIACEAE E ANACARDIACEAE CONTRA
LEISHMANIA INFANTUM E *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

Tábata Pereira Dias, Stefanie Bressan Waller, Helena Piúma Gonçalves, Rogério Freitag, Fábio Clasen Chaves, Gustavo Gonçalves, Bruna Porto, Fabiano Borges Figueiredo, Marlete Brum Cleff

Será submetido à revista *Science and Animal Health*

ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA DE EXTRATOS POLARES E APOLARES DE PLANTAS DA FAMÍLIA LAMIACEAE E ANACARDIACEAE CONTRA *LEISHMANIA INFANTUM* E *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

RESUMO

Devido à eminente necessidade da busca de alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose visceral e o grande impacto que elas têm mundialmente na Saúde Única, foi objetivo deste trabalho avaliar a atividade de extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais frente a *Leishmania* spp., através do ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) além de avaliar a composição química dos extratos que apresentaram atividade anti-*leishmania* (extrato de *Schinus terebinthifolia* (EHST) e óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) e *Origanum. majorana* L. (OEOM). Os óleos essenciais OEOM e OERO apresentaram atividade frente a *Leishmania* spp. superior aos extratos hidroalcoólicos testados (*Origanum. majorana* L. - EHOM, *Origanum vulgare* L. - EHOV, *Thymus vulgaris* L. - EHTV, *Salvia officinalis* L. - EHSO e *Rosmarinus officinalis* L. - EHRO), com menor IC50 para *Leishmania braziliensis* (Lb) quando comparado a *Leishmania infantum* (Li). Dentre os extratos vegetais que foram capazes de reduzir em 50% a viabilidade celular do protozoário na forma promastigota estão o EHST (17,34 µg/mL -Li/22 µg/mL-Lb) e os óleos essenciais de OEOM (1,11 µg/mL-Li; 0,35 µg/mL-Lb) e OERO** (estocado durante três anos) (2,75 µg/mL-Li; 2,25 µg/mL-Lb) e OERO (1,11 µg/mL-Li; 0,35 µg/mL-Lb). Quanto aos óleos essenciais OERO e OEOM da família Lamiaceae, os dois demonstraram atividade inibitória no crescimento de *L. infantum* e *L. braziliensis* e são promissores para a continuação dos estudos nas formas amastigotas.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania* spp. Produtos naturais. *Schinus terebinthifolia*. *Rosmarinus officinalis*. *Origanum majorana*.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses fazem parte do escopo de doenças negligenciadas (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2019) com terapêutica limitada, aumento da resistência das espécies de *Leishmania* spp. e pacientes com recidivas recorrentes (BALASSEGARAM *et al.*, 2012). Devido a eminente necessidade de se encontrar alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses e grande impacto que causam mundialmente na Saúde Única, principalmente devido ao aumento na letalidade (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2019), sendo o Brasil responsável por mais de 90% dos casos da América Latina, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem priorizado a busca de compostos farmacológicos ativos de plantas medicinais.

Neste sentido, pesquisas com produtos naturais têm adquirido relevância significativa, podendo contribuir com novas opções terapêuticas (QUEIRÃO *et al.*, 2019), especialmente quando são pautados os benefícios trazidos à população, assim como a facilidade de acesso de pessoas socialmente vulneráveis a várias espécies de plantas medicinais com atividade terapêutica (RODRIGUES *et al.*, 2012). Na Lista Nacional de Plantas Relevantes para o Sistema Único de Saúde (RENISUS) do Brasil, estão incluídas as famílias Asteraceae e Lamiaceae representando o maior número de espécies com atividade anti-*leishmania*, sendo a maioria dos estudos brasileiros e cubanos (MARTINEZ *et al.*, 2020).

Extratos vegetais e óleos essenciais oriundos de plantas da família Lamiaceae, como dos gêneros *Rosmarinus*, *Origanum*, *Thimus* e *Salvia* apresentam promissoras atividades biológicas, entre elas: antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas, antivirais e antiparasitárias confirmadas em estudos prévios (CLEFF *et al.*, 2010; GIORDANI, 2017; GUTERRES, 2015; WALLER *et al.*, 2017). Assim como a *Schinus terebinthifolia* Raddi. (Anacardiaceae), que apresenta-se amplamente distribuída no Sul do Brasil e demonstra atividades antifúngica, antibacteriana, entre outras, tanto dos extratos quanto dos óleos essenciais (BIASI-GARBIN *et al.*, 2016; AZAMBUJA, 2015; GIORDANI, 2013).

Entretanto, estudos utilizando preparações de óleos essenciais destas plantas frente a *Leishmania* spp. com extratos vegetais e óleos essenciais não são numerosos na literatura. Assim, foi objetivo do presente estudo avaliar a atividade de extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais frente a patógenos de *Leishmania* spp. de interesse humano e veterinário, além de avaliar a composição química dos extratos que tiveram atividade anti-*leishmania*.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies vegetais e preparação de extratos

Foi realizada a coleta da planta *Schinus* spp. em Pelotas, RS (Sul do Brasil, 31°33'02,0' S, 52°16'45,5" W) entre março e abril de 2015. Amostras das plantas foram depositados no Herbário da Universidade Federal de Pelotas (Pelotas, RS, Brasil) e identificado como *Schinus terebinthifolia* (família Anacardiaceae, nº 25934). As folhas secas de *Origanum vulgare* L. (OV), *Origanum. majorana* L. (OM), *Thymus vulgaris* L. (TV), *Salvia officinalis* L. (SO) and *Rosmarinus officinalis* L. (RO) foram adquiridas de distribuidor comercial (Luar Sul Indústria e Comércio de Produção, Santa Cruz do Sul/RS, Brazil) possuindo laudo de certificação botânica.

Para a preparação dos extratos hidroalcoólicos (*S. Terebinthifolia* - EHST, *O. vulgare* L. - EHOV, *O. majorana* L. - EHOM, *T. vulgaris* L. - EHTV, *S. officinalis* L. - EHSO and *R. officinalis* L. - EHRO), foram utilizados 100 gramas de folhas secas de cada planta em 500 ml de etanol (70% v/v) e filtrados em papel filtro (80 g/m²). O extrato foi concentrado em evaporador rotativo sob vácuo a 50 °C, seguido pela diluição em 500 ml de água destilada estéril (pH 7,5) (Schiedeck G, Bevilaqua GAP, Bachtigal GF, Bauer MVL. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2008). Os extratos hidroalcoólicos foram liofilizados e armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz.

A extração dos óleos essenciais *O. majorana* L. (OEOM) e *R. officinalis* (OERO) foi realizada de acordo com as orientações da Farmacopeia Brasileira IV (1988), sendo o material vegetal submetido à extração com arraste de vapor, em aparelho Clevenger, durante 4 horas. Após a extração, os óleos obtidos foram secos com sulfato de sódio anidro, armazenados em frasco âmbar e refrigerados, até a utilização nos testes. O estudo com o OEOM foi realizado em duas etapas, sendo a primeira com o extrato preparado e utilizado imediatamente para avaliação da atividade antiprotozoária, e segunda etapa, foi realizada após 36 meses de armazenagem do óleo essencial, utilizando a mesma metodologia nos dois ensaios, a fim de verificar a viabilidade do óleo e confirmar a atividade e o tempo de vida útil após o armazenamento.

Análise química dos extratos

Para identificar os compostos presentes nos extratos foi utilizado 20 mg do extrato liofilizado diluídos em 5 mL de metanol e injetados em sistema LC-MS. Uma amostra de 10 µL do extrato foi injetada no UFLC (Shimadzu, Prominence) acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo-tempo de vôo (Bruker, Impact HD). Os compostos fenólicos foram separados usando uma pré-coluna C18 (2,0 mm x 4 mm) e coluna Luna C18 (2,0 mm x 150 mm, 100 Å, 3 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). As fases móveis foram: ácido fórmico aquoso 0,1% (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente de eluição foi de 0-2 min, 10% B; 2-15 min, 10-75% B; 15-30 min, 75% B; 30-32 min 75-10% B; 32-40 min, 10% B, a uma taxa de fluxo de 0,2 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi fixada em 40°C. O detector PDA foi configurado para varrer a faixa de comprimento de onda de 210 a 800 nm. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização negativa, com tensão capilar ajustada em 4000V, pressão do gás nebulizador (N₂) de 2 bar, gás de secagem a 8 L min⁻¹ e temperatura da fonte de 180 °C. O equipamento foi calibrado com formato de sódio 10 mM, cobrindo a faixa de aquisição de

m / z 50 a 1200. Os compostos fenólicos foram caracterizados por espectros de UV-Vis (220-800nm), tempo de retenção em relação aos padrões externos, espectro de massa e fragmentação padrões.

Análise química dos óleos essenciais

A análise qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais foi realizada por meio de cromatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização de chama (GC-FID). A análise de CG foi realizada em HP 7820A (Agilent®) equipada com coluna HP-5 (30 m × 0,32 mm × 0,25 mm) a uma temperatura inicial de 70 °C com adição de 3 °C min⁻¹ a 240 °C. A temperatura do injetor e do detector FID foi de 250 °C e 260 °C, respectivamente. A taxa de fluxo de hidrogênio, usado como gás de arraste, foi de 3 ml min⁻¹ e a razão de divisão de 1:30. Os óleos foram diluídos em clorofórmio (1%) e 1 µL foi injetado no cromatógrafo. A identificação de componentes do óleo foi realizada comparando seus espectros de massa com o índice de retenção de Kovats (R.I.). Os dados foram adquiridos e processados usando o software EZChrom Elite Compact (Agilent).

Ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) para avaliação da atividade antiprotozoária

Os valores de IC₅₀ (concentração das drogas capaz de reduzir 50% da viabilidade celular dos parasitas) frente às formas promastigotas de *L. infantum* e *L. braziliensis* foram determinadas através do ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). As culturas de promastigotas em fase exponencial de crescimento foram ajustados para a concentração de 1.10⁶ parasitas/mL por meio de contagem em câmara de Neubauer e incubadas (25°C) em placas de 96 poços com as drogas em diversas concentrações por 24 horas. Após a incubação as culturas tiveram suas viabilidades determinadas com a adição de 20 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço da placa, seguidos por incubação a 36°C por 3 horas e solubilização dos cristais de formazam com 20 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 30 µL de DMSO (dimetilsufóxido) 100%. A leitura da absorbância dos poços foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. Para cada parasita foi utilizado um controle (sem adição de drogas) ao qual se assumiu 100% de viabilidade celular. Os valores de IC₅₀ foram determinadas por meio do programa GraphPad Prism (versão 9.0.0) utilizando-se os valores de viabilidade celular frente a cada concentração de cada droga. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados (Tabela 1) observa-se que os óleos essenciais OEOM e OERO apresentaram atividade superior aos extratos hidroalcoolicos testados (EHOM, EHOV, EHTV, EHSO e EHRO), com menores IC50 para *L. braziliensis* quando comparada a *L. infantum*. Entre os extratos vegetais que apresentaram capacidade de reduzir 50% da viabilidade celular dos protozoários (Tabela 1) destacam-se EHST (17,34 µg/mL-Li / 22 µg/mL-Lb) e os óleos essenciais de OEOM (1,11 µg/mL-Li; 0,35 µg/mL-Lb) e OERO** (2,75 µg/mL-Li; 2,25 µg/mL-Lb) e OERO (1,11 µg/mL-Li; 0,35 µg/mL-Lb), com atividade nas formas promastigotas de *L. infantum* (Li) e *L. braziliensis* (Lb), respectivamente.

Tabela 1. Atividade inibitória antiprotozoária de extratos polares e apolares de plantas da família Lamiaceae e Anacardiaceae contra 50% (IC50) de *Leishmania* spp.

Planta			<i>Leishmania</i> sp.	IC ₅₀ (µg/mL)
Espécie botânica	Tipo de extrato	Nome popular		
<i>S. terebinthifolia</i>	Hidroalcoólico	Aroeira	<i>L. infantum</i>	17,34 µg/mL
<i>S. terebinthifolia</i>	Hidroalcoólico	Aroeira	<i>L. braziliensis</i>	22 µg/mL
<i>O. vulgare</i>	Etanólico	Orégano	<i>L. infantum</i>	> 100 µg/mL
<i>O. vulgare</i>	Etanólico	Orégano	<i>L. braziliensis</i>	> 100 µg/mL
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Etanólico	Alecrim	<i>L. infantum</i>	> 100 µg/mL
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Etanólico	Alecrim	<i>L. braziliensis</i>	> 100 µg/mL
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Óleo essencial de 3 anos	Alecrim	<i>L. infantum</i>	2,75 µg/mL
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Óleo essencial de 3 anos	Alecrim	<i>L. braziliensis</i>	2,25 µg/mL
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Óleo essencial	Alecrim	<i>L. infantum</i>	0,20 µg/mL
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Óleo essencial	Alecrim	<i>L. braziliensis</i>	0,14 µg/mL
<i>Thymus vulgaris</i>	Etanólico	Tomilho	<i>L. infantum</i>	> 100 µg/mL
<i>Thymus vulgaris</i>	Etanólico	Tomilho	<i>L. braziliensis</i>	> 100 µg/mL
<i>Salvia officinalis</i>	Etanólico	Sálvia	<i>L. infantum</i>	> 100 µg/mL
<i>Salvia officinalis</i>	Etanólico	Sálvia	<i>L. braziliensis</i>	> 100 µg/mL
<i>Origanum majorana</i>	Etanólico	Manjerona	<i>L. infantum</i>	> 100 µg/mL
<i>Origanum majorana</i>	Etanólico	Manjerona	<i>L. braziliensis</i>	> 100 µg/mL
<i>Origanum majorana</i>	Etanólico	Manjerona	<i>L. infantum</i>	1,11 µg/mL
<i>Origanum majorana</i>	Óleo essencial	Manjerona	<i>L. braziliensis</i>	0,35 µg/mL

Com relação ao efeito anti-*leishmania* dos extratos hidroalcoólicos avaliados no estudo, apenas o EHST apresentou efeito nas formas promastigotas de *L. infantum* e *L. braziliensis*, conforme pode ser observado na Figura 1. O extrato de *S. terebinthifolia* utilizado apresentou como os principais componentes galato de etila e Ácido gálico (Tabela 2). Estudo realizado por Giordani (2017) também demonstrou que os polifenóis e flavonóides são os principais constituintes dos extratos das folhas de *S. terebinthifolius*, com relevância para o galato de etila. Acredita-se que a presença de quercetina, miricitrina, entre outros compostos identificados na análise do extrato utilizado neste estudo sejam os responsáveis pela atividade anti-*leishmania*.

Tabela 2. Cromatograma e estruturas químicas de compostos identificados no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e suas respectivas massas moleculares (m/z), tempos de retenção (min) e área (%):

Composto	Massa Molecular
α -pineno	(1 – m/z 136.238; 6.54 min; 11.52%);
Canfeno	(2 – m/z 136.238; 6.91 min; 3.74%);
Sabineno	(3 – m/z 136.238; 7.65 min; 2.24%);
β -pineno	(4 – m/z 136.238; 8.05 min; 1.07%);
α -terpineno	(5 – m/z 136.238; 8.75 min; 0.38%);
Ocimeno	(6 – m/z 134.22; 8.98 min; 2.20%);
1,8-Cineol/eucaliptol	(7 – m/z 154.253; 9.23 min; 47.91%);
Γ -terpineno	(8 – m/z 136.238; 9.95 min; 0.28%);
Linalol	(9 – m/z 154.253; 11.12 min; 1.09%);
Cânfora	(10 – m/z 152.237; 12.47 min; 17.92%);
Isoborneol	(11 – m/z 154.253; 13.07 min; 5.43%);
4 Terpeneol	(12 – m/z 154.253; 13.37 min; 0.95%);
α -terpineol	(13 – m/z 154.253; 13.77 min; 4.08%);
Acetato de bornil	(14 – m/z 196.290; 16.42 min; 0.63%);
Cariofileno	(15 – m/z 204.357; 19.89 min; 0.51%);
α -humuleno	(16 – m/z 204.357; 20.84%; 0.05%).

Os extratos hidroalcoólicos são interessantes para a bioprospecção por apresentarem menor toxicidade e ser possível produzir em grandes quantidades. A Aroeira-mansa (*S. terebinthifolius*) tem se mostrado promissora como fitofármaco com muitas atividades medicinais identificadas (AZAMBUJA, 2015; GIORDANI, 2013; LIPINSKI, 2008; BRANCO NETO

et al., 2006) sendo a composição de *S. terebinthifolia* variável dependendo da parte que é extraída, se extratos de folhas, frutos e caules e ainda, da sua origem. No Sul do Brasil, em geral, predominam os monoterpenos, α - e β -pineno, terpineóis, e os sesquiterpenos germacreno-D, biciclo-germacreno e transcariofileno (DOS SANTOS *et al.*, 2007). Essa planta apresenta a vantagem de ter extensa distribuição no território brasileiro, ocorrendo desde o Nordeste ao Sul do Brasil.

O óleo essencial OEOM utilizado nesse estudo, apresentou três (3) constituintes predominantes, caracterizados como: terpenos, sendo estes o hidrato de cis-sabineno (22,20%), 4-terpineol (14,10%) e o γ -terpinene (8,90%), seguido de α -felandreno (7,52%), α -terpineno (6,13%) e hidrato de trans-sabineno (6,40%), como podem ser analisados na Tabela 2. Essa composição majoritária tem sido relatada para o óleo essencial de *O. majorana* onde também encontram-se terpenos, flavonoides, compostos fenólicos, glicosídeos fenólicos, hidrocarbonetos e taninos (SALES *et al.*, 2020).

Ao analisar os óleos essenciais (OEOM, OERO9 OERO12) percebe-se que estes apresentaram grupos químicos semelhantes entre si. Porém, os compostos majoritários se diferiram entre os gêneros *Origanum* e *Rosmarinus*. No caso do óleo essencial de *O. majorana*, os principais componentes identificados foram o hidrato de cis-sabineno, 4-terpineol, o γ -terpineno, o α -terpineno, enquanto o óleo essencial de *R. officinalis* apresentou componentes majoritários diferentes, sendo estes o cineol, a cânfora e o α -pineno.

Na Figura 1, pode-se observar o efeito dos óleos essenciais (OERO 9 e OERO 12) sobre as duas espécies de *Leishmania*. Embora os extratos sejam oriundos da mesma espécie de planta, de mesma origem comercial e terem passado pelo mesmo método de extração, tiveram diferentes desempenhos em relação a *L. infantum* e *L. braziliensis* o que pode ter ocorrido devido a peculiaridades entre as duas espécies do protozoário. A diferença na ação anti-*leishmania* spp entre OERO 9 e OERO 12, pode ser atribuída a diferença na composição química, sendo que OERO 9 apresentou como perfil químico principalmente os compostos fenólicos 1,8-cineol / eucaliptol (7 - 47,91%), cânfora (10 - 17,92%) e α -pineno (11 - 11,52%) dentre os 16 compostos identificados.

Uma informação importante está relacionada a manutenção de atividade dos óleos quanto ao armazenamento. Na avaliação das atividades anti-*leishmania* dos óleos essenciais OERO 12 e OERO 9 verifica-se que houve atividade de ambos. O menor desempenho de OERO 9 pode

ter ocorrido devido a degradação e alterações de compostos com o tempo de estocagem (três anos). Sabe-se que a atividade dos produtos naturais está diretamente relacionada com a composição dos extratos e que o tempo de armazenagem pode resultar na volatilização dos compostos. O óleo essencial de alecrim é uma mistura complexa de compostos voláteis e altas concentrações de 1,8-cineol, cânfora e α -pineno estão presentes na planta cultivada na Sérvia, Itália e Tunísia (RAŠKOVIĆ *et al.*, 2014; MUGNAINI *et al.*, 2012; WALLER *et al.*, 2017).

Diversas pesquisas têm sido realizadas com os óleos essenciais do gênero *Origanum* e *Rosmarinus*, sendo que, em sua maioria, os componentes majoritários identificados são semelhantes aos observados nesse trabalho, como é o caso do estudo realizado por Azambuja e colaboradores (2015) que detectou os mesmos compostos majoritários nos óleos essenciais de *O. majorana* e *R. officinalis*. Outros autores relatam ter encontrado ainda hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona, acetato de isobornila, terpenóides (carnosol, ácido carnosílico, ácido oleânico e ácido ursólico), flavonóides (diosmetina, diosmina, gencuanina, luteolina, hispidulina e apigenina), além de ácido rosmarínico, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido neoclorogênico e ácido labiático como no trabalho de Silva *et al.*, (2008)

Embora existam estudos comprovando a atividade de alguns componentes majoritários das plantas medicinais isoladamente, deve-se considerar a existência de efeitos provocados pelo sinergismo entre todos os componentes do produto, incluindo majoritários e minoritários e sua influência no mecanismo de ação (HICHEM *et al.*, 2016).

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis, que são encontrados em grande abundância entre os metabólitos secundários das plantas, nas quais são responsáveis por desempenhar diversas funções como: inseticida, repelente e antimicrobiano. Os flavonoides presentes nas plantas avaliadas neste trabalho são reconhecidos por apresentarem inúmeras atividades (Rodrigues, 2020). Cumarinas e terpenóides têm sido reconhecidos como agentes anti-*leishmania* (Rodrigues, 2020). A cumarina simples e seus derivados, ou seja, 1,2-benzopirona, aurapteno e sesquiterpeno cumarinas, são ativas contra o gênero *Leishmania* (Bravo *et al.*, 1999; Bashir *et al.*, 2014) e formulações nanolipossômicas de cumarinas foram desenvolvidas para melhorar seu potencial farmacológico para o tratamento cutâneo (Mandlik *et al.*, 2020).

Vários produtos naturais extraídos de plantas, incluindo extratos brutos e moléculas isoladas (ou seja, flavonóides, cumarinas e terpenóides) mostraram sua atividade anti-*leishmania* devido a uma ação direta no parasita e/ou na resposta imune do hospedeiro (Rodrigues, 2020). No entanto, é importante destacar que nos extratos brutos os constituintes ativos estão normalmente em pequenas concentrações (BELL, 1980) e isso pode ser um possível motivo da reduzida atividade dos extratos hidroalcoolicos frente a *Leishmania* spp.

Outros estudos podem ser realizados no intuito de testar outras concentrações e outros tipos de extratos destas plantas utilizadas no presente trabalho (*O. vulgare*, *O. majorana*, *T. vulgaris*, *S. officinalis* e *R. officinalis*), podendo também ser utilizados óleos essenciais, compostos isolados e outras partes da planta (folha, raiz, fruto), uma vez que inúmeros fatores interferem na composição do extrato e conseqüentemente na sua atividade. Por exemplo, em relação ao extrato EHOM deste estudo, que não foi capaz de inibir o crescimento de *Leishmania* spp. mas ao ser utilizado o óleo essencial da mesma planta (OEOM) foi observado efeito positivo na inibição frente aos mesmos isolados do protozoário, provavelmente devido a presença de terpenos. Ainda, deve-se considerar que os extratos podem ter outras aplicações, como por exemplo, no controle do vetor atuando na interrupção do ciclo da enfermidade. Pesquisas para obtenção de inseticidas naturais menos poluentes e mais seletivos para o controle vetorial tem sido desenvolvidas (BOBADILLA *et al.*, 2005; SANTIAGO *et al.*, 2005; GUISSONI *et al.*, 2013) e são necessárias.

CONCLUSÃO

O extrato de *S. terebinthifolia* (EHST) e óleos essenciais de *R. officinalis* (OERO) e *O. majorana* (OEOM) família Lamiaceae apresentaram atividade de inibição no crescimento de *L. infantum* e *L. braziliensis* e se mostram promissores para continuação dos estudos frente as formas amastigotas. Nesse sentido, este estudo contribui para a descoberta e desenvolvimento de agentes químicos de origem natural com atividade farmacológica, que podem ser utilizados na prevenção e controle das leishmanioses, doenças infecciosas e vetoriais de alta prevalência no Brasil.

**ANTIPROTOZOAL ACTIVITY OF POLAR AND NON-POLAR EXTRACTS OF PLANTS
FROM LAMIACEAE AND ANACARDIACEAE FAMILY AGAINST *LEISHMANIA
INFANTUM* AND *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

ABSTRACT

Due to the imminent need to search therapeutics alternatives for treatment of visceral leishmaniasis and the great impact they have worldwide on *One Health*, the aim of this study was to evaluate the activity of hydroalcoholic extracts and essential oils against *Leishmania* spp. through the colorimetric assay of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), in addition, to evaluate the chemical composition of the extracts that showed anti *leishmania* activity (*Schinus terebinthifolia* [EHST] extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. [OERO] and *Origanum majorana* L. [OEOM]). The essential oils of OEOM and OERO showed activity against *Leishmania* spp. superior than the hydroalcoholic extract tested (*Origanum majorana* L. - EHOM, *Origanum vulgare* L. - EHOV, *Thymus vulgaris* L. - EHTV, *Salvia officinalis* L. - EHSO e *Rosmarinus officinalis* L. - EHRO), with lower IC50 for *Leishmania braziliensis* (Lb) when compared to *Leishmania infantum* (Li). Among the plant extracts that were able to reduce by 50% the cell viability of the protozoan in the promastigote form are EHST (17,34 µg/mL-Li/22 µg/mL-Lb) and essential oils of OEOM (1,11 µg/mL-Li; 0,35 µg/mL-Lb) and OERO** (store for three years) (2,75 µg/mL-Li; 2,25 µg/mL-Lb) and OERO (1,11 µg/mL-Li; 0,35 µg/mL-Lb). As for the essential oils OERO and OEOM of Lamiaceae Family, both showed inhibitory activity on the growth of *L. infantum* and *L. braziliensis* and are promising for further studies in amastigote forms.

KEYWORDS: *Leishmania* spp. Natural products. *Schinus terebinthifolia*. *Rosmarinus officinalis*. *Origanum majorana*.

**ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE EXTRACTOS POLARES Y NO POLARES DE
PLANTAS DE LA FAMILIA LAMIACEAE Y ANACARDIACEAE FRENTE A
LEISHMANIA INFANTUM Y *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

RESUMEN

Debido a la inminente necesidad de buscar alternativas terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y el gran impacto que tienen a nivel mundial en *One Health*, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad de extractos hidroalcohólicos y aceites esenciales frente a *Leishmania* spp., a través de la ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) además de evaluar la composición química de extractos que mostraron actividad anti-*leishmania* (extracto de *Schinus terebinthifolia* (EHST)

y Aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) y *Origanum majorana* L. (OEOM) Los aceites esenciales OEOM y OERO mostraron una actividad superior contra *Leishmania* spp., *Thymus vulgaris* L. - EHTV, *Salvia officinalis* L. - EHSO y *Rosmarinus officinalis* L. - EHRO, con menor IC50 para *Leishmania braziliensis* (Lb) en comparación con *Leishmania infantum* (Li). Los extractos vegetales que lograron reducir en un 50% la viabilidad celular del protozoo en forma de promastigote son el EHST (17,34 µg/mL -Li/22 µg/mL-Lb) y los aceites esenciales de OEOM (1,11 µg/mL- li; 0,35 µg/mL-Lb) y OERO** (almacenado durante tres años) (2,75 µg/mL-Li; 2,25 µg/mL-Lb) y OERO (1,11 µg/mL-Li; 0,35 µg/mL-Lb). En cuanto a los aceites esenciales OERO y OEOM de la familia Lamiaceae, ambos mostraron actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *L. infantum* y *L. braziliensis* y son promisorios para futuros estudios en las formas amastigotas.

PALABRAS CLAVE: *Leishmania* spp. Productos naturales. *Schinus terebinthifolia*. *Rosmarinus officinalis*. *Origanum majorana*.

AGRADECIMENTOS

Capes, CNPq, UFPel e ICC-Fiocruz/PR.

REFERÊNCIAS

AZAMBUJA, R. H. M. **Prospecção dos óleos essenciais da família Lamiaceae sobre ovos de *Ancylostoma* spp.** 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

BALASSEGARAM M.; RITMEIJER, K.; LIMA, M. A.; BURZA, S.; GENOVESE, G. O.; MILANI, B.; GASPANI, S.; POTET, J.; CHAPPUIS, F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opinion Emerging Drugs**. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23167833/>. Acesso em: Outubro 2019.

BELL, E. A. possible significance of secondary compounds in plants. **Encyclopedia of plant physiology. New series**, 1980.

BIASI-GARBIN, R. P.; DEMITTO, F. O.; AMARAL, R. C. R.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L.; SVIDZINSKI, T. I. Antifungal potential of plant species from Brazilian caatinga against dermatophytes. **Revista Instituto Medicina Tropical**, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/BzH9v5DcHvvggL9NGNVrhNhy/abstract/?lang=en>. Acesso em: 25 mar. 2019.

BRANCO NETO, M. L. C.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; CZECHKO, N. G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/acb/a/MdByrsXYWtCpRBy7yqsCPxH/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 19 mar. 2019.

BRAVO, J. A. B.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A. T.; VICTORIA MUNOZ, V. O.; CALLAPA, J.; L. E.; MEN-OLIVIER, L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v.50, p.71-74, 1999.

BASHIR, S.; ALAM, M.; ADHIKARI, A.; SHRESTHA, R. L.; YOUSUF, S.; AHMAD, B.; PARVEEN, S.; AMAN, A.; CHOUDHARY, M. I. New antileishmanial sesquiterpene coumarins from *Ferula narthex* Boiss. **Phytochemistry Letters**, v. 9, p. 46-50, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874390014000640>>. Acesso em: Novembro de 2019.

BOBADILLA, M.; ZAVALA, F.; SISNIEGAS, M.; ZAVALETA, G.; MOSTACERO, J.; TARAMONA, L. Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). **Revista peruana de Biología**, v. 12, n. 1, p. 145-152, 2005.

CLEFF M. B.; MEINERZ A. R. M.; FARIA, R. O. D.; XAVIER, M. O.; SANTIN, R.; NASCENTE, P. D. S.; MEIRELES, M. C. A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/FLtZYR3zZbXGj4B6kxYX3yR/?lang=pt>. Acesso em: 19 nov. 2019.

DOS SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P. L.; SERAFINI, L. A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius Raddi*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 1011-1013, 2007.

GIORDANI, C. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos**. Pelotas: UFPel, 2017. 150p. Tese (Doutorado em Veterinária), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

GIORDANI, C. **Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente a *Malassezia pachydermatis***. Pelotas: UFPel. 140f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

GUISSONI, A.C.P.; SILVA, I.G.; GERIS, R.; CUNHA, L.C.; SILVA, H.H.G. Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 363-367, 2013.

GUTERRES, K. A. **Microrganismos De Lesões Cutâneas De Pequenos Animais: Resistência A Antimicrobianos E Bioprospecção De Extratos De Plantas Da Família Lamiaceae E Fabaceae**. 2015. Pelotas: UFPel, 2015. 97p. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

HICHEM, H.; MAATALLAH, S.; NASRI, N.; NASR, H. Germination capacity of some halophytic plants species under increasing salinity. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 43, p. 4333-4342, 2016.

LIPINSKI, L. C. **Comparação da atividade cicatrizante na pele bovina entre fitoterápicos de uso tópico**. 2008. Paraná: UFPR, 2008. 64p. Dissertação (Mestrado em Veterinária). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; VALADAS, S. Y. O. B.; NICHOLLS, S.; PUPPIM BUZANOVSKY, L. **Informe Epidemiológico das Américas. Informe de Leishmanioses, nº 7, p. 1-10, 2019.**

MANDLIK, R.; THAKRAL, V.; RATURI, G.; SHINDE, S.; NIKOLLI'Ç, M.; TRIPATHI, D. K.; SONAH, H.; DESHMUKH, R. Significance of silicon uptake, transport, and deposition in plants. **Journal of Experimental Botany**. v.71, n. 21, p. 6703–6718, 2020.

MARTINEZ, L. DO N.; RODRIGUES, DA S. L.; SILVA, N. B. DA S.; DOS SANTOS, E. V.; COSTA, J. D. N.; RODRIGUES, F. L.; SANTOS, E. V. Avaliação etnobotânica das espécies das famílias Asteraceae e Lamiaceae utilizadas com potencial medicinal na região de Porto Velho–Rondônia. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, 2020. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/saude/article/view/8501>. Acesso em: 19 de janeiro de 2020.

MUGNANI, M. P.; VARNER, R. K.; STEELE, K.; FREY, S. D.; CRILL, P. M. Ecosystem-Vegetation Dynamics in Sub-arctic Stordalen Mire, Sweden. In: **AGU Fall Meeting Abstracts**. 2012. p. B51B-0556.

QUEIRÃO, A. L.; DE SOUSA, D. L.; DA SILVA, I. P.; GOMES, M. Z.; SAMPAIO, M. G. V. A Toxicidade Das Drogas Empregadas No Tratamento De Leishmaniose E Tripanossomíase Americana. In: **MOSTRA CIENTÍFICA EM BIOMEDICINA**. Cidade: Quixadá. 2019. p. 1.

RAŠKOVIĆ, A.; MILANOVIC, I.; PALVOVIC, N.; CEBOVIC, T.; VUKMIROVIC, S.; MIKOV, M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

RODRIGUES, A.; SIMONI C. D.; MACHADO, G. N. As plantas medicinais e terapia no contexto da atenção básica/estratégia saúde da família. In: **Cadernos de Atenção Básica - Práticas Integrativas e Complementares**. Brasília: Distrito Federal, 2012. Cap. 2, p. 27-34.

RODRIGUES, N. L. de C. **Bioprospecção e seleção de ativos de Amburana cearensis com efeito leishmanicida (*Leishmania braziliensis*) por imunomodulação**. Fortaleza: UFC, 2020. 115p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, 2020.

SANTIAGO, G. M. P.; VIANA, F.A.; PESSOA, O.D.L.; SANTOS, R.P.; POULIQUEN, Y.B.N.; ARRIAGA, A.M.C.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R. t al. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 187-190, 2005.

SALES, G. B.; ALENCAR, J. B.; SANTOS, R. O.; SOUSA, A. P.; FILHO, A. A. O.; *Origanum majorana* como agente ansiolítico em Odontologia: uma revisão literária. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, 2020.

SILVA, M. D. S. A.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. D. A. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/bXkb9yX8gRXF5HwL4R6R7dH/?lang=pt>. Acesso em: 25 mar. 2018.

WALLER, S. B.; CLEFF, M. B.; SERRA, E. F.; SILVA, A. L.; GOMES, A. R.; DE MELLO, J. R. B.; DE FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. 2017. Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. **Microbial Pathogenesis**, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401016307161>. Acesso em: 25 mar. 2019.

4 Considerações Finais

Conclui-se que existem animais sororreagentes no teste de triagem DPP® nos municípios de Pelotas, Capão do Leão, Jaguarão e São Lourenço do Sul e a constatação de animais sororreagentes nos municípios referidos serve de alerta para a circulação do parasito na região. Sendo assim, há necessidade de alertar os profissionais médicos veterinários de Pelotas e região para o risco eminente que a presença dos animais infectados pode significar. Ainda, há necessidade de realizar os testes confirmatórios das amostras sororreagentes do estudo, uma vez que não foi possível a realização durante o estudo, para mapear as áreas de onde esses animais são oriundos visando conhecer a epidemiologia da doença na região sul do Rio Grande do Sul.

No *screening* realizado, o extrato de *S. terebinthifolia* (EHST) e os óleos essenciais de *R. officinalis* (OERO) e *O. majorana* (OEOM) da família Lamiaceae apresentaram atividade de inibição no crescimento de *L. infantum* e *L. braziliensis* e se mostram promissores para continuação dos estudos frente as formas amastigotas

Referências

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances Parasitology**. v.57, p.1–88, 2004. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=9ABfjuSoyL0C&oi=fnd&pg=PA1&dq=+Canine+leishmaniasis&ots=XRL2D7X6OR&sig=WqFJrKR81myipXfwDN4Rme0h84o#v=onepage&q=Canine%20leishmaniasis&f=false>> Acesso em: ago. 2019.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 259-265, 2004. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/csp/a/S9f9qLJprgxD4NSwswDm6fx/abstract/?lang=pt>>. > Acesso em: out. 2019.

ARUDA, M. M. L., SARTOR, D.R., MARTINS, J.P. **Programa de Zoonose Região Sul**: Manual de zoonoses. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná, Curitiba: CRMV, 2009. 168p.

AZAMBUJA, Rosaria Helena Machado. **Prospecção dos óleos essenciais da família Lamiaceae sobre ovos de *Ancylostoma* spp.** 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

AZEVEDO, J. S. C.; ESMERALDINO, A. T.; ÁVILA, V. P. F.; WITZ.,M. I.; FISCHER, C. D. B.; TARTAROTTI, A. L. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de São Borja, Rio Grande do Sul, Brasil: relato de caso. **Veterinária em Foco** v. 7, p. 52-61, 2009. Acesso em: <http://bichosonline.vet.br/wpcontent/uploads/2015/03/revista_v7_n1.pdf#page=53> Acesso em: jun. 2019.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M.L.D.; ALVIM, N.A.T.; ZANETTI, G.D.; HEISLER, E.V. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363-70, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/tce/a/RYSYv9rM7rsDP7dzThJVsj/?lang=pt>>. Acesso em: out. de 2019.

BALASSEGARAM M.; RITMEIJER, K.; LIMA, M.A.; BURZA, S.; GENOVESE, G.O.; MILANI, B.; GASPANI, S.; POTET. J.; CHAPPUIS, F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v.17, n.4, p. 493-510. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23167833/>>. Acesso em: out. 2019.

BANETH, G. SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.106, p-315-324, 2002. Acesso em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401702001152>>
Acesso em: mai. 2019.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V.S.; Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*. **Sociedade Brasileira de Química**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/26002>>. Acesso em: nov. de 2019.

BARROS, C. C.; SOUZA, G. D.; GALLAS, M.; SILVEIRA, E. F. **Levantamento de casos registrados de leishmaniose visceral canina (LVC) em 2017 no Rio Grande do Sul**. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 24.,2018, Canoas. – *Anais do XXIV Salão de Iniciação Científica e Tecnológica Canoas: EXPOULBRA*, 2018. Disponível em: <<http://www.conferencias.ulbra.br/index.php/fpu/xviiiiforum/paper/viewFile/11527/4861>> Acesso em: mai. 2019.

BARROS, J. H. S. et al. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control?. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 7, p. 419-423, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/106/7/419/1892457?login=false>> Acesso em:

BASHIR, S.; ALAM, M.; ADHIKARI, A.; SHRESTHA, R.L.; YOUSUF, S.; AHMAD, B.; PARVEEN, S.; AMAN, A.; CHOUDHARY, M.I. New antileishmanial sesquiterpene coumarins from *Ferula narthex* Boiss. **Phytochemistry Letters**, v. 9, p. 46-50, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874390014000640>> Acesso em: nov. de 2019.

BERLINK, R. G.S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 27-30, 2012. Disponível em: <<http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v64n3/a10v64n3.pdf>> Acesso em: Novembro de 2019.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanização da Leishmaniose Visceral em Belo Horizonte. **Arq Bras Med Vet Zootec** v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001. Disponível em:<<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/nyfGgwRPXkJvxyhdwkbNyz/abstract/?lang=pt>> Acesso em: jul. 2019.

BIASI-GARBIN, R.P.; DEMITTO, F.O.; AMARAL, R.C.R.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L.; SVIDZINSKI, T.I. Antifungal potential of plant species from Brazilian caatinga against dermatophytes. **Revista Instituto Medicina Tropical**. v.58, n.18, São Paulo. 2016.

BOBADILLA, M.; ZAVALA, F.; SISNIEGAS, M.; ZAVALA, G.; MOSTACERO, J.; TARAMONA, L. Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). **Revista Peruana de Biología**, v. 12, n. 1, p. 145-152, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-

99332005000100014> Acesso em: abr. 2019.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 1, p. 04-05, 2016. Disponível em:
<<http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v64n3/a10v64n3.pdf>> Acesso em: dez. de 2019.

BRAGA MDM, COELHO ICB, POMPEU MMLP, EVANS TG, MACAULLIFE IT, TEIXEIRA MJ, ET AL. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imunoenzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Rev Soc Bras Med Trop**. n. 31, p.5, 1998. Disponível em:
<<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/ZMnKgkvpxYqmQGyCvFY8bVd/abstract/?lang=pt>> Acesso em: out. 2019.

BRANCO NETO, M. L. C.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; CZECZKO, N. G. AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira Suppl.**, v.2, p.15-20, 2006. Disponível em:
<<https://www.scielo.br/j/acb/a/MdByrsXYWtCpRBy7yqsCPxH/?lang=pt>> Acesso em: mai. 2019.

BRASIL. Congresso Nacional. **Texto do Decreto-Lei no. 9.782**, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. DOU. Poder Legislativo, de 27 janeiro de 1999. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1999/lei-9782-26-janeiro-1999-344896-publicacaooriginal-1-pl.html>> Acesso em: jul. 2019.

BRASIL. **Manual de vigilância**: controle da leishmaniose visceral. Brasília, Ministério da Saúde, 2006. p.31. Disponível em:
<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf> Acesso em: ago. 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília :Ministério da Saúde, 2005.816 p. Disponível em:
<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf> Acesso em: jun. 2019.

BRASILEISH. **Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina**. Edição única, 2018. 16p. Disponível em:
<https://www.brasileish.com.br/assets/files/diretrizes_TODOS.pdf.> Acesso em: jul. 2019.

BRAVO, J. A. B.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A.T.; VICTORIA MUNOZ, V. O.; CALLAPA, J.;LE MEN-OLIVIER,L.; MASSIOT, G.;LAVAUD, C. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v.50, p.71-74, 1999. Disponível em:
<https://www.academia.edu/20570410/Bioactive_phenolic_glycosides_from_Ambura

na_cearensis> Acesso em: mar. 2019.

BRENNA, E.; FUGANTI, C.; SERRA, S. Enantioselective perception of chiral odorants. **Tetrahedron: asymmetry**, v. 14, n. 1, p. 1-42, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0957416602007139>> Acesso em: abr. 2019.

CAPELLA, Gabriela de Almeida. **Ambiente como fonte de formas parasitárias e potencial de extratos vegetais da família Lamiaceae contra parasitos do gênero Toxocara**. 2017. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2018/01/Gabriela-de-Almeida-Capella.pdf>>. Acesso em: jan. 2019.

CARVALHO, I. P. S. F. **Leishmaniose visceral no Brasil: avaliação econômica dos esquemas de tratamento**. 2019. 191 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. 2019. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/36892/1/2019_IsisPoliannaSilvaFerreiradeCarvalho.pdf> Acesso em: 10 out. 2020.

CHAPPUIS, F.; S., SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. p 873 - 882, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17938629/>> Acesso em: fev. 2019.

CLEFF, M. B., MEINERZ, A. R. M., FARIA, R. O. D., XAVIER, M. O., SANTIN, R., NASCENTE, P. D. S., MEIRELES, M. C. A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/FLtZYR3zZbXGj4B6kxYX3yR/?lang=pt>> Acesso em: mar. 2019.

CORRAL-CARIDAD, M. J.; MORENO, I.; TORAÑO, A.; DOMÍNGUEZ, M.; ALUNDA, J.M. Effect of allicin on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Experimental Parasitology**. v. 132, n. 4, p. 475– 482, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22995646/>> Acesso em: mar. 2019.

COSTA, Simone Miranda da et al. **Impactos das mudanças climáticas e ambientais na distribuição espacial de Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani (Antunes & Coutinho, 1939)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e no processo de expansão geográfica da Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil**. 2018. 333f. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde) – Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/29294>> Acesso em: mar. 2019.

COURA-VITAL, W.; KER, H.G.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; LEAL, G.G.A.; MOREIRA, N.D.; CORRÊA-OLIVEIRA, L.A.M.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **Plos One**.v.9, n.3, p.1-6, 2014. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24608904/>> Acesso em: abr. 2019.

DA COSTA, Valéria et al. First description of parasite load and clinicopathological and anatomopathological changes in a dog naturally coinfecting with *Diocotophyme renale* and *Leishmania infantum* in Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 18, p. 100351, 2019. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2405939019302072>>

Acesso em: fev. 2019.

DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BANETH, G.; et al. Canine leishmaniasis control in the context of one health. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 12, p. 1, 2019.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6874277/>> Acesso em: mai. 2019.

DANTAS-TORRES, Filipe; BRANDÃO-FILHO, Sinval P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/Pnn6YQ5vTxShfVtXDPP5Wtv/?lang=pt>> Acesso em: jun. 2019.

DANTAS-TORRES, Filipe et al. Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S147149221200147X>>

Acesso em out. 2019.

DANTAS-TORRES, Filipe. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401707003597>>

Acesso em: jun. 2019.

DAY, M. J.; CRAWFORD, C.; MARCONDES, M.; SQUIRES, R. A. **Recomendações sobre a vacinação para médicos veterinários de pequenos animais da América Latina: um relatório do Grupo de Diretrizes de Vacinação da WSAVA**, 2020.

Disponível em: <<https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/08/Recommendations-on-vaccination-for-Latin-American-small-animal-practitioners-Portuguese.pdf>>

Acesso em: jul. 2019.

DE ARAUJO SOUSA, P.S.; NOGUEIRA, S.S.; AYALA, K.N.R.; SILVA, P.C.; SANTOS, E.S.; SÁ, R.E.; NETO, F.E.M.L.; LIMA, J.R.C.; RODRIGUES, K.A.F.; ROCHA, J.A.; VÉRAS, L.M.C. Prospecção científica e tecnológica de *Pilocarpus microphyllus* e do alcaloide epiisopiloturina com ênfase na atividade anti*leishmania*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, 2021. Disponível em:

<<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUK>>

Ewjj6avuzal6AhUNpJUCHV38CXwQFnoECAwQAQ&url=https%3A%2F%2Frsdjournal.org%2Findex.php%2Frsd%2Farticle%2Fdownload%2F16984%2F15124%2F215877&usg=AOvVaw0sEJ1plm7mPtuyk9-m_1Pu> Acesso em: abr. 2019.

DE CARVALHO, Flávio Luiz Nunes et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiology & Infection**, v. 146, n. 5, p. 571-576, 2018. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/canine-visceral-leishmaniasis-diagnosis-a-comparative-performance-of-serological-and-molecular-tests-in-symptomatic-and-asymptomatic-dogs/CCC5A551BBA1279293233DADCB901974>> Acesso em: mai. 2019.

DE FREITAS, Eloisa et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16414196/>> Acesso em: jun. 2019.

DE SOUSA, C.M. H.; WINCK, C. A. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Da Universidade Vale Do Rio Verde**, v. 16, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/3383>> Acesso em: jul. 2019.

DIAS, E. S.; MICHALSKY, E. M.; NASCIMENTO, J. C.; FERREIRA, E. C.; LOPES, J. V. C. L. Detection of *Leishmania infantum*, the Etiological Agent of Visceral Leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a Putative Vector of Cutaneous Leishmaniasis, **J Vector Ecol** v. 38 n.1, p. 193-196, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1948-7134.2013.12028.x>> Acesso em: mai. 2019.

DO NASCIMENTO MARTINEZ, L.; SILVA, N.B.; COSTA, J.D.N.; RODRIGUES, F.L.; SANTOS, E.V. Avaliação etnobotânica das espécies das famílias asteraceae e lamiaceae utilizadas com potencial medicinal na região de Porto Velho–Rondônia. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 431-445, 2020.

DOS SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P.L.; SERAFINI, L.A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 1011-1013, 2007. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/819/691>> Acesso em: ago. 2019.

ECHEVERRI, Fernando. From research to application. Where are we going?. **Medical Plant Communications**, Chile, v. 3, n. 2, p. 17-21, 2020. Disponível em: <<https://mpc.ms-editions.cl/index.php/mpc/article/view/3>> Acesso em: jul. 2019.

ECKERT, J.; SOUZA, G. D. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Estrela e primeiro registro de *Lutzomyia pascalei* (Coutinho & Barretto) no Rio Grande do Sul. **Rev Bras Biocienc**, Rio Grande do Sul, v. 8, n. 4, 2010. Disponível em:

<<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1555>> Acesso em: mai. 2019.

ESCOBAR, T. A.; DÖWICH, G.; ZURAVSKI, L.; CANTELE, L. C.; DUARTE, C. A.; LÜBECK, I. Risk factors associated to canine visceral leishmaniasis in Uruguiana city, Brazil. **Semina Cienc Agrar**, Brasil, v. 39, n. 1, p. 211-220, 2018. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/journal/4457/445760069018/html/>> Acesso em: jun. 2019.

Estado de Santa Catarina. Superintendência de Vigilância em Saúde Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Gerência de Vigilância de Zoonoses e Entomologia. **Guia de Orientação Vigilância da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)** Santa Catarina, 2018. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/411280960/Guia-Basico-de-Orientacao-LVC-2018>> Acesso em: mai. 2019.

FIGUEIREDO, F. B.; VASCONCELOS, T. C. B. D.; MADEIRA, M. D. F.; MENEZES, R.C.; MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; MARCELINO, A.P.; WENRNECK, G. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.113, n. 11, p. 1-7, 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/mioc/a/hy34YMKwQ6jxtzjsYz6y4fc/?lang=en>> Acesso em: jun. 2019.

FIGUEIREDO, F.B.; LIMA Jr, F. E. F.; TOMIO, Janaína Eliziane; INDÁ, F.M. C.; CORRÊA, G.L.B.; MADEIRA, M.F.. Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 1-7, 2012. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/2890/289021814017.pdf>> Acesso em: jan. 2019.

FREHSE, M. S. **Vigilância Ativa da Leishmaniose Visceral Canina no Município de São José dos Pinhais – PR**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná 2008. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/16285>> Acesso em: ago. 2019.

GALVIS-OVALLOS, F.; DA SILVA, M. D.; BISPO, G. B.; DE OLIVEIRA, A. G.; NETO, J. R.; MALAFRONTA, R. D.; GALATI, E. A. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite** v. 24, n. 2, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5780806/>>. Acesso em: fev. 2019.

GARCÍA, M.; MONZOTE, L. MONTALVO, A.M.; SCULL, R. Screening of medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 9, p. 1053-1058, 2010. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880200903485729>> Acesso em: abr. 2019.

GENNARI, S. M.; CAÑÓN-FRANCO, W. A.; FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LIMA, F. R. A.; AMAKU, M. Presence of anti-Neospora caninum and Toxoplasma gondii antibodies in dogs with visceral leishmaniosis from the region of Araçatuba, São Paulo, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v. 43, n. 5, p. 613-619, 2006. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/268256019.pdf>>

Acesso em: abr. 2019.

GIORDANI, Claudia. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos**. 2017. 150f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2018/04/Claudia-Giordani.pdf>> Acesso em: fev. 2019.

GIORDANI, Cláudia. **Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente a *Malassezia pachydermatis***. 2013. 140f. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Veterinária) – Universidade Federal de Pelotas. 2013. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/bitstream/123456789/2498/1/dissertacao_claudia_giordani.pdf> Acesso em: 13 out. 2020.

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 121, n. 1-2, p. 23-33, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17723246/>> Acesso em: mar. 2019.

GLUENZ E, GINGER ML, MCKEAN PG. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion in Microbiology**. 2010;13(4):473-9. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20541962/>> Acesso em: abr. 2019.

GOMES, Y.M; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C.; Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **The Veterinary Journal**. v.175, n.1, p.45-54, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023306002358>> Acesso em: abr. 2019.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol** v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbepid/a/R8mCHPzNCQw6n4npxBRxCtt/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em: mai. 2019.

GRILL, F.; ZURMENDI, M. Leishmaniasis visceral en Uruguay. **Arch Pediatr Urug** v. 88, n. 1, p. 32-38, 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.edu.uy/pdf/adp/v88n1/v88n1a07.pdf>> Acesso em: mai. 2019.

GRIMALDI, G.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; DOS SANTOS. C.B;PINTO, I.D.S. DE-AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.106, n.1, p.54–59, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22137538/>> Acesso em: mai. 2019.

GRISOTTI, Marcia; DE CARVALHO DE AMORIM, Lucas. Entre o amor ao animal e

a saúde pública: reflexões sociológicas sobre a leishmaniose visceral canina.

Estudos de Sociologia, v. 25, n. 49, 2020. Disponível em:

<<https://periodicos.fclar.unesp.br/estudos/article/view/14110>> Acesso em: ago. 2019.

GUIMARÃES, V. C. F. V.; PRUZINOVA, K.; SADLOVA, J.; VOLFOVA, V.; MYSKOVA, J.; FILHO, S. P. B.; VOLF, P. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasit Vectors** v. 9, p. 159, 2016. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1444-2>> Acesso em: jun. 2019.

GUISSONI, A.C.P.; SILVA, I.G.; GERIS, R.; CUNHA, L.C.; SILVA, H.H.G. Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 363-367, 2013. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/hL37YhVgnRYLj5ZsTVPGrfM/?lang=pt>> Acesso em: mai. 2019.

GUTERRES, K. A. **Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae**. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015. Disponível em: <<http://guaiaca.ufpel.edu.br/handle/prefix/3417>> Acesso em: jul. 2019

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25614221/>> Acesso em: jul. 2019.

HICHEM, H.; MAATALLAH, S.; NASRI, N.; NASR, H. Germination capacity of some halophytic plants species under increasing salinity. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 43, p. 4333-4342, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/309644044_Germination_capacity_of_some_halophytic_plants_species_under_increasing_salinity> Acesso em: mai. 2019.

HIRSCHMANN, L. C. **Leishmaniose visceral canina: Investigação clínica, laboratorial e epidemiológica em cães de canis de doze municípios do Rio Grande do Sul**. [dissertação]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas, 2013. Disponível em: <<http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/handle/123456789/2329>> Acesso em: mai. 2019.

JUNIOR, A. B.; *et al.*, **Manual Técnico de Leishmanioses Caninas**. 1.ed. Paraná: CFMV, 2015. 44p. Disponível em: <<https://www.crmv-pr.org.br/uploads/publicacao/arquivos/Manual-tecnico-de-leishmanioses-caninas.pdf>> Acesso em: set. 2019.

KAYES, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, p. 604-615, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21747391/>> Acesso em: jul. 2019.

KOGLIN, Terena Souza; KOGLIN, João Carlos. A importância da extensão nas

universidades brasileiras e a transição do reconhecimento ao descaso. **Revista Brasileira de Extensão Universitária**, v. 10, n. 2, p. 71-78, 2019. Disponível em: <<https://periodicos.uuffs.edu.br/index.php/RBEU/article/view/10658>> Acesso em: mar. 2019.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cienc Rural** v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/sYQxg94b4fQjbnP8bdQfWLB/?lang=pt>> Acesso em: ago. 2019.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitol Hum Comp.** v. 63, n.2, p. 134-145, 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3421641/>> Acesso em: set. 2019.

LAURENTI, M. D.; DE SANTANA, L. J. R. M. V.; TOMOKANE, T. Y.; DE LUCCA, H. R. L.; ASCHAR, M.; SOUZA, C. S. F.; SILVA, R. M.; MARCONDES, M.; DA MATTA, V. L. R. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapidtest for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Vet Parasitology** v. 205, n. 3-4, p. 444-450, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25257505/>> Acesso em: ago. 2019.

LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; MATTA, V.L.R.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.P.; SECUNDINO, N.F.C.; PIMENTA, P.F.P.; MARCONDES, M.; 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**. v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23562649/>> Acesso em: fev. 2019.

LAURENTI, Márcia Dalastra. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009. Disponível em: <<https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2009/ses-18617/ses-18617-368.pdf>> Acesso em: jan. 2019.

LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; VASQUEZ, C.; MORETTI, C.; SAUVAIN, M.; BALDERRAMA, L. Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. **Phytochemistry**, v.40, n.1, p.317-320, 1995. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0031942295002659>> Acesso em: jan. 2019.

LEMONS, E.M.; LAURENTI, M.D.; MOREIRA, M.A.B.; REIS, A.B.; GIUCHETTI, R.C.; RAYCHAUDHURI, S.; DIETZE, R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid test (Kalazar Detect TM) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropica**. v.107,p.205-207,2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X08001149>> Acesso em: mar. 2019.

LIMA, V.M.F.; FATTORI, K.R.; MICHELIN A.F.; NETO L.S.; VASCONCELOS R.O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 173, n. 3-4, p. 330-333, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20810216/>> Acesso em: mar. 2019.

LIPINSKI, L. C. **Comparação da atividade cicatrizante na pele bovina entre fitoterápicos de uso tópico**. 2008. 64p. Dissertação (Mestrado em Veterinária). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/24103/Dissertacao%20Leandro%20Cavalcante%20Lipinski.pdf?sequence=1>> Acesso em: set. 2019.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18789583/>> Acesso em: mai. 2019.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; VALADAS, S. Y. O. B.; NICHOLLS, S.; PUPPIM BUZANOVSKY, L. **Informe Epidemiológico das Américas**. Informe de Leishmanioses, nº 7, p. 1-10, 2019.

MALTA, Deborah Carvalho et al. Inquéritos Nacionais de Saúde: experiência acumulada e proposta para o inquérito de saúde brasileiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, p. 159-167, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/asset/s/rbepid/v11s1/16.pdf> Acesso em: abr. 2019

MANDLIK, R.; THAKRAL, V.; RATURI, G.; SHINDE, S.; NIKOLLI'Ç, M.; TRIPATHI, D.K.; SONAH, H.; DESHMUKH, R. Significance of silicon uptake, transport, and deposition in plants. **Journal of Experimental Botany**. v.71, n. 21, p. 6703–6718, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32592476/>> Acesso em: jan. 2019.

MARCONDES, C. B.; PIRMEZ, C.; SILVA, E. S.; LAURENTINO-SILVA, V.; STEINDEL, M.; SANTOS, A. J.; SMANIOTTO, H.; SILVA, C. F. B.; SCHUCK, V. F. N.; DONETTO, A. Levantamento de leishmaniose visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop** v. 36, n. 4, p. 499-501, 2003. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/HmWB3rwjLXHmQYF5xXH76kL/?lang=pt>> Acesso em: mai. 2019.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Res Vet Sci** v. 123, p. 261-272, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30708238/>> Acesso em: mai. 2019.

MARCONDES, Mary; ROSSI, Claudio Nazaretian. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/79913/83859>> Acesso em: mai. 2019.

MAZIERO N. **Ocorrência de *Leishmania Infantum* (Nicolle, 1908) em cães do extremo oeste do estado de Santa Catarina, BRASIL**. 2014. 140f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/42377?show=full>> Acesso em: mai. 2019.

MICHALSKY, Erika Monteiro et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 67-76, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030440170700129X>> Acesso em: mar. 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Nota Técnica Conjunta nº001/2016- Autorização para o registro do produto MILTEFORAN, para tratamento da leishmaniose visceral Canina (LVC) – CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. **Diário Oficial da União Brasília**, 2016. Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>> Acesso em: ago. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota Técnica Conjunta nº01/2011- Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral Canina (LVC) – CGDT-CGLAB/DEVIT. **Diário Oficial da União Brasília**, 2011. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc.pdf> Acesso em: mai. 2019.

MIRÓ, Guadalupe; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. **Veterinary parasitology**, v. 254, p. 151-159, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171830102X>> Acesso em: jul. 2019.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21889825/>> Acesso em: jan. 2019.

MONTEIRO, S. G. Detecção de *Leishmania infantum* em cão no município de Uruguaiana, RS: uma contribuição para a discussão das leishmanioses na região sul do Brasil. **Veterinária e Zootecnia** v. 17, n.4, p. 497-502, 2010. Disponível em: <[https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/veterinaria-e-zootecnia/17-\(2010\)-4/deteccao-de-leishmania-infantum-em-cao-no-municipio-de-uruguaiana-rs-u/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/veterinaria-e-zootecnia/17-(2010)-4/deteccao-de-leishmania-infantum-em-cao-no-municipio-de-uruguaiana-rs-u/)> Acesso em: ago. 2019.

MONTEIRO P.S., LASERDA M.M., ARIAS J.R. Controle da leishmaniose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.27, p.67-72, 1994.

MORAIS, M. H. de. **Guia de Bolso Leishmaniose Visceral**, Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária. 1. ed. Brasília: CFMV, 2020. 194 p.

MOREIRA, R.R.D.; MARTINS, G.Z.; MAGALHÃES, N.O.; ALMEIDA, A.E.; PIETRO, R.C.L.R; SILVA, FLÁVIA, A.J.S.; CICARELLI, R.M.B; In vitro trypanocidal activity of solamargine and extracts from *Solanum palinacanthum* and *Solanum lycocarpum* of Brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 903-907, 2013. Disponível em:
<<https://www.scielo.br/j/bjvras/a/cKgG45Px6Cnbp3jYyxbyRxG/?lang=pt&format=pdf>>
Acesso em: mai. 2019.

MUGNAINI L, NARDONI S, PINTO L, PISTELLI L, LEONARDI M, PISSERI F, MANCIANTI F. 2012. In vitro and in vivo antifungal activity of some essential oils against feline isolates of *Microsporum canis*. **J Mycol Méd.** v.22, p.179–184, 2012. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/230872392_In_vitro_and_in_vivo_antifungal_activity_of_some_essential_oils_against_feline_isolates_of_Microsporum_canis>
Acesso em: mai. 2019.

MUGNANI, M.P.; VARNER, R.K.; STEELE, K.; FREY, S. D.; CRILL, P.M. Ecosystem-Vegetation Dynamics in Sub-arctic Stordalen Mire, Sweden. In: **AGU Fall Meeting Abstracts**. 2012. p. B51B-0556. Disponível em:
<<https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2012AGUFM.B51B0556M/abstract>> Acesso em: abr. 2019.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11ª edição. São Paulo, Atheneu, 2005.498p.

NASCIMENTO, Kamila. COVID-19: a globalização do infortúnio. Simbiótica. **Revista Eletrônica**, v. 7, n. 1, p. 39-52, 2020. Disponível em:
<<https://www.periodicos.ufes.br/simbiotica/article/view/30981/20721>> Acesso em: ago. 2019.

NAUCKE, Torsten J.; LORENTZ, Susanne. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2012. Disponível em:
<<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-67>>
Acesso em: abr. 2019.

NOGUEIRA, F.S.; RIBEIRO, V.M. Leishmaniose Visceral. In: **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. Cap. 80. p. 1270-1298.

OKETCH-RABAH, H.A.; LEMMICH, E.; DOSSAJI, S.F.; THEANDER, T.G.; OLSEN, C.E.; CORNETT, C.; KHARAZMI, A.; CHRISTENSEN, S.B. Two new antiprotozoal 5-methylcoumarins from *Vernonia brachycalyx*. **Journal of Natural Products**, v.60, n 5, p. 458-461, 1997a. Disponível em:
<<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np970030o>> Acesso em: jun. 2019.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G. R.; ESPINDOLA, I. A. C.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL, R. P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v.101, n. 8, p. 869-874, 2006. Disponível em:
<<https://www.scielo.br/j/mioc/a/FzDd4HNdpTpgB5QWVFZ8s5r/?lang=en>> Acesso

em: jul. 2019.

OLIVEIRA, A. G.; GALATIE, A. B.; FERNANDES, C. F.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL, R. P. Seasonal variation of *Lutzomya longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic areas of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Trop** v. 105, n. 1, p. 55-61, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X07002306>> Acesso em: set. 2019.

OPAS/OMS. **Informe Epidemiológico das Américas**. Informe de Leishmanioses Nº 7 - Março, 2019. Disponível em: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?ua=1>> Acesso em: fev. 2019.

OPAS/OMS. **Informe Epidemiológico das Américas**. Informe de Leishmanioses Nº 5 - Abril, 2017. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34111/informe_leishmaniasis_5_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y> Acesso em: set. 2019.

OPAS/OMS. **Informe Epidemiológico das Américas**. Informe de Leishmanioses Nº 9 - Março, 2020. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>> Acesso em jul. 2019.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789233/>> Acesso em: jun. 2019.

OTRANTO D., DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends Parasitology**. v.29, n.7, p.339-345. 2013 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23746747/>> Acesso em: ago. 2019.

OTRANTO, D., PARADIES, P., SASANELLI, M.; LEONE, N.; CAPARIS, D.; CHIRICO, J.; BRANDONISIO, O. Recombinant K39 Dipstick Immunochromatographic Test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.17, p.32-37.2005. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870501700107>> Acesso em: ago. 2019.

PALATNIK, D. S. C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasit Vectors**. v. 4, n.1, p. 197, 2011. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-197>> Acesso em: mai. 2019.

PASQUALI, A. K. S.; BAGGIO, R. A.; BOEGER, W. A.; GONZÁLEZ-BRITEZ, N.; GUEDES, D. C.; CHAVES, E. C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Dispersion of *Leishmania (Leishmania) infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. **PLoS Negl Trop Dis** v. 13, n. 8, 2019. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article/authors?id=10.1371/journal.pntd.0007639>>

Acesso em: abr. 2019.

PATTABHI, Sowmya et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 9, p. e822, 2010. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000822>> Acesso em: set. 2019.

PETERSEN, C.A.; BARR, S.C.; Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. v.39. n.6, p.1065-74.2009. Disponível em: <[https://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616\(09\)00100-4/fulltext](https://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616(09)00100-4/fulltext)> Acesso em: ago. 2019.

PINAFO, Elisangela et al. Problemas e estratégias de gestão do SUS: a vulnerabilidade dos municípios de pequeno porte. **Ciência & saúde coletiva**, v. 25, p. 1619-1628, 2020. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/csc/a/gPnKF8DqfgKyxtgPyb5hYgG/abstract/?lang=pt>>

Acesso em: ago. 2019.

POCAI, E.; FROZZA, L.; HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Leishmaniose Visceral (Calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Cienc Rural** v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/cr/a/mk4cfn8vrSPXZWWybnqYZvR/abstract/?lang=pt>>

Acesso em: mai. 2019.

QUEIRÃO, Andreyanna Lima et al. A Toxicidade Das Drogas Empregadas No Tratamento De Leishmaniose E Tripanossomíase Americana. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 4, n. 1, 2019. Disponível em:

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjRqfzS0aL6AhUgpJUCHdy2APAQFnoECAgQAQ&url=https%3A%2F%2Fpublicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br%2Findex.php%2Fmostrabiomedicina%2Farticle%2Fview%2F3428%2F2960&usg=AOvVaw3d3h0mmtnugNGnKesaeCBA>.

QUINNELL, R. J. et al. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology*, v. 115, n. 2, p. 143-156, 1997. Disponível em:

<<https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/epidemiology-of-canine-leishmaniasis-transmission-rates-estimated-from-a-cohort-study-in-amazonian-brazil/D46F8C285EFB8CC02B78295FD67CB72C>> Acesso em: set. 2019.

RAŠKOVIĆ A, MILANOVIĆ I, PAVLOVIĆ N, ĆEBOVIĆ T., VUKMIROVIĆ S, MIKOV M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. **BMNC Complement Altern Med**. v.14, p.225, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4227022/>> Acesso em: fev. 2019.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRIND, W.; TAFURI, W. L.; CORREIA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19054576/>> Acesso em: mar. 2019.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using a immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v.10, n.7, p-2352-2356, 2002; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120577/>> Acesso em: mar. 2019.

REMOR, Adriano Rodrigues; BOTELHO, Thais Kamille Sarmiento. A guarda compartilhada de animais domésticos: um estudo acerca da ressignificação do animal no núcleo familiar pelo Superior Tribunal de Justiça. **Revista Multidisciplinar Pey Këyo Científico**. v. 6, n. 2, p. 1-24, 2020. Disponível em: <<http://periodicos.estacio.br/index.php/pkcroraima/article/viewArticle/8197>> Acesso em: abr. 2019.

RENAME - **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 210 p. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_renome_2017.pdf> Acesso em: mar. 2019.

RIBEIRO, V.M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n.71, p.66-76, 2007 Disponível em: <<https://issuu.com/clinicavet/docs/clinica-veterinaria-n71>> Acesso em: jun. 2019.

RIBOLDI, E.; CARVALHO, F.; ROMÃO, P. R. T.; BARCELLOS, R. B.; BELLO, G. L.; RAMOS, R. R.; OLIVEIRA, R.T.; JÚNIOR, J. P. A.; ROSSETTI, M. L.; DALLEGRAVE, E. Molecular method confirms canine *Leishmania* infection detected by serological methods in non-endemic area of Brazil. **Korean J Parasitol** v. 56, n. 1, p. 11, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5858662/>> Acesso em: set. 2013.

Risco à saúde humana permite sacrifício de 12 cães com leishmaniose visceral. **Revista Consultor Jurídico**, 17 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.conjur.com.br/2017-dez-17/risco-saude-humana-permite-sacrificio-12-caes-leishmaniose>> Acesso em: 20 mai. 2019.

RODRIGUES, A.; SIMONI C.D.; MACHADO, G.N; As plantas medicinais e terapia no contexto da atenção básica/estratégia saúde da família. In: Cadernos de Atenção Básica - **Práticas Integrativas e Complementares**. Brasília: Distrito Federal, 2012. Cap. 2, p.27-34.

RODRIGUES, I.M.A; CUNHA, G. N.; LUIZ, D. P. Princípios da guarda responsável:

Perfil do conhecimento de tutores de cães e gatos no município de Patos de Minas–MG. **Ars Veterinaria**, v. 33, n. 2, p. 64-70, 2018. Disponível em: <<http://arsveterinaria.org.br/ars/article/view/1082/1099>> Acesso em: jan. 2019.

RODRIGUES, N. L. C. **Bioprospecção e seleção de ativos de Amburana cearensis com efeito leishmanicida (*Leishmania braziliensis*) por imunomodulação**. 2020. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/56082/1/2020_tese_nlcrodrigues.pdf> Acesso em: set. 2019.

ROSYPAL, A.C.; ZAJAC, A.M.; LINDSAY, D.S.; Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. v.33, n.4, p. 921-938. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12910750/>> Acesso em: ago. 2019.

SALES, G.B.; ALENCAR, J.B.; SANTOS, R.O.; SOUSA, A.P.; FILHO, A.A.O.; Origanum majorana como agente ansiolítico em Odontologia: uma revisão literária. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, 2020. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwie_67B2KL6AhXoppUCHa6gC68QFnoECAMQAQ&url=https%3A%2F%2Frsdjournal.org%2Findex.php%2Frsd%2Farticle%2Fdownload%2F3186%2F4782%2F26471&usq=AOvVaw0dnEQE6QeU4Doka7pwuTDQ> Acesso em: fev. 2019.

SALOMÓN, O. D.; BASMAJDIAN, Y.; FERNÁNDEZ, M. S.; SANTINI, M. S. Lutzomyia longipalpis in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 106, n. 3, p. 381-382, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21655832/>> Acesso em: jun. 2019.

SALOMON, O. D.; SINAGRA, A.; NEVOT, M. C.; BARBERIAN, G.; PAULIN, P.; ESTEVEZ, J. O.; RIARTE, A.; ESTEVEZ, J. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 103, n. 1, p. 109-111, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/mioc/a/hSWH4mzhQwKtzCNkNNytvmC/?lang=en>> Acesso em: jul. 2019.

SALOMÓN, Oscar Daniel et al. Lutzomyia longipalpis in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 381-382, 2011. Disponível em: <https://www.medicinabuenosaires.com/demo/revistas/vol61-01/2/v61_n2_p174_178.pdf> Acesso em: jan. 2019.

SANTIAGO, G. M. P.; VIANA, F.A.; PESSOA, O.D.L.; SANTOS, R.P.; POULIQUEN, Y.B.N.; ARRIAGA, A.M.C.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de Pentaclethra macroloba (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e Cordia piahuensis Fresen (Boraginaceae) sobre Aedes aegypti. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 187-190, 2005. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/CF5fNsxnBGYvrzrWc9YqHgP/?lang=pt>> Acesso em: jun. 2019.

SANTOS-GOMES, Gabriela M.; CAMPINO, Lenea.; ABRANCHES, Pedro. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95: 193-198. 2000. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/mioc/a/9fyp8sfWMzpWCvkL59TbXvj/abstract/?lang=en>> Acesso em: set. 2019.

SANTOS, Paula et al. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/137597>> Acesso em: set. 2019.

SAVANI, E.S.M.M.; SCHIMONSKY, B.V.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'ÁURIA, S.R.N. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Rev Saude Publica**. v.32, n.2, p-260-262. 2003. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsp/a/6VRtjybH7VDJQRfdpnWRSyp/?lang=pt&format=pdf>> Acesso em: set. 2019.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGONE, 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. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11836028/>> Acesso em: set. 2019.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ. Superintendência de Vigilância em saúde. Vigilância Epidemiológica da Leishmaniose Visceral Humana no Paraná. **Alerta epidemiológico N° 01/2018** - DVDTV/CEVA/SVS. Disponível em: <https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-04/alerta_epidemiologico_9_rs_1.pdf> Acesso em: ago. 2019.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral Humana no Rio Grande do Sul. **Alerta epidemiológico N° 01/2009** – SES/CEVS. Disponível em: <<https://www.cevs.rs.gov.br/lvh-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em: ago. 2019.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral Humana no Rio Grande do Sul. **Nota Informativa N° 01/2017** – SES/CEVS. Disponível em: <<https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201712/08165117-nota-informativa-lvh-30-12-2017.pdf>> Acesso em: set. 2019.

SILVA, Gabriel Oliveira; FORTES, Renata Costa; RINCON, GETÚLIO. Avaliação da eficácia das ações preventivas adotadas pela Gevaz – Brasília-DF, visando o controle da transmissão da leishmaniose visceral canina. **Journal of the Health Sciences Institute**, n. 240, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/295010721_Avaliacao_da_eficacia_das_acoes_preventivas_adotadas_pela_Gevaz_-_Brasilia-DF_visando_o_controle_da_transmissao_da_leishmaniose_visceral_canina>

Acesso em: jul. 2019.

SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F.; TEIXEIRA, A.C; SOUZA, C.M.; FIGUEIREDO, F.B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**. v. 179, n. 1-3, p. 257-261, 2011. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34803?locale=pt_BR> Acesso em: set. 2019.

SILVA, F. T.; SILVA, G. O.; AZEVEDO, G. H. M.; DE SÁ, C. B. N.; COUTINHO, O. M. V. C.; ARRAIS, B. M.; MACHADO, R. A.; SILVA, R. S. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral no Estado do Tocantins no Período de 2007 a 2017. **Revista de Patologia do Tocantins**. v. 6, n. 2, p. 5-9, 2019. Disponível em: <<https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/patologia/article/view/6672/15229>> Acesso em jul. 2019.

SILVA, Francinaldo S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20, 2007. Disponível em: <<https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/patologia/article/view/6672/15229>> Acesso em: ago. 2019.

SILVA, M.S.A.; SILVA, M.A.R.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, M.S.V.; CARVALHO, A.A.T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.236-240, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/bXkB9yX8gRXF5HwL4R6R7dH/abstract/?lang=pt>> Acesso em: ago. 2019.

SOARES, M.R.A.; MENDONÇA, I.V.; BONFIM, J.M.; RODRIGUES, J.A.; WERNECK, G.L.; COSTA, C.H.N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Trop.** v.117, n.1, p.6-9, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X10002263>> Acesso em: set. 2019.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BORDEAU, G.O.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19559536/>> Acesso em: set. 2019.

SOUZA-GOMES, Marcia Leite de; MAIA-ELKHOURY, Ana Nilce Silveira; PELISSARI, Daniele Maria; JUNIOR, Francisco Edilson Ferreira de Lima; SENA, Joana Martins de; CECHINEL, Michella Paula. Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 519-526, 2011. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742011000400011> Acesso em: ago. 2019.

SOUZA, A. P. L. DE; JESUS, J. R. DE; TEIXEIRA, M. C. Estudo retrospectivo da

epidemiologia da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul: revisão de literatura. **Veterinária em Foco** v. 11, n. 2, p. 112-118, 2014. Disponível em: <<http://www.periodicos.ulbra.br/index.php/veterinaria/article/view/1291/1415>> Acesso em: jul. 2019.

SOUZA, B.M.P.S.; REBOUÇAS, M.F.; OLIVEIRA, L.S.; FREITAS, D.; JULIÃO, F.S.; ALCÂNTARA, A.C.; PAULE, B.J.A.; MELO, S.M.B.; FRANKE, C.R. Comparação entre diferentes preparados proteicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.5, n.1, p-31-40,2004. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/handle/ri/1880>> Acesso em: jun. 2019.

SOUZA, G. D. Estudo dos Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área com Leishmaniose Visceral Humana, no Bairro Morro Santana - Porto Alegre- RS. **Boletim Epidemiológico** v. 65, n. 1, p. 5-7, 2017. Disponível em: <http://proweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimespecial_leish_65.pdf> Acesso em: jun. 2019.

SOUZA, G. D.; FLÔRES, C. F.; BELLO, M. I. M. R. Estudo da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do bairro Belém Velho - Porto Alegre - RS. **Boletim Epidemiológico** v. 56 p. 5, 2015. Disponível em: <http://proweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-sms-pmpa-56.pdf> Acesso em: mai. 2019.

SOUZA, G. D.; GONÇALVES, B. R. D.; FLORES, C.F.; RANGEL, S.; SANTOS, E.; VILELA, M.; AZEVEDO, A.; RANGEL, E. F. monitoramento entomológico dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do município de Porto Alegre, RS. **Boletim Epidemiológico** v. 39, p. 5-6, 2008. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284099756_Monitoramento_entomologico_dos_flebotomineos_Diptera_Psychodidae_do_municipio_de_Porto_Alegre_RS_Boletim_epidemiologico> Acesso em: mai. 2019.

STEINDEL, M., MENIN, A.; EVANGELISTA, T.;STOCO, P.H.; MARLOW, M.; FLEITH, R.C.; PILATI, C.; GRISARD, E.C. Outbreak of autochthous canine visceral leishmaniosis in santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34,n. 4, 2013. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/Jg8grVqpbwwVyPDVwHZ9BWL/abstract/?lang=em>> Acesso em: mai. 2019.

STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2028-5>> Acesso em: mai. 2019.

TEIXEIRA, Mariana Caetano. **Soroepidemiologia de *Leishmania (L.) chagasi* em cães no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul**. 2014. 72f. Tese (Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/118512/000969113.pdf?sequenc e=1&isAllowed=y>> Acesso em: fev. 2019.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A.; NAVARRO, I.T.; FARIAS, DE SOUZA, L.M.; CARVALHO, Y.; BISPO, S.; MEMBRIVE, N.A.; MINOZZO, J.C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E.. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 46-51, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpv/a/9CSdvLx3RSFBNhgcDnkcBJC/abstract/?lang=p>> Acesso em: abr. 2019.

THOMAZ-SOCCOL, V.; GONÇALVES, A. L.; PIECHNIK, C. A.; BAGGIO, R. A.; BOEGER, W. A.; BUCHMAN, T. L.; MICHALISZYN, M. S.; DOS SANTOS, D. R.; CELESTINO, A.; AQUINO, J. R. J.; LEANDRO, A. S.; DA PAZ, O. L. S.; LIMONT M.; BISETTO, J. R. A.; SHAW, J. J.; YADON, Z. E.; SALOMON, O. D.; Hidden danger: Unexpected scenario in the vector-parasite dynamics of leishmaniasis in the Brazil side of triple border (Argentina, Brazil and Paraguay). **PLoS Negl Trop Dis**. v. 12, n. 4, 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006336>> Acesso em: mai. 2019.

TRENCH, F. J. P.; RITT, A. G.; GEWEHR, T. A.; LEANDRO, A. S.; CHIYO, L.; GEWEHR, M. R.; RIPOLI, M.; BISETTO, A.; POZZOLO, E. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. First Report of Autochthonous Visceral Leishmaniasis in Humans in Foz Do Iguaçu, Paraná State, Southern Brazil. **Ann Clin Cytol Pathol** v. 2, n. 6, p. 1041, 2016. Disponível em: <<https://www.jscimedcentral.com/ClinicalCytology/clinicalcytology-2-1041.pdf>> Acesso em: jun. 2019.

VASCONCELOS, Tassia Cristina Bello de et al. Leishmaniose visceral canina: caso alóctone no município de Resende, estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 80-83, 2013. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/36163>> Acesso em: mai. 2019.

VOSGERAU, D. S. A. R. & ROMANOWSKI, J. P. (2014). Estudos de revisão: implicações conceituais e metodológicas. **Revista de Diálogo Educacional**, (14)41, 165 -189, 2014. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/1891/189130424009.pdf>> Acesso em: ago. 2019.

WALLER, S.B.; CLEFF, M.B.; SERRA, E.F.; SILVA, A.L.; GOMES, A.R.; DE MELLO, J.R.B.; DE FARIA, R.O.; MEIRELES, M.C.A. 2017. Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 232-237, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28131955/>> Acesso em: mar. 2019.

WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; FARIA, R. O. D.; CLEFF, M. B.; MELLO, J. R. B. D.; MEIRELES, M. C. A. Anti-Sporothrix spp. activity of medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.52,n.2,p. 221 237.2016. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjps/a/SrC4Y58P9xjs6ftdhCLDRwh/?lang=en&format=pdf>> Acesso em: fev. 2019.

WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; CLEFF, M.B.; SANTIN, R.; FREIAG, R.A.;

MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Effects of essential oils of *Rosmarinus officinalis* Linn. and *Origanum vulgare* Linn. from different origins on *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* complex. **Arq Bras Med Vet Zootec**. v.68, n. p.991–999. 2016. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/f3Vm99W3C8x6MQ65WmywMmm/abstract/?lang=en>> Acesso em: mar. 2019.

WALLER, George R. *Plant Biochemistry: Secondary Plant Products*. EA Bell and BV Charlwood, Eds. Springer-Verlag, New York, 1980. 676 p. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 8. **Science**, v. 209, n. 4461, p. 1113-1113, 1980.

Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.209.4461.1113.a>> Acesso em: jul. 2019.

WHO. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023. **World Health Organization** (WHO), p. 76, 2013. Disponível em:

<<https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096>> Acesso em: jan. 2019.

ZANETTE, M.F.; LIMA, V.M.F.L.; LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; VIDES, J.P.; VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmaniainfantum chagasi* tests in dogs. . **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/nB3v98JydFwjgHJ4gpPH69F/?lang=en>> Acesso em abr. 2019.

ZANETTE, Maurício Franco. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2006. 70 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Araçatuba, 2006.

Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/92183>> Acesso em: abr. 2019.

ZUBEN, A.P.B.V.; DONALISIO, M.R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v.32, n.6, p.1-11, 2016. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/csp/a/PLxTwhghysWd8JyCYrrnmnTM/?lang=pt&format=html>> Acesso em: fev. 2019.

Anexos

Anexo I – Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

21/09/2022 13:59

SEI/UFPel - 0790630 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
148/2019/CEEA/REITORIA
23110.034722/2019-34

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Inquérito Soroepidemiológico da presença de *Leishmania infantum* em cães e potencial anti-leishmania de extratos vegetais.**”, registrada com o nº 23110.034722/2019-34, sob a responsabilidade de **Marlete Brum Cleff** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **13 de novembro de 2019**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	20/11/2019
Espécie/linhagem/raça	Canina
Nº de animais	400
Idade	Variável
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Animais atendidos na rotina clínica do HCV e do Ambulatório Ceval, e provenientes de Convênios como Ecosul e do canil municipal de Pelotas que são encaminhados ao HCV - UFPel

Código para cadastro nº CEEA 34722-2019

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 20/11/2019, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0790630** e o código CRC **35CC6A75**.