

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LUCAS VINÍCIUS DE SOUZA AZEVEDO

**OCORRÊNCIA DE HELMINTOS INTESTINAIS EM CÃES SOROPOSITIVOS PA-
RA *Leishmania (Leishmania) infantum*: ASSOCIAÇÃO COM SINAIS CLÍNICOS, AL-
TERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS**

Rio de Janeiro

2020

Azevedo, Lucas Vinícius de Souza.

Ocorrência de helmintos intestinais em cães soropositivos para *Leishmania (leishmania) infantum*: associação com sinais clínicos, alterações hematológicas e histológicas / Lucas Vinícius de Souza Azevedo, Rodrigo Caldas Menezes - Rio de Janeiro, 2020.

96f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2020.

Orientador: Rodrigo Caldas Menezes.

Bibliografia: f. 82-95

1. Leishmaniose Visceral. 2. Helmintos intestinais. 3. Coinfecção. 4. Cães. 5. Zoonose. I. Menezes, Rodrigo Caldas . II. Título.

LUCAS VINÍCIUS DE SOUZA AZEVEDO

OCORRÊNCIA DE HELMINTOS INTESTINAIS EM CÃES SOROPOSITIVOS PARA *Leishmania (Leishmania) infantum*: ASSOCIAÇÃO COM SINAIS CLÍNICOS, ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Rio de Janeiro

2020

LUCAS VINÍCIUS DE SOUZA AZEVEDO

OCORRÊNCIA DE HELMINTOS INTESTINAIS EM CÃES SOROPOSITIVOS PARA *Leishmania (Leishmania) infantum*: ASSOCIAÇÃO COM SINAIS CLÍNICOS, ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Fernanda Nazaré Morgado

Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas (Presidente)

IOC/Fiocruz

Dr.^a Beatriz Brener de Figueiredo

Doutora em Biologia Parasitária

UFF

Dr.^a Fernanda Nunes Santos

Doutora em Saúde Pública

INI/Fiocruz

Dr.^a Viviane Cardoso Boechat

Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

INI/Fiocruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus de onde vem toda minha força, meu refúgio e fortaleza.

A meu orientador, Dr. Rodrigo Caldas Menezes do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), pela paciência ao me ensinar, tempo investido, dedicação e competência. Sou muito grato pelo aprendizado e crescimento agregados.

A toda equipe do Lapclin-Dermzoo, Shanna Araújo dos Santos pelo apoio junto ao processamento histológico das amostras, Artur Augusto Velho Mendes Junior pelos ensinamentos e acompanhamento junto as necropsias, Valéria da Costa Oliveira pelo auxílio na parte hematológica do trabalho bem como pela paz e conhecimentos transmitidos, Renato Orsini e Adilson Benedito pelo auxílio com os materiais usados nas necropsias ,por cada risada e momentos de descontração, Lucas Keidel pelo auxílio e ensinamentos, principalmente na parte dos helmintos. Obrigado a toda equipe pelo apoio, companheirismo, gargalhadas, xícaras de café, ensinamentos, orientações e prontidão a ajudar sempre que foi necessário, meu mais sincero agradecimento.

Ao Luiz Cláudio Ferreira do Serviço de Anatomia Patológica do INI pela confecção das lâminas de imuno-histoquímica. Aos estatísticos Wagner S. Tassinari e Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira do Laboratório de Epidemiologia Clínica, INI, pelo apoio, paciência e orientação quanto aos cálculos estatísticos.

Ao Marcelo Knoff e toda sua equipe do Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados do Instituto Oswaldo Cruz, pelo apoio e orientação com material para o identificação dos helmintos. A secretaria Municipal de Barra Mansa pelo traslado dos animais infectados ao Lapclin-Dermzoo.

Aos meus amigos que fiz dentro do Instituto, que contribuíram de forma educativa, emocional e profissional. Obrigado, Amanda Souza por me apoiar, por dividir as suas horas de estudo, interromper seu trabalho para poder compartilhar conhecimentos e histórias, ao Yago Cortes e a Bruna Guedes pelo companheirismo, amizade e paz transmita.

À minha família pelo carinho, apoio, dedicação e por confiarem em mim e em meu esforço. Sou muito grato a vocês, até aqui tem nos ajudado o senhor. Saibam que são a minha fonte de inspiração e admiração.

Agradeço ao Fernando Souza, Renato Amaral, Chrystian Amaral e Leia Couto, por serem pilares fortes que ajudam a erguer minhas emoções, pensamentos e sonhos, obrigado pelas broncas, conselhos, abraços, por estarem em meus momentos difíceis e felizes, por me ouvirem e aconselhar. Vocês são demais e eu os amo muito. Desculpe pela ausência nos últimos dias.

Não podia deixar de agradecer aos meus “cãopanheiros” Apolo e Amora, obrigado por cada latido, lambida, mordiscada, e olhares de agradecimento e carinho, vocês são parte fundamental deste sonho e sempre buscarei ser um profissional melhor por vocês e por todos os seus amiguinhos de 4 patas.

À Coordenação de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas INI, Fiocruz, por possibilitar esse sonho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro pelo auxílio financeiro.

“Um líquido é um estado da matéria sem formato específico. Muda facilmente e se molda ao recipiente que o contém. O corpo humano é 70% água”. (Vis a Vis).

AZEVEDO, L.V.S. **Ocorrência de helmintos intestinais em cães soropositivos para *Leishmania (Leishmania) infantum*: associação com sinais clínicos, alterações hematológicas e histológicas**. 96f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2020.

RESUMO

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ), possui ampla distribuição mundial e os cães infectados são considerados reservatórios de infecção. A associação de helmintos intestinais com formas mais graves da LVZ em cães é pouco conhecida. Portanto, os objetivos desse estudo foram avaliar a ocorrência de helmintos intestinais em cães sorologicamente positivos para *Leishmania (Leishmania) infantum* e comparar os sinais clínicos, alterações hematológicas e histológicas dos cães coinfectados por helmintos intestinais com a dos mono infectados por *L. (L.) infantum*. Foi estudada uma amostra de conveniência de 41 cães soropositivos para *L. (L.) infantum*. Foram feitos exames clínicos, hematológicos, eutanásia e necropsia destes cães. Na necropsia, o conteúdo dos intestinos (grosso e delgado) foi examinado. Os helmintos foram fixados, contados e identificados. Amostras de fezes foram coletadas para exames coproparasitológicos. Fragmentos de jejuno e ceco foram coletados para realização das técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ). Foi observada frequência de positividade de 53,6% de helmintos. No grupo dos cães coinfectados por helmintos a frequência de helmintoses foi de 63,3%, 59,1%, 36,4% e 13,6% para as espécies *Ancylostoma* spp., *Dipylidium caninum*, *Trichuris vulpis* e *Toxocara canis*, respectivamente. No grupo mono infectado, as frequências de cães com muitos sinais clínicos, poucos sinais clínicos e sem sinais clínicos foram, respectivamente, 52,6%, 36,8% e 10,5%. No grupo coinfectado, as frequências de cães com muitos sinais clínicos, poucos sinais clínicos e sem sinais clínicos foram, respectivamente, 77,2%, 18,1% e 4,5%. Nos cães coinfectados, a anemia normocítica normocrômica foi observada em 63,3%, linfopenia em 41,0%, leucopenia e monocitose em 18,2%. Nos cães mono infectados, as alterações foram anemia normocítica normocrômica (53,0%), linfopenia (47,3%) e neutrofilia (15,3%). A frequência de inflamação intestinal no grupo dos coinfectados foi de 69% e no grupo dos mono infectados foi de 31% (p valor= 0,002). No grupo dos cães mono infectados, a frequência de detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. na IHQ foi de 52,6% e no grupo dos cães coinfectados foi de 63,6%. A maior frequência de sinais clínicos, anemia e alterações histológicas nos cães coinfectados sugerem que a coinfecção por helmintos intestinais contribui para o agravamento da LVZ em cães, havendo um potencial risco de transmissão zoonótica dessa infecção e de algumas helmintoses.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral. *Leishmania (Leishmania) infantum*. Cães. Helmintos intestinais. Coinfecção. Zoonose.

AZEVEDO, L.V.S. **Occurrence of intestinal helminths in dogs seropositive for *Leishmania (Leishmania) infantum*: association with clinical signs, hematological and histological changes.** 96f. Dissertation [Master in Clinical Research in Infectious Diseases] - Oswaldo Cruz Foundation, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Rio de Janeiro, 2020.

ABSTRACT

Zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) has a wide worldwide distribution and infected dogs are considered reservoirs of infection. The association of intestinal helminths with more severe forms of LVZ in dogs is little known. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the occurrence of intestinal helminths in dogs serologically positive for *Leishmania (L.) infantum* and to compare the clinical signs, hematological and histological changes of dogs coinfecting by intestinal helminths with those of monoinfected by *L. (L.) infantum*. A convenience sample of 41 dogs seropositive for *L. (L.) Infantum* was studied. Clinical, hematological, euthanasia and necropsy examinations were performed on these dogs. In necropsy, the contents of the intestines (large and small) were examined. Helminths were fixed, counted and identified. Stool samples were collected for coproparasitological examinations. Fragments of jejunum and cecum were collected and for the performance of histopathology and immunohistochemistry (IHC) techniques. A positive frequency of 53.6% of helminths was observed in dogs. In the group of dogs coinfecting by helminths, the frequency of helminths was 63.3%, 59.1%, 36.4% and 13.6% for the species *Ancylostoma* sp., *Dipylidium caninum*, *Trichuris vulpis* and *Toxocara canis*, respectively. In the monoinfected group, the frequencies of dogs with many clinical signs, few clinical signs and no clinical signs were 52.6%, 36.8% and 10.5%, respectively. In the co-infected group, the frequencies of dogs with many clinical signs, few clinical signs and no clinical signs were 77.2%, 18.1% and 4.5%, respectively. In coinfecting dogs, normochromic normocytic anemia was observed in 63.3%, lymphopenia in 41%, leukopenia and monocytosis in 18.2%. In monoinfected dogs, the changes were normochromic normocytic anemia (53%), lymphopenia (47.3%) and neutrophilia (15.3%). The frequency of positivity of intestinal inflammation in the coinfecting group was 69%, whereas in the monoinfected group it was 31% (p value = 0.002). In the group of monoinfected dogs the frequency of positivity in IHC was 52.6%, while in the group of coinfecting dogs it was 63.6%. The higher frequency of clinical signs, anemia and histological changes in coinfecting dogs suggest that coinfection by internal helminths contributes to the worsening of ZVL in dogs, with a potential risk of zoonotic transmission of this infection and some helminths.

Keywords: Visceral leishmaniasis. *Leishmania (Leishmania) infantum*. Dogs. Intestinal helminths. Coinfection. Zoonosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Formas promastigotas de *Leishmania* spp. obtidas de meio de cultura Neal, Novy, Nicolle (NNN) e coradas pelo panóptico rápido. Objetiva de 100x.....19
- Figura 2.** Imprint de baço de cão sorologicamente positivo para anticorpos anti- *L. infantum*. Formas amastigotas de *Leishmanias* spp. (setas) no citoplasma de macrófago coradas pelo panóptico rápido. Objetiva de 100x.....19
- Figura 3.** Fêmea de flebotomíneo.....20
- Figura 4.** Ciclo Biológico da *Leishmania* spp.....21
- Figura 5.** Distribuição de casos confirmados de leishmaniose visceral zoonótica em humanos e cães no estado do Rio de Janeiro, 2007 a 2012.....24
- Figura 6.** Sinais clínicos na leishmaniose visceral zoonótica. (A) Descamação furfurácea e hiperqueratose; (B) Onicogrifose e úlceras cutâneas; (C) Esplenomegalia; (D) Caquexia e alopecia generalizada; (E) Lesão ulcerativa na face; (F) Ceratoconjuntivite.....25
- Figura 7.** Características morfológicas do nematoide *Ancylostoma* spp. *Ancylostoma* spp. (A) exemplar macho, presença de bolsa copulatória (seta preta) e fêmea (seta vermelha), aumento de 4x em lupa estereoscópica; (B). Cápsula bucal evidenciando 3 pares de dentes (seta), *A. caninum*, objetiva de 10x em microscópio óptico;(C) Cápsula bucal evidenciando 1 par de dentes (seta), *A. brasiliense*, objetiva de 10x em microscópio óptico (D) Ovos (setas) em objetiva de 10x em microscópio óptico.....30
- Figura 8.** Características morfológicas do nematoide *Toxocara canis*. *Toxocara canis*. (A) exemplares machos e fêmeas pós necropsia, (B) extremidade anterior do parasito com asas cervicais (seta), objetiva de 5x em microscópio óptico;(C) Ovos em objetiva de 10x em microscópio óptico.....33
- Figura 9.** Características morfológicas do cestóide *Dipylidium caninum* . *Dipylidium caninum*. (A) Escólex do parasito (seta), objetiva de 5x em microscópio óptico; (B) Proglotes, objetiva de 10x em lupa estereoscópica;(C) Cápsula ovígera contendo diversos ovos com embrião hexacanto, objetiva de 10x em microscópio óptico.....36
- Figura 10.** Características morfológicas do nematoide *Trichuris* sp. (A) Fêmea de *Trichuris* sp., extremidade posterior ligeiramente curvada (seta branca) e extremidade anterior (seta preta), objetiva de 10x em lupa estereoscópica; (B) Ceco de cão parasitado por *Trichuris* sp.

(C) Ovos biopericulados (setas) em útero de fêmea de <i>Trichuris</i> sp., objetiva de 10x em microscópio óptico.....	38
Figura 11. Distribuição das raças em cães soropositivos para <i>L. infantum</i> , fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....	53
Figura 12. Achados de necropsia em intestino de cães soropositivos para <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> . <i>Dipylidium caninum</i> . (A), <i>Toxocara canis</i> (B), <i>Ancylostoma</i> sp (C) e <i>Trichuris</i>	38
Figura 13. Cápsula bucal de <i>Ancylostoma</i> spp. de espécimens desse nematoide encontrados em cães soropositivos para <i>L. (L.) infantum</i> . . (A) Cápsula bucal de <i>Ancylostoma caninum</i> , apresentando 3 pares de dentes (setas pretas). (B) Cápsula bucal de <i>Ancylostoma brasiliense</i> , apresentando 1 par de dentes (seta preta). Objetiva de 40 x.	56
Figura 14. Características morfológicas de espécimens do nematoide <i>Toxocara canis</i> encontrados em cães soropositivos para <i>L. (L.) infantum</i> . (A) Região anterior evidenciando bulbo esofágico (seta preta); (B) Região posterior de <i>T. canis</i> evidenciando espiculo (linhas pretas). Objetiva de 4x.....	57
Figura 15. Características morfológicas de espécimens do cestóide <i>Dipylidium caninum</i> encontrados em cães soropositivos para <i>L. (L.) infantum</i> . (A) Escólex apresentando ventosas (seta preta) e rostelo evaginado com ganchos (seta amarela) Microscópio óptico na objetiva de 10x. (B) Proglote madura (seta preta) evidenciando poro genital (seta vermelha), ovários (seta azul), cirro (seta verde) e testículos (setas amarelas). Microscópio óptico na objetiva de 10x. (C) Proglote gravídico com capsulas ovíferas em seu interior. Microscópio estereoscópico na objetiva de 10x.....	57
Figura 16. Características morfológicas de espécimens dos nematoide <i>Trichuris vulpis</i> encontrados em cães soropositivos para <i>L. (L.) infantum</i> . (A) Região posterior do macho apresentando espiculo exposto de 10 mm (seta preta). (B) Região posterior da fêmea revelando ovos no interior do trato reprodutivo. Objetiva de 5x.....	58
Figura 17. Gráfico em boxplot da relação carga parasitaria e idade dos cães coinfectados, entre fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....	58
Figura 18. Frequência de positividade dos exames parasitológicos em cães infectados por <i>L. (L.) infantum</i> , fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....	59
Figura 19. Dispersão entre as cargas parasitarias e o OPG dos cães coinfectados por <i>L.(L.) infantum</i> e helmintos , fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....	60
Figura 20. Alterações histológicas em jejuno e ceco de cães naturalmente monoinfectados por <i>L. (L.) infantum</i> . (A) Inflamação não granulomatosa (círculo vermelho) em mucosa de jejuno	

de cão naturalmente monoinfectado por *L. (L.) infantum*. Objetiva de 10x. HE. (B) Hiperplasia glandular em mucosa de jejuno (círculo vermelho). Objetiva de 5x. HE (C) Inflamação não granulomatosa em mucosa cecal com áreas de edema (círculo vermelho) e fibrose. Objetiva de 10X. HE. (D) Fibrose (círculo vermelho) e atrofia glandular em mucosa de cecal. Objetiva de 40x.HE.....64

Figura 21. Alterações histológicas em jejuno e ceco de cães coinfectados por *L. (L.) infantum* e helmintos. (A) *Dipylidium caninum* (seta) em luz intestinal de jejuno. (B) *Toxocara canis* em luz intestinal de jejuno, mucosa intestinal apresentando achatamento de vilosidade (seta preta). Objetiva de 4x. HE. (C) *Trichuris vulpis* (seta) inserido superficialmente na mucosa. Objetiva de 10x. HE.(D) Diversos espécimens de *T. vulpis* (setas) inseridos em mucosa cecal, que se encontrava hiperplásia. Objetiva de 10x. HE.....65

Figura 22. Corte histológico de ceco mostrando formas amastigotas de *Leishmania* sp. coradas em castanho no interior de macrófagos (setas) da lâmina própria da mucosa, em área adjacente à muscular da mucosa, evidenciado pela técnica de IHQ. Objetiva de 100x.....66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sinais clínicos de leishmaniose visceral zoonótica em cães soropositivos para *L. (L.) infantum*, coinfectados ou não por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....54
- Tabela 2.** Frequência das diferentes espécies de helmintos nos cães coinfectados por helmintos e *L. (L.) infantum*. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....55
- Tabela 3.** Carga parasitaria média, prevalência, intensidade média de infecção, abundância média e amplitude de variação de helmintos em cães soropositivos para *L. (L.) infantum*. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....55
- Tabela 4.** Frequência de monoparasitismo helmíntico nos cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....55
- Tabela 5.** Frequência de poliparasitismo helmíntico nos cães soropositivos para *L. (L.) infantum*. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....56
- Tabela 6.** Positividade das técnicas de Fullerborni e Ritchie nas amostras fecais de cães coinfectados por *L. (L.) infantum* e helmintos, fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)59
- Tabela 7.** Alterações no hemograma dos cães soropositivos para *L. (L.) infantum*, mono e coinfectados por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....60
- Tabela 8.** Plaquetometria de cães soropositivos para *L. (L.) infantum*, mono e coinfectados por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....61
- Tabela 9.** Leucograma de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, mono e coinfectados por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....62
- Tabela 10.** Alterações histológicas intestinais de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* coinfectados ou não por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....63

Tabela 11. Estudo imuno-histoquímico do intestino delgado e grosso para detecção de amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. de cães soropositivos para <i>L. (L.) infantum</i> , coinfectados ou não por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....	66
Tabela 12. Alterações histológicas intestinais em cães naturalmente infectados por <i>L. (L.) infantum</i> de acordo com resultados de imuno-histoquímica para <i>Leishmania</i> spp. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....	67
Tabela 13. Frequência de positividade para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. pela técnica de IHQ no jejuno e ceco de cães soropositivos <i>L. (L.) infantum</i> , de acordo com o tipo de parasitismo por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....	68
Tabela 14. Frequência de positividade em linfonodo e medula óssea pela cultura parasitológica em cães soropositivos para <i>L. (L.) infantum</i> , coinfectados ou não por helmintos, no período de fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
A.F.A	Alcool-Formaldeido-Ácido Acético
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Chi ²	Teste Qui-quadrado
Cm	Centímetros
d.f	Grau de liberdade
DAB	Diaminobenzidina
DPP [®]	Imunocromatografia de duplo percurso
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
GDTVZ	Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses
GIT	Trato gastrointestinal
GL	Grau Gay Lussac
HE	Hematoxilia-eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
IFN γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
kg	quilograma
L1-L5	Estágios larvares
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
Lapclin-Dermzoo	Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
Log	Logaritmo decimal
LV	Leishmaniose visceral

LVTa	Leishmaniose visceral de transmissão antroponótica
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVZ	Leishmaniose visceral zoonótica
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
ml	Mililitros
mm	Milímetro
MO	Medula óssea
NNN	Meio de cultura Neal, Novy, Nicolle
OPAS/OMS	Organização Pan-Americana da Saúde
OPG	Ovos por grama de fezes
P.A	Puro para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
SES	Secretaria de Estado da Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SRD	Sem raça definida
TGI	Trato gastrointestinal
Th1	Linfócitos T helper tipo 1
Th2	Linfócitos T helper tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral
um	Micrometro
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Leishmaniose visceral zoonótica	18
1.1.2 Hospedeiro invertebrado	19
1.1.3 Ciclo biológico	20
1.1.4 Epidemiologia	22
1.1.5 Sinais clínicos da LVZ em cães	24
1.1.6 Patogenia	25
1.1.7 Achados histopatológicos intestinais	27
1.2 Principais helmintoses intestinais em cães no Brasil	28
1.2.1 Ancilostomoses	29
1.2.1.1 Morfologia	29
1.2.1.2 Ciclo biológico	30
1.2.1.3 Sinais clínicos	31
1.2.1.4 Achados histopatológicos intestinais	31
1.2.1.5 Epidemiologia	32
1.2.1.6 Larva Migrans Cutânea	32
1.2.2 <i>Toxocaríose</i>	32
1.2.2.1 Morfologia	32
1.2.2.2 Ciclo biológico	33
1.2.2.3 Sinais clínicos	34
1.2.2.4 Achados histopatológicos intestinais	34
1.2.2.4 Epidemiologia	34
1.2.2.5 Síndrome de larva <i>migrans</i> visceral	35
1.2.3 Dipilidíose	36
1.2.3.1 Morfologia	36
1.2.3.2 Ciclo biológico	36
1.2.3.3 Sinais clínicos	37
1.2.3.4 Achados histopatológicos intestinais	37
1.2.3.5 Epidemiologia	37
1.2.4. Tricuríase	38
1.2.4.1 Morfologia	38
1.2.4.2 Ciclo biológico	38

1.2.4.3 Sinais clínicos	39
1.2.4.4 Achados histopatológicos intestinais	39
1.2.4.5 Epidemiologia	39
1.3 Técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de helmintos intestinais em cães	40
1.3.1- Técnica de flutuação (Fullerborn)	40
1.3.2 Técnica de sedimentação (Ritchie modificado)	41
1.3.3 Técnica para contagem de ovos (Gordon & Whitlock)	41
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Amostra	44
4.1.2- Critérios de inclusão e exclusão	44
4.2 Exame clínico e coleta das amostras	44
4.3 Hemograma completo	45
4.4 Exame coproparasitológico	46
4.5 Quantificação, processamento e identificação dos helmintos	47
4.6 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica	48
4.6.1 Histopatologia	49
4.6.2 Avaliação das alterações histológicas em jejuno e ceco	49
4.6.3 Imuno-histoquímica (IHQ) para diagnóstico de <i>Leishmania</i> spp.	49
4.7. Cultura parasitológica para diagnóstico de <i>L. infantum</i>	50
4.8 Análise estatística	50
5 ASPECTOS ÉTICOS	52
6 RESULTADOS	53
6.1. População do estudo	53
6.2 Sinais Clínicos	53

6.3	Quantificação, Processamento e identificação dos helmintos	54
6.5	Hemograma completo	60
6.6	Achados histopatológicos	62
6.7-	Identificação das amastigotas de <i>Leishmania</i> sp.	65
6.8	Cultura parasitológica para diagnóstico de <i>L. infantum</i>	68
7	DISCUSSÃO	70
8	CONCLUSÕES	81
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	82
10	ANEXOS	96

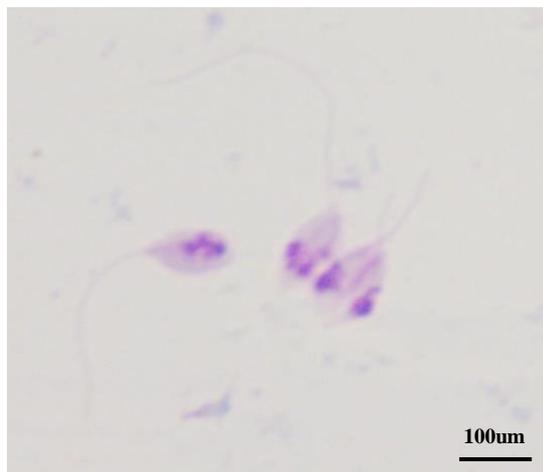
1INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose visceral zoonótica

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é uma doença causada pelo protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Os protozoários do gênero *Leishmania* são caracterizados por serem parasitos heteroxênicos, que possuem como hospedeiro invertebrado insetos flebotomíneos (vetores) e como hospedeiros vertebrados mamíferos e répteis (CUPOLILLO; BOITÉ; PORROZZI, 2014). Esses protozoários apresentam duas formas evolutivas em seu ciclo vital: promastigotas (Figura 1), quando é extracelular e se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados, bem como em meio de cultura e a forma amastigota (Figura 2), quando é parasito intracelular em tecidos de hospedeiros vertebrados (REY, 2008). Este protozoário apresenta tropismo por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos, e a espécie *L. (L.) infantum* pode infectar diversos órgãos, principalmente fígado, baço, linfonodos e medula óssea, causando a LVZ, forma mais grave das leishmanioses (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2004).

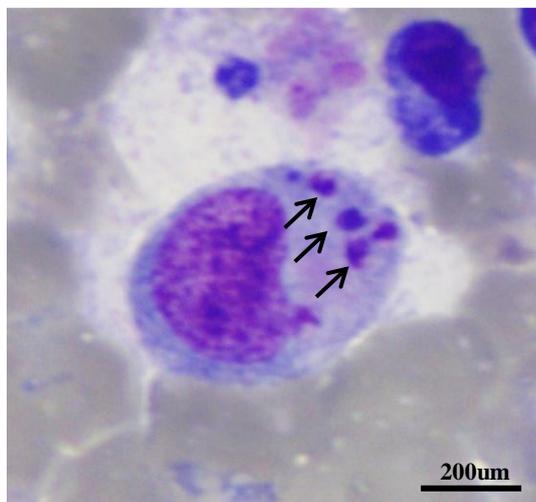
Em humanos, a LVZ apresenta alta incidência e letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças subnutridas com menos de 10 anos de idade, nos quais é comumente fatal se não tratada precocemente. Essa doença também é considerada emergente em indivíduos humanos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (WHO, 2010). Os cães são animais susceptíveis à infecção por *L. (L.) infantum* e, quando ela ocorre, o animal pode desenvolver a doença multissistêmica similar à doença observada em casos humanos. A ocorrência de casos de LVZ no cão é altamente associada a ocorrência de casos de doença humana (ARAÚJO et al. 2013). O segmento dos casos humanos é precedido por casos caninos da doença, sendo os cães importantes mantenedores do ciclo doméstico, mesmo esses cães sendo assintomáticos. A transmissão ocorre enquanto houver o parasitismo na pele ou no sangue periférico dos cães, que vão servir como fonte de infecção para o flebotomíneo vetor (BRASIL, 2014).

Figura 1 - Formas promastigotas de *Leishmania* spp. obtidas de meio de cultura Neal, Novy, Nicolle (NNN) e coradas pelo panótico rápido. Objetiva de 100x.



Fonte: Próprio autor

Figura 2 - Imprint de baço de cão sorologicamente positivo para anticorpos anti- *L. infantum*. Formas amastigotas de *Leishmanias* spp.(setas) no citoplasma de macrófago coradas pelo panótico rápido. Objetiva de 100x



Fonte: Próprio autor

1.1.2 Hospedeiro invertebrado

No Brasil, a leishmaniose visceral tem como vetor duas espécies de flebotomíneo, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. São insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e conhecidos popularmente como “mosquito palha ou birigui”. Segundo Brazil e Gomes (2003), a primeira espécie é considerada de grande importância, pois está amplamente distribuída no país, já a segunda é encontrada nas regiões Nordes-

te, Centro-Oeste e Sudeste. Recentemente, verificou-se a adaptação deste vetor a ambientes urbanos, como periferias de grandes metrópoles, principalmente na região sudeste (BRASIL, 2014).

Esses insetos possuem atividade crepuscular e noturna, adaptam-se facilmente ao ambiente peridomiciliar. São encontrados em regiões domiciliares, abrigos de animais domésticos e locais ricos em matéria orgânica em decomposição (BRASIL, 2014). Ambos os sexos se alimentam, principalmente, de sucos vegetais oriundos de néctar de flores ou de secreções de afídios ricos em carboidrato. Somente as fêmeas dessas espécies são hematófagas (Figura 3), utilizando o sangue apenas para a maturação folicular ovariana (DIAS, 2003).

Figura 3 - Fêmea de flebotomíneo



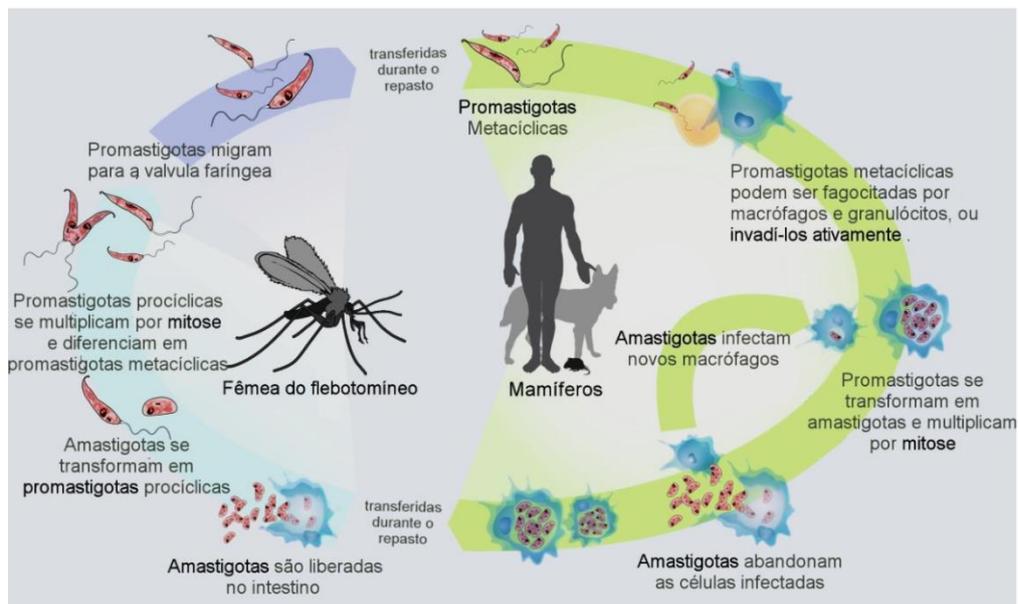
Fonte: BRASIL, 2010

1.1.3 Ciclo biológico

O ciclo biológico da LVZ apresenta duas fases: o ciclo de promastigotas móveis flageladas, presente no vetor invertebrado, e o ciclo amastigota intracelular, presente nas células hospedeiras dos mamíferos (Figura 4). Tanto as formas promastigotas como as amastigotas reproduzem-se por divisão binária simples. As amastigotas podem ser encontradas nos vacúolos digestivos dos macrófagos, que são as principais células atuantes no curso da infecção por *Leishmania*. Com a reprodução por divisão binária, o número de amastigotas cresce dentro do citoplasma da célula hospedeira levando a lise da membrana plasmática. Consequentemente, há a liberação das amastigotas no meio extracelular para serem fagocitadas por outros macrófagos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013).

Quando o flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo no ser humano ou no animal parasitado, o sangue com a linfa intersticial ingeridos levam junto as amastigotas. Essas formas são liberadas no tubo digestivo do vetor e se diferenciam em promastigotas flageladas, que migram posteriormente para a faringe e o esôfago do vetor (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). No tubo digestivo dos flebotomíneos, através do processo de metaciclogênese, o parasito se diferencia em promastigotas metacíclicas, que é sua forma infectante. Ao alcançarem essa fase, as promastigotas não sofrem mais divisões (SERAFIM et al., 2012) e migram para faringe (válvula do estomodeu) dos flebotomíneos. Quando as fêmeas de flebotomíneos infectadas realizam o repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas presentes na faringe são liberadas e penetram na derme do hospedeiro vertebrado. Na derme do vertebrado, as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, onde se diferenciam na forma amastigota intracelular, e o ciclo vital heteróxico se completa, com a propagação dos parasitos para indivíduos novos susceptíveis (REY, 2008).

Figura 4- Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Fonte: HARHAY et al., 2011

Os principais reservatórios silvestres são os canídeos, gambás e roedores. Os cães são considerados como o principal reservatório urbano da LVZ. A importância dos cães como reservatório da infecção se dá por conta dos animais infectados apresentarem frequentemente formas amastigotas na pele, mesmo assintomáticos, sendo importantes fontes de infecção para o flebotomíneo, e de sua proximidade e relacionamento como o ser humano. A

alta prevalência de casos humanos da doença pode estar relacionada a alta prevalência da leishmaniose visceral canina (SOUZA, 2015).

1.1.4 Epidemiologia

A epidemiologia das leishmanioses depende das características das espécies de parasitos, características ecológicas do sítio de transmissão, a exposição atual ou passada de seres humanos aos parasitos e a variabilidade do modo de vida das populações. Elas são designadas doenças emergentes ou reemergentes (WHO, 2016)

A leishmaniose visceral é a forma clínica mais severa das leishmanioses, usualmente fatal se não tratada, pode ser considerada uma zoonose de ampla distribuição mundial, encontrada principalmente em países do Oriente Médio, na Europa (especificamente na bacia do mediterrâneo), Ásia Central e América Latina. Os casos humanos autóctones da leishmaniose visceral localizam-se em sua maioria (90%) em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (WHO,2010). Estima-se que, por ano cerca de 20.000 óbitos ocorram mundialmente por conta desta doença (WHO, 2010). A leishmaniose visceral pode ser de transmissão antroponótica (LVTA), quando ocorre somente entre seres humanos ou zoonótica (LVZ), quando há animais como reservatórios. Na LVTA, a espécie envolvida é a *L. donovani*, que está distribuída geograficamente em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e África Oriental (WHO, 2010). Na LVZ, a espécie envolvida é a *L. infantum* e o cão é o principal reservatório em área urbana. A LVZ ocorre principalmente na América Latina, sul da Europa, Oriente Médio e Ásia Central (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

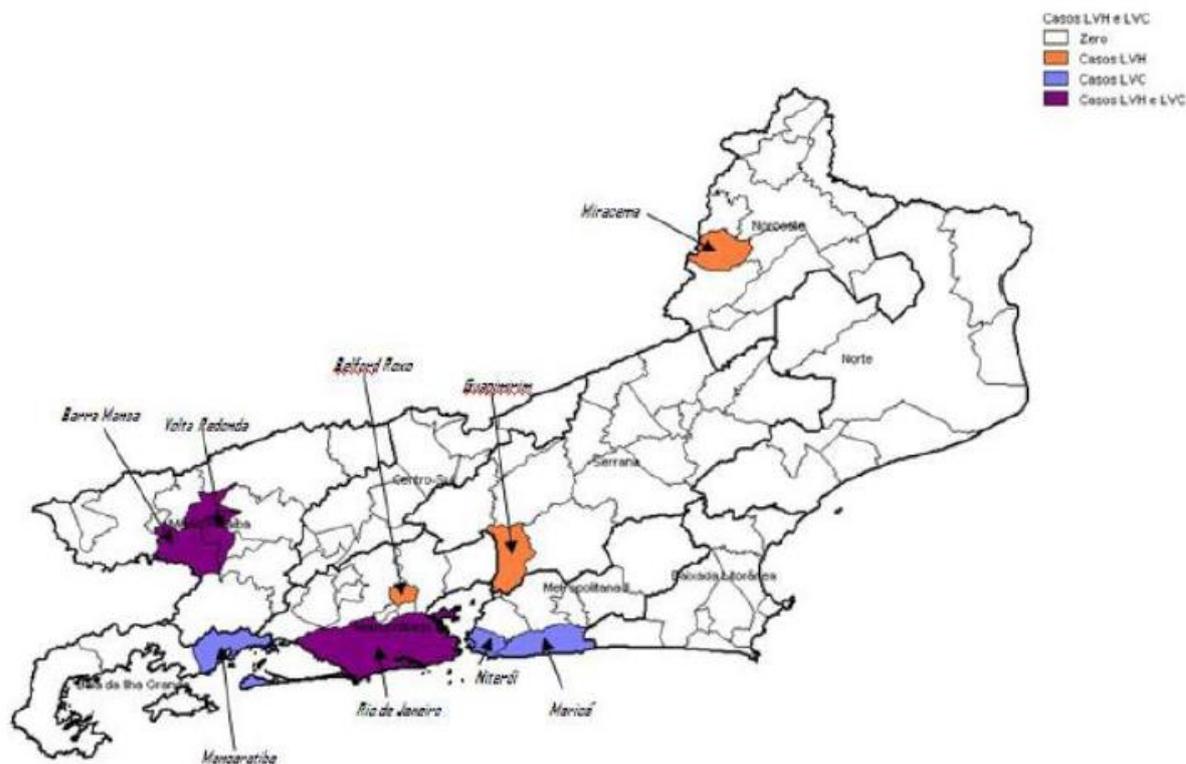
A LVZ é considerada uma das zoonoses mais relevantes das Américas, principalmente devido à magnitude e distribuição geográfica (OPAS/OMS, 2015). A redução das formas graves da doença é alcançada através do diagnóstico precoce, por técnicas laboratoriais imunológicas (RIFI, ELISA e DPP) e parasitológicas (cultura parasitológica e inoculação *in vivo*). O tratamento dos casos humanos é de fundamental importância para redução das formas graves ,tratamento usando como drogas de eleição o antimonial pentavalente e a anfotericina B. É importante também a redução do contato homem-vetor e controle do reservatório canino urbano (BRASIL, 2017).

Na América Latina, a LVZ foi relatada em doze países, sendo 90% dos casos humanos presentes no Brasil, que é considerado o terceiro maior foco da doença em sua forma visceral, do mundo (BRASIL, 2014). A média da letalidade de LVZ, no Brasil, no período de 2000 a 2015 foi de 6,7, sendo que em 2015 a taxa foi de 7,8 (BRASIL, 2016).

Os ciclos das leishmanioses são primariamente silvestres e rurais, mas já há casos notificados que vem aumentando nas grandes cidades devido à adaptação de vetores e reservatórios ao ambiente urbano (SILVA; GONTIJO; MELO, 2005). Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, de 2007 a 2012 foram registrados 1368 óbitos por LV no Brasil, portanto, essa é uma enfermidade de grande importância para saúde pública (BRASIL, 2014). O número de casos notificados da doença na região sudeste do país mostra-se crescente. No ano de 2017 e 2018, foram registrados 7.821 casos com 799 óbitos confirmados (BRASIL, 2019).

A LVZ reemergiu no estado do Rio de Janeiro nos últimos anos, com registro de casos principalmente nas regiões Médio Paraíba e da Baía da Ilha Grande, assim como no município do Rio de Janeiro. A ocorrência de casos humanos antecedeu a detecção de casos caninos, que é evento considerado sentinela para a infecção humana. Entre os anos de 2007 e 2017, 99 casos de leishmaniose visceral humana foram notificados no estado do Rio de Janeiro, sendo 72 dos casos humanos notificados como autóctones ou indeterminados ou inconclusivos e os demais casos importados de outros estados (BRASIL, 2017). Desses casos, 62 foram confirmados. Na figura 5, é possível observar a distribuição dos casos confirmados de LVZ humana e canina no estado do Rio de Janeiro entre os anos de 2007 e 2012. Os casos autóctones confirmados predominaram em municípios como Barra Mansa, Volta Redonda, Paraty e Angra dos Reis, assim como na região metropolitana do estado. Em todos estes municípios, o vetor *Lutzomyia longipalpis* foi detectado, assim como casos caninos diagnosticados (BRASIL, 2017).

Figura 5—Distribuição de casos confirmados de leishmaniose visceral zoonótica em humanos e cães no estado do Rio de Janeiro, 2007 a 2012



Fonte: SINAN-GDTVZ/Vigilância Epidemiológica. SES/RJ.

1.1.5 Sinais clínicos da LVZ em cães

A manifestação clínica da LVZ em cães é determinada por uma combinação de fatores, relacionados ao hospedeiro, ao parasito e ao vetor. A gravidade dos sinais clínicos possui estreita relação com o grau de infecção do hospedeiro e os sinais não são específicos e podem ser observados em outras enfermidades (DANTAS-TORRES et al., 2006). A doença pode evoluir a partir de casos assintomáticos a uma doença sistêmica, que pode levar à morte se não tratada (SANTOS, 2016).

O período de incubação da enfermidade pode variar de três meses a quatro anos, tendo em média um tempo de três a seis meses (BRASIL, 2014). Adicionalmente, alguns dos cães infectados por *L. (L.) infantum* podem não desenvolver sintomatologia clínica (DANTAS-TORRES et al., 2006).

No cão, após cerca de quatro a seis meses de incubação, há o aumento do linfonodo drenante da área onde o parasita foi inoculado. Os primeiros sinais clínicos observados são conjuntivite, dermatite e hipertermia. Outros sinais frequentes são a caquexia, anemia, lesões

cutâneas como alopecia, eczema furfuráceo, lesões ulcerativas e hiperqueratose, onicogribose, ceratoconjuntivite, linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia (Figura 6), que podem levar o cão a óbito (CORTES et al. 2012).

Figura 6 – Cães com sinais clínicos na LVZ.



Legenda: (A) Descamação furfurácea e hiperqueratose; (B) Onicogribose e úlceras cutâneas; (C) Esplenomegalia; (D) Caquexia e alopecia generalizada; (E) lesão ulcerativa na face; (F) Ceratoconjuntivite.

Fonte: Próprio autor

1.1.6 Patogenia

Em cães infectados por *L. infantum*, a multiplicação desse parasito em macrófagos de diferentes tecidos leva à destruição dessas células e parece induzir uma resposta imune mista do tipo Th1/Th2 (KOUTINAS, F.; KOUTINAS, K., 2014).

A imunidade protetora do hospedeiro frente a infecção por *L. (L.) infantum* está associada aos linfócitos tipo Th1, que aumentam a atividade leishmanicida dos macrófagos infectados. A incapacidade de proliferação das células do sistema mononuclear ou a produção deficitária de IFN- γ em resposta aos antígenos de *Leishmania* é principal característica patológica da leishmaniose visceral (VIEIRA, 2014). O IFN- γ e a IL-12 produzidos pelas células T são de fundamental importância para o controle do crescimento parasitário, assim como no desenvolvimento da imunidade e resistência do hospedeiro (WHELAN et al., 2000). Os primeiros relatos mostraram que as citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) favorecem a infecção por *Leishmania* e a infecção crônica está associada a altos níveis de IL-5, IL-

13, que também inibem a morte do parasita (PINHEIRO; BERGMANN, 2007). Porém, a proteção diante desta enfermidade tem sido associada à produção de múltiplas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o que é dosado pelos níveis elevados de proteína plasmática apresentando IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IFN- γ , monocina induzida por IFN- γ e o TNF- α (PINHEIRO; BERGMANN, 2007).

Durante a infecção do parasito no fígado, há a indução de uma resposta imune protetora com formação de granuloma e suas citocinas, como IFN- γ , IL-12, juntamente com baixos níveis de TNF- α , que contribuem para a morte do parasito. A infecção por parasitos no baço está associada a níveis elevados de TNF- α , assim como o atraso ou ausência na formação de granuloma (ENGWERDA et al., 2004). Em ambos os tecidos, a suscetibilidade à infecção pelo protozoário está associada à secreção de IL-10. Na leishmaniose visceral, tanto humana como canina, o balanço de IFN- γ , IL-12 com IL-4, IL-10 é fundamental para o desfecho da doença (MURRAY et al., 2006). Animais que possuem resposta imune predominante do tipo Th1, com produção de IFN- γ , IL-12 e aumento de macrófagos, não manifestam sinais clínicos e apresentam diminuição da carga parasitária (FREITAS et al., 2012).

A resposta imune anti- *L. (L.) infantum* no cão pode resultar em alterações histológicas em diversos tecidos e órgãos por diferentes mecanismos tais como reação inflamatória granulomatosa, depósito de imunocomplexos ou produção de auto-anticorpos (KOUTINAS, F.; KOUTINAS, K., 2014). Na medula óssea, os macrófagos parasitados substituem tecido hematopoiético, levando o hospedeiro ao quadro de anemia e leucopenia. Há também imunodepressão, ficando reduzida a capacidade de resposta a outros antígenos e de proteção a outras infecções (PALTRINIERI et al., 2016).

Alterações hematológicas na leishmaniose canina são inespecíficas. A neutrofilia, devido a uma resposta inflamatória sistêmica, pode estar presente e ligada aos casos com lesões cutâneas ulcerativas e infecção bacteriana secundária (KIRAL et al., 2004). O aumento das outras populações de leucócitos são menos comuns, porém a linfopenia, linfocitose ou eosinofilia são ocasionalmente encontrados (NICOLATO et al., 2013).

Os cães infectados com *L. (L.) infantum* comumente apresentam anemia normocítica normocrômica de regenerativa a arregenerativa, anisocitose, e trombocitopenia e no leucograma é observada leucopenia com ligeira monocitose. Essas alterações são inespecíficas e podem ser agravadas mediante uma coinfeção (KIRAL et al, 2004; NEVES et al., 2012; PALTRINIERI et al., 2016). Essas alterações podem estar relacionadas ao comprometimento medular por contra da infecção pelo parasita bem como pelo sequestro de nutrientes como o ferro pelo protozoário durante seu desenvolvimento no hospedeiro vertebrado, outra hipó-

tese é a substituição do tecido hematopoiético medular por tecido inflamatório, a nutrição do animal hospedeiro também influencia neste processo (COSTA-VAL et al., 2007; MESQUISTA-RODRIGUES et al., 2013). A patogênese da anemia em cães com LVZ inclui mecanismos adicionais, como a síntese reduzida de eritropoietina devido a insuficiência renal. Além disso, é muito provável que a anemia também tenha um componente hemolítico, como sugerido por um positivo Teste de Coombs em uma minoria de casos (PALTRINIERI et al., 2016).

1.1.7 Achados histopatológicos intestinais

Alterações histológicas intestinais associadas a infecção por *Leishmania infantum* foram descritas em toda a mucosa dos segmentos do intestino delgado e grosso, onde não estavam relacionados necessariamente ao estado clínico do animal (KOUTINAS, F.; KOUTINAS, K., 2014; SILVA et al., 2016; VILA et al., 2016). Segundo Silva et al. (2016), os parasitas foram predominantemente localizados na mucosa (lâmina própria) do trato gastrointestinal (TGI). O maior acometimento foi observado no cólon quando comparado com outros segmentos intestinais (KOUTINAS, F.; KOUTINAS, K., 2014).

No trato gastrintestinal de cães infectados por *L. (L.) infantum*, pode haver uma inflamação geralmente leve, apresentando um exsudado crônico moderado a acentuado, difuso a focal, composto de macrófagos, células plasmáticas e linfócitos, com raros neutrófilos e eosinófilos. Essa inflamação está associada à presença de formas amastigotas desse parasito em todos os segmentos intestinais e camadas da parede intestinal (PINTO et al., 2011; SILVA et al., 2016).

A análise imuno-histoquímica revela macrófagos parasitados com amastigota intracelular de *Leishmania* sp., bem como a presença do parasito no meio extracelular, em lâmina própria. Os segmentos intestinais que apresentaram maior grau de parasitismo foram o colón e o ceco, em mucosa. Apesar de alta carga parasitária, a inflamação e demais alterações histológicas são leves, o que pode ser devido a tolerância imunológica no trato gastrintestinal (PINTO et al., 2011).

No estudo realizado por Toplu e Aydogan (2011), 7 dos 22 cães estudados apresentaram marcação positiva para *Leishmania* spp. nos intestinos. Todos os 20 animais provenientes do centro de controle de zoonoses da prefeitura de Ribeirão das Neves (MG), evidenciaram amastigotas de *Leishmania* spp, pela técnica de IHQ, em todos os segmentos intestinais analisados (PINTO et al., 2011).

Gonzalez et al. (1990) e Pinto et al. (2011) observaram no intestino de cães infectados por *L. infantum*, um infiltrado inflamatório constituído por células gigantes multinucleadas e células epitelióides em alguns casos, mas nenhum granuloma típico foi observado. Segundo Casanova et al. (2019), 72% de amostras de cólon de cães com doença inflamatória intestinal provenientes de região endêmica para LVZ na Espanha foram positivas para formas amastigotas de *Leishmania* pela imuno-histoquímica. Pinto e colaboradores (2011), observaram uma frequência de positividade de amastigotas em cães sintomáticos de 63,6% no jejuno e 90,9% no ceco, já nos animais assintomáticos essa frequência foi de 55,5% e 66,6% respectivamente, sendo o infiltrado inflamatório composto principalmente por plasmócitos, linfócitos, macrófagos e raros neutrófilos. Portanto, esses autores concluíram que é possível que a infecção por *Leishmania* spp. esteja associada à colite crônica em áreas endêmicas para leishmaniose.

1.2 Principais helmintoses intestinais em cães no Brasil

Helmintoses são doenças causadas por helmintos parasitos que possuem ampla distribuição mundial. Os cães são os animais domésticos que apresentam uma relação mais estreita e próxima ao ser humano e essa proximidade gera uma maior exposição a doenças potencialmente zoonóticas, que esses animais de companhia podem transmitir (OLIVEIRA et al., 2009). Alguns helmintos gastrintestinais que tem a espécie *Canis familiares* como hospedeiro definitivo ou intermediário apresentam potencial zoonótico, podendo gerar doença ao ser humano (SANTOS et al., 2007).

Em cães, as helmintoses mais comuns são as intestinais e acometem principalmente animais jovens, podendo causar gastos com medicamentos, hospitalização e morte do animal (MATTOS JR, 1999). É possível identificar esses parasitos em cães que não recebem os devidos protocolos de tratamento anti-helmíntico e residem em locais com higiene precária. Os helmintos que parasitam os cães podem ser divididos em nematoides, cestoides e trematódeos (MATTOS JR, 1999).

Nas helmintoses intestinais, os cães parasitados apresentam, em geral, emaciação e diarreia que vai de discreta a intensa, dependendo da espécie do parasita, do grau de parasitismo e da resposta imunológica dos hospedeiros. No exame hematológico, é possível observar uma anemia normocítica normocrômica e eosinofilia, tanto em humanos como nos canídeos com helmintoses intestinais (SILVA et al., 2011).

Os helmintos apresentam diferentes glicoconjugados em sua superfície, que contêm açúcares incomuns. Muitos destes compostos desencadeiam uma resposta celular Th2 (OKAN et al.,1999). Há produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 e, assim, há uma forte resposta de imunoglobulina E (IgE), com aumento de eosinófilos e mastócitos. Assim, uma resposta Th2 contribui para a imunopatologia das infecções por helmintos e protege o hospedeiro de possível parasitose mais grave. Relatos anteriores estabeleceram um papel para a citocina IL-5 (Th2), como a reguladora central da eosinofilia. Os eosinófilos medeiam à eliminação do parasito através da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), que surgiu como um mecanismo para resistência dos helmintos aos anti-parasitários (CAPRON, M.; CAPRON, A., 1992).

Os helmintos intestinais de maior importância nos cães, de ampla distribuição mundial e que podem ser agentes causadores de zoonoses são os nematoides *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense* (ancilostomídeos) e o cestóide *Dipylidium caninum* (ACHA; SZYFRES, 2003; BRITO, 2015; SÁNCHEZ, 1999; SILVA; VARIZA, 2012).

Na cidade do Rio de Janeiro, os ancilostomídeos são os principais causadores de infecção nos cães de todas as faixas etárias, fato por observado Vasconcellos, Barros e Oliveira (2006). A segunda espécie mais encontrada foi o *T. canis*. A alta frequência de ancilostomídeos e *T. canis* observada em animais de companhia é preocupante, uma vez que são agentes de zoonoses (BALASSIANO et al., 2009; BRENER et al., 2005; VASCONCELLOS; BARROS; OLIVEIRA , 2006).

No estudo realizado por Balassiano et al. (2009), 500 amostras fecais de cães, provindos de diversas clínicas do estado do Rio de Janeiro, foram analisadas e 76 (15,2%) das amostras foram positivas para ancilostomídeos, 37 (7,4%) para ascaridídeos, 25 (5,0%) para tricurídeos, e 1 (0,2%) para *Dipylidium caninum*.

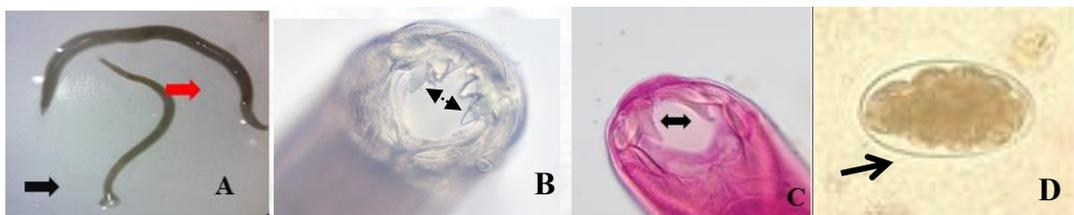
1.2.1 Ancilostomoses

1.2.1.1 Morfologia

São doenças causadas por helmintos hematófagos encontrados fixados principalmente no intestino delgado do hospedeiro. Possuem coloração branco acinzentada e apresentam cápsula bucal desenvolvida. Na cápsula bucal, o *Ancylostoma caninum* possui três pares de dentes marginais e o *Ancylostoma braziliense* um par, que são utilizados para a fixação no

hospedeiro. Os machos podem medir de 5 a 21 mm e apresentam bolsa copulatória em extremidade posterior e as fêmeas medem de 14 a 20 mm (Figura 7). Os ovos podem medir de 64 a 84 μm x 32 -54 μm , são elípticos a arredondados, de casca fina e transparente que medem 55 a 77 μm de comprimento por 34 a 45 μm de largura (URQUHART et al., 1998)

Figura 7 –Características morfológicas do nematoide *Ancylostoma* spp.



Legenda: A) Exemplar macho, presença de bolsa copulatória (seta preta) e fêmea (seta vermelha), objetiva de 4x em lupa estereoscópica; (B). Cápsula bucal evidenciando 3 pares de dentes (seta), *A. caninum*, objetiva de 5x em microscópio óptico;(C) Cápsula bucal evidenciando 1 par de dentes (seta), *A. braziliense*, objetiva de 5x em microscópio óptico (D) Ovos (setas) em objetiva de 10x em microscópio óptico.

Fonte: Próprio autor.

1.2.1.2 Ciclo biológico

No ciclo monoxênico, a fêmea destes helmintos presente no intestino delgado põe ovos que chegam ao solo por meio das fezes do cão. Em condições adequadas, o parasito evolui em 48 horas no interior do ovo, atingindo o primeiro estágio larval (L1). A L1 eclode e evolui no meio externo até a larva de terceiro estágio (L3), que é a forma infectante. No solo úmido e levemente aquecido, as larvas infectantes podem sobreviver até 15 semanas. As formas de infecção podem ser oral, cutânea, transmamária e pré natal. Na infecção oral, as L3 ganham o intestino delgado, penetram na parede intestinal e sofrem mais duas mudas, atingindo a sua fase adulta. O quadro clínico observado nos animais parasitados vai de agudo a crônico, dependendo do grau de parasitismo do hospedeiro (FORTES, 2004). Alguns insetos também podem albergar a larva infectante por um período de tempo e, sendo hospedeiros paratênicos até serem ingeridos pelo hospedeiro definitivo (LITTLE, 1961).

Outra forma de infecção é a pré-natal, na qual as larvas L3 que estavam encistadas na musculatura da cadela, por uma infecção prévia, ganham a circulação durante a prenhez, atravessam a placenta e atingem o feto. Essas larvas evoluem até a forma adulta após o nascimento do filhote. Em regiões endêmicas, a infecção ocorre geralmente em cães com menos

de um ano de idade. Em animais mais idosos, devido a sua maior resistência, a infecção é menos provável, principalmente se os cães forem criados nessas regiões (FORTES, 2004).

Há também a infecção via cutânea, na qual as L3 penetram a derme e em seguida ganham a circulação sanguínea sistêmica ou linfática, alcançando outros órgãos como pulmões e coração. Uma vez nos pulmões, realizam migração ascendente alcançando a faringe e sendo deglutida. Uma vez deglutidas, atingem o intestino delgado, onde penetram à mucosa, migram para a luz do intestino delgado e sofrem nova muda, atingindo a maturidade (ARAÚJO, 1988).

Uma forma de infecção menos frequente é a via transmamária, onde as L3 que se encontravam inativas na musculatura das mamas, voltam à atividade devido a uma imunodepressão do hospedeiro, ganham a glândula mamária e são eliminadas no leite por um período de até três semanas pós-parto (ARAÚJO, 1988; FORTES, 2004).

1.2.1.3 Sinais clínicos

A anemia aguda ou crônica é o principal sinal clínico da infecção por *A. caninum* e *A. braziliense* por conta da ação hematófaga do parasito, sendo os animais mais jovens, com menos de um ano, e os filhotes infectados por via transmamária os mais susceptíveis. Outros sinais clínicos observados são a diarreia contendo sangue e/ou muco, perda de peso, vômitos e sinais respiratórios (ARAÚJO, 1988).

1.2.1.4 Achados histopatológicos intestinais

Lesões no intestino delgado de cães parasitados com *A. caninum* variam conforme o grau de parasitismo pelo helminto. É possível observar em cortes histológicos o nematoide fixado em mucosa circundado por infiltrado linfoplasmocitário e eosinofílico. Durante o processo de fixação do parasito na mucosa, a inflamação no local gera diminuição das vilosidades e congestão linfática local. O desprendimento posterior do parasito gera úlceras hemorrágicas em mucosa e submucosa acompanhadas por infiltrado neutrofílico (supurativo) e eosinofílico. Há então a regeneração intestinal no local da lesão. Em casos de alto parasitismo, há perda de sangue e necrose tecidual acompanhada de fibrose local (KALKOFEN, 1974).

1.2.1.5 Epidemiologia

A distribuição é ampla nos trópicos e em regiões temperadas quentes, porém há casos em outras regiões por meio de cães importados de regiões endêmicas. Em regiões endêmicas, a infecção ocorre geralmente por via oral, transplacentária e cutânea em cães filhotes com menos de um ano de idade e, em animais mais velhos, que devido a sua maior resistência, a infecção é menos frequente (VARIZA, 2012).

Grandes populações caninas circulam livremente pelas ruas e praças públicas em diversos ambientes, muitas vezes levados pelos seus proprietários. Com o ato natural de defecação, os animais contaminam o solo com o parasito (FORTES, 2004).

1.2.1.6 Larva *Migrans* Cutânea

Larvas de terceiro estágio de *A. caninum* e *A. braziliense* ao penetrarem a pele humana fazem migrações pelo tecido subcutâneo, produzindo a síndrome conhecida como Larva *Migrans* Cutânea (OLIVEIRA et al., 2008).

Ao realizarem a migração pela pele, esses helmintos deixam rastros (por isso são conhecidos popularmente como “bicho geográfico”), causando reações inflamatórias locais observadas com maior frequência nos membros inferiores, principalmente nos pés e nádegas (SANTARÉM; GIUFFRIDA; ZANIN, 2004). A enfermidade acomete pessoas de todas as idades, mas é frequentemente encontrado em crianças, pois essas costumam frequentarem mais os locais com solos contaminados (OLIVEIRA et al., 2008).

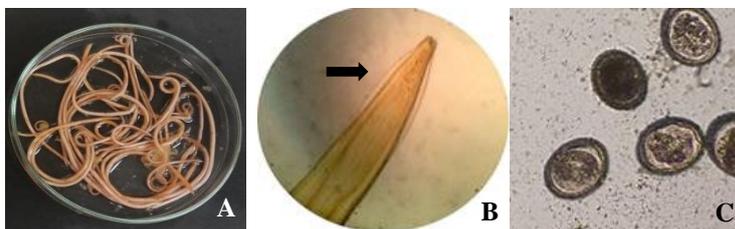
1.2.2 Toxocaríose

1.2.2.1 Morfologia

O nematoide *Toxocara canis* é um nematoide ascarídeo de coloração branca, de tamanho grande, cujos machos atingem cerca de 10 cm e as fêmeas podem chegar aos 18 cm de comprimento. A porção anterior do adulto é elíptica, devido às asas cervicais, apresenta três grandes lábios na região anterior, há a ausência de cápsula bucal e o esôfago termina em um bulbo (Figura 8). O macho apresenta um apêndice terminal estreito, na região posterior, bem como duas asas caudais e com espículos medindo entre 0,75 – 0,95 mm. Já os genitais femininos prolongam-se anterior e posteriormente em relação região vulvar (GRAÇA, 2015). Os ovos deste nematoide possuem uma parede rugosa e grossa, com múltiplas cama-

das concêntricas e uma coloração castanho-escuro, são esféricos, com aproximadamente 80 µm de diâmetro (GRAÇA, 2015).

Figura 8 - Características morfológicas do nematoide *Toxocara canis*.



Legenda: A) exemplares machos e fêmeas pós necropsia, (B) extremidade anterior do parasito com asas cervicais (seta), objetiva de 5x em microscópio óptico;(C) Ovos em objetiva de 10x em microscópio óptico.

Fonte: (A) Próprio autor; (B) e (C) SiteLEODRAS, WikimediaCommons, 2014

1.2.2.2 Ciclo biológico

Este parasito apresenta quatro formas possíveis de infecção: ingestão de ovos contendo larva infectante, infecção pré-natal, infecção por via mamária e ingestão de hospedeiros paratênicos infectados. A forma mais frequente, comum a outras espécies de ascarídeos, é a ingestão do ovo do parasito, contendo larva de segundo estágio (L2), que é infectante em condições ambientais ideais. Após a ingestão, a larva eclode, atravessa a parede intestinal do hospedeiro definitivo, cai na circulação porta, ascende ao fígado e ganham a circulação sanguínea chegando aos pulmões. Nos pulmões, as L2 realizam a muda e vão a L3, que ascende a traqueia, chegam a faringe e são deglutidas chegando novamente ao intestino delgado, onde sofrem 2 mudas e alcançam a fase adulta. Esse ciclo ocorre principalmente em filhotes de até três meses de vida (FORTES, 2004).

Em cães adultos, a L2 ganha uma ampla variedade de tecidos como fígado, coração, pulmões, cérebro, parede do trato gastrointestinal e musculatura esquelética. Na cadela gestante parasitada, ocorre a infecção pré-natal do feto. Nessa forma de infecção, três semanas antes do parto, as L2 migram para os pulmões fetais, nos quais sofrem muda para L3 antes do parto. No neonato, o ciclo se completa quando as larvas ganham o intestino delgado por via traqueal e realizam as últimas mudas. Algumas larvas na cadela prenhe completam o ciclo indo a parasitos adultos no intestino. O neonato pode ser infectado por via mamária

durante as três primeiras semanas de lactação. Nos hospedeiros paratênicos, como roedores, ao ingerirem os ovos contendo a L2 essa segue para os tecidos onde permanecem até que o hospedeiro seja ingerido pelo cão (DESPOMMIER, 2003).

Esse nematoide causa uma ação espoliativa no intestino delgado e em altas cargas parasitárias pode ocasionar obstrução mecânica desse órgão. Os filhotes com menos de 3 meses e os animais imunocomprometidos são os mais suscetíveis a doença (PRATES et al., 2009).

1.2.2.3 Sinais clínicos

Os sinais clínicos incluem ascite, anemia, apatia, pelo opaco, emaciação e diarreia. Em neonatos, pode gerar pneumonia e levar ao óbito. Em caso de ingestão acidental dos ovos contendo L2 por um ser humano, o parasito limita em geral sua migração ao fígado, ocasionalmente podem atingir o globo ocular provocando deslocamento de retina, causando a Larva *Migrans* Visceral (PRATES et al., 2009).

1.2.2.4 Achados histopatológicos intestinais

As reações geradas a nível intestinal causadas por helmintos do gênero *Toxocara* variam conforme a fase do ciclo de vida do parasito, bem como o grau de parasitismo. Na fase larvar, a L3 ao penetrar a parede intestinal gera uma reação inflamatória por ação mecânica e química (presença de compostos tóxicos em seu tegumento), com presença de infiltrado granulomatoso e eosinofílico, havendo também linfócitos e plasmócitos. A inflamação intensa pode gerar necrose em células epiteliais colunares presentes na mucosa e perda de função intestinal no local (KLOCKIEWICZ et al., 2019).

Na fase adulta, o *Toxocara* sp. gera uma reação inflamatória intestinal com infiltrado granulomatoso não supurativo e presença de eosinófilos, há aumento da produção de muco, achatamento das vilosidades e áreas de fibrose em mucosa e submucosa geradas por inflamação prévia (KLOCKIEWICZ et al., 2019).

1.2.2.4 Epidemiologia

Esta enfermidade apresenta maior prevalência em países tropicais e subtropicais, por conta das altas temperaturas e umidade. São consideradas áreas de risco zona rural e periferias urbanas com deficiência sanitária e onde as pessoas não realizam protocolo de tratamen-

to anti-helmíntico nos cães domésticos. Como consequência, os proprietários dos animais parasitados podem ser infectados com as fezes desses animais, que também contaminam o meio ambiente em áreas recreativas como parques, *playgrounds*, praças e outros locais públicos frequentados por esses animais (SILVA, 2015).

1.2.2.5 Síndrome de Larva *migrans* visceral

Os humanos, assim como em outras espécies de animais, que são hospedeiros paratênicos se infectam ao ingerirem a L3 infectante. Após a ingestão, as L3 chegam ao intestino, penetram na mucosa, alcançam a veia porta, passam pelo fígado e ganham a circulação sanguínea, realizando migração somática. Entretanto as L3 não completam seu ciclo e geram a síndrome de *Larva Migrans* visceral. O parasitismo no humano é devido também a ingestão de carne crua ou malpassada contendo L3 de outros hospedeiros paratênicos (SILVA, 2015).

O paciente humano pode ser assintomático ou apresentar sinais clínicos, como tosse, febre, hepatomegalia, dor abdominal e lesões da pele. A toxocaríose pode estar associada a síndromes relacionadas a alergias, como a urticária crônica, artrite reativa ou angioedema. O quadro clínico dependerá do grau de infestação, idade, reposta imunológica do hospedeiro e o(s) órgão(s) afetado(s). Em quadros mais graves pode haver comprometimento respiratório, neurológico e ocular. A infecção ocular pode resultar em perda da visão (MAGNAVAL, 2001).

1.2.2.6 Enterite Eosinofílica

É uma inflamação no intestino por diversas causas, como por exemplo, o parasitismo helmíntico pelo ascarídeo *Toxocara canis* e o ancilostomídeo *Ancylostoma caninum*, que são os principais agentes etiológicos da Larva *Migrans* Visceral e Larva *Migrans* Cutânea (LMC), respectivamente (VASCONCELLOS; BARROS; OLIVEIRA, 2006).

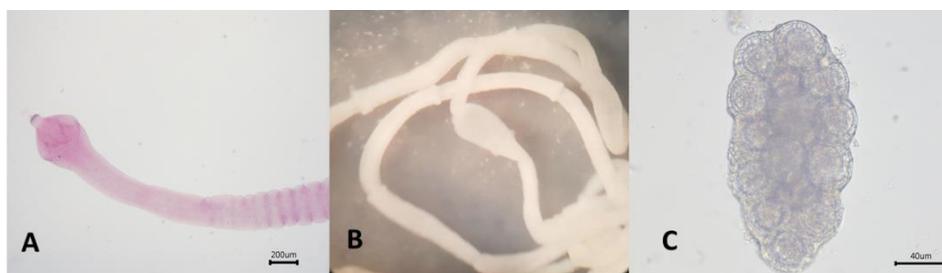
A presença dos parasitos no intestino bem como sua migração pode também induzir uma resposta de hipersensibilidade frente ao antígeno presente no lúmen intestinal, induzindo a degranulação de mastócitos, liberação de mediadores da inflamação e atração de eosinófilos. Os sinais clínicos incluem vômitos intermitentes, inapetência, perda de peso, anorexia, melena ou hematoquezia como resultado da ulceração gastrintestinal (FONSECALVES; CORRÊA; ELIAS, 2012).

1.2.3 Dipilidiose

1.2.3.1 Morfologia

O *Dipylidium caninum* é um cestóide pertencente à família Dipylididae. Apresenta coloração esbranquiçada e forma achatada, medindo em torno de 20 a 80 cm de comprimento. A parte anterior apresenta um escólex com 4 ventosas apresentando 40 a 60 ganchos dispostos em 3-5 fileiras ao redor do rostelo. Apresenta corpo segmentado, seus segmentos são denominados proglotes, que medem cerca de 0,5 a 1 cm de comprimento (Figura 9). As proglotes são divididas em imaturas, maduras e grávidas e apresentam movimentação própria e são eliminadas nas fezes do hospedeiro (ALHO et al., 2015).

Figura 9 - Características morfológicas do cestóide *Dipylidium caninum*.



Legenda: (A) Escólex do parasita (seta), objetiva de 5x em microscópio óptico; (B) Proglotes, objetiva de 10x em lupa estereoscópica; (C) Cápsula ovígera contendo diversos ovos com embrião hexacanto, objetiva de 10x em microscópio óptico.

Fonte: Próprio autor.

1.2.3.2 Ciclo biológico

A transmissão ao hospedeiro definitivo (cães, gatos e mais raramente humanos) se dá através da ingestão acidental de um hospedeiro intermediário, que fora infectado previamente pela larva cisticercóide. Os hospedeiros intermediários são pulgas do gênero *Ctenocephalides* e *Pulex* e piolhos do gênero *Trichodectes*. Há a ingestão do hospedeiro intermediário pelo hospedeiro definitivo quando esse se coça com a boca. No intestino delgado do hospedeiro definitivo, ocorre a transformação da larva cisticercóide em helminto adulto. O parasita adulto libera proglote gravídicos, que contém as cápsulas ovígeras. Cada cápsula ovígera possui em seu interior entre 5 a 30 ovos, que contêm um embrião hexacanto. Ao chegarem ao solo, o rompimento dos proglotes gravídicos libertam as cápsulas ovígeras com múltiplos

ovos embrionados, que são ingeridos então pelo hospedeiro intermediário (ALHO et al., 2015).

1.2.3.3 Sinais clínicos

Os sinais clínicos estão associados ao grau de infecção do hospedeiro pelo *D. caninum*. Os sinais comumente apresentados, que chegam a ser a queixa principal apresentada pelo proprietário, são o prurido anal (onde o animal fricciona a região anal em superfícies rugosas) e a presença dos proglotes do parasita na zona perianal e/ou nas fezes. Em caso de infecções graves, os cães apresentam sinais como, perda de peso, anorexia, diarreia e crescimento retardado nos animais jovens (WANI et al, 2015). Anemia e doenças dermatológicas como a dermatite alérgica a picada da pulga são alterações que podem vir acompanhadas, porém essas são causadas pelo hospedeiro intermediário.

1.2.3.4 Achados histopatológicos intestinais

Alterações degenerativas como necroses focais na mucosa e submucosa intestinal, hiperplasia de células caliciformes e cortes de parasitos no lúmen intestinal podem ser observados nas lâminas de intestino delgado coradas com hematoxilina-eosina. Descamação severa da mucosa ocorre em poucos casos, porém na maioria é observada pelo menos descamação discreta da mucosa, sempre na lâmina própria, além de um espessamento da membrana basal. Em casos mais graves de parasitismo, há a descamação do epitélio, necrose focal e aumento no número de fibroblastos no local de fixação do parasito. Hemorragias localizadas ocorreram ocasionalmente em volta das ventosas no ponto de fixação do parasito na mucosa intestinal, com presença circundante de infiltrado mononuclear e polimorfonuclear (CAMPOS; MORAES, J.; MORAES, F., 2009).

1.2.3.5 Epidemiologia

O cestóide *D. caninum* tem como habitat o intestino delgado dos cães e gatos e raramente humanos. A infecção em cães, gatos e humanos (sobretudo crianças) ocorre pela ingestão de pulgas e piolhos contendo larvas cisticercóides do parasito (JIANG et al., 2017). Para a infecção humana é necessário à ingestão de pulgas de cão ou gato infectadas, com isso é mais provável que ocorra em crianças pequenas que podem ingerir acidentalmente esses artrópodes (MARKWELL et al., 2003).

1.2.4. Tricuríase

1.2.4.1 Morfologia

São helmintos pertencentes à família Trichuridae. São nematoides que apresentam corpo cilíndrico com cerca de 3 a 5 cm de comprimento, sendo os machos menores que as fêmeas. Apresentam uma extremidade anterior mais delgada, que é $\frac{2}{3}$ mais longa que a região posterior, dando um aspecto de “chicote” (Figura 10). A extremidade anterior é constituída pela região esofágica por onde esse helminto fixa-se na mucosa intestinal. A diferença entre *T. vulpis*, *T. trichiura* (parasito de humanos), *T. serratus* é observada pelo comprimento do espículo, de 9-11 mm, 2-3,3 mm e 1,2 mm respectivamente segundo Vicente et al. (1997). Os ovos medem em torno de 50 a 20 μm apresentando uma cor castanha, formato elíptico característico com opérculos salientes e transparentes em ambas as extremidades (Figura 10). O ovo possui três camadas: lipídica externa, camada quitinosa intermediária e camada vitelínica interna (FORTES, 2004).

Figura 10 – Características morfológicas do nematoide *Trichuris* sp.



Legenda: (A) Fêmea de *Trichuris* sp., extremidade posterior ligeiramente curvada (seta branca) e extremidade anterior (seta preta), objetiva de 10x em lupa estereoscópica; (B) Ceco de cão parasitado por *Trichuris* sp. (C) Ovos bioperculados (setas) em útero de fêmea de *Trichuris* sp., objetiva de 10x em microscópio óptico.

Fonte: Próprio autor.

1.2.4.2 Ciclo biológico

É um ciclo monoxênico, onde não há hospedeiros intermediários, o parasito adulto habita o intestino grosso, principalmente o ceco, e as fêmeas eliminam os ovos não embrioados nas fezes dos animais parasitados, chegando ao ambiente. Os ovos, em condições fa-

voráveis, se desenvolvem gerando a forma embrionada contendo a larva L2 infectante. Os ovos contendo L2 são ingeridos pelo hospedeiro e eclodem no intestino liberando as larvas. Essas larvas penetram a mucosa do intestino grosso, realizam mudas e chegam à fase adulta, migrando para a porção mais posterior do ceco ou cólon, reiniciando ciclo novamente. (LONGO et al., 2008). São parasitas hematófagos, mas também se alimentam de fluídos e tecido intestinal (FORTES, 2004)

1.2.4.3 Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos observados pela ação parasitária no hospedeiro são perda de peso, diarreia sanguinolenta ou não, dor e distensão abdominal e anemia. Em casos mais graves de parasitismo, pode haver uma inflamação diftérica da mucosa de ceco e cólon, levando o hospedeiro a óbito. Pode ocorrer prolapso retal em consequência de um processo inflamatório muito intenso no reto. Muitas vezes a doença é assintomática, porém, ainda há eliminação de ovos do parasita nas fezes, mantendo assim a contaminação ambiental (SLOSS, 1999).

1.2.4.4 Achados histopatológicos intestinais

Avaliação microscópica do ceco de cão parasitado por *Trichuris* spp. evidencia proliferação linfocítica difusa tanto na mucosa quanto na submucosa. As hemorragias observadas, modificações distróficas, infiltração celular abundante da mucosa e submucosa estão associadas ao fator mecânico. Também é possível observar infiltração eosinofílica em lâmina própria (KIRKOVA; DINEV, 2005).

1.2.4.5 Epidemiologia

Esses parasitos apresentam maior prevalência em locais onde há condições higiênico-sanitárias precárias, água não tratada e ambiente mais quente e úmido durante o ano. Há menor número de casos em condições ambientais contrárias a esta, porém é uma doença considerada cosmopolita, fator resultante da alta resistência dos seus ovos às alterações ambientais (ACHA; SZYFRES, 2003).

1.3 Técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de helmintos intestinais em cães

O diagnóstico das helmintoses pode ser feito pelo achado dos ovos ou dos parasitos nas fezes de pacientes infectados. As técnicas diagnósticas baseiam-se no exame microscópico direto através da diluição ou concentração dos elementos parasitários presentes na amostra fecal. Fatores como número de ovos produzidos pelo parasito, o volume da amostra analisada e carga parasitária podem influenciar no diagnóstico. O número de ovos na amostra fecal do paciente pode variar conforme a espécie do parasito, à sua localização ao longo do TGI, o tipo de alimento ingerido pelo hospedeiro e ao peristaltismo intestinal, o que pode gerar uma mistura desuniforme dos ovos nas fezes (HALL, 1982).

Embora existam essas intercorrências, há a importância clínica e epidemiológica na identificação e quantificação de ovos de helmintos nas amostras fecais a fim de estimar a intensidade da infecção parasitária. A determinação da carga parasitária pode auxiliar na avaliação da morbidade e no acompanhamento clínico do paciente. A determinação da quantidade de ovos eliminada nas fezes possibilita também estimar a probabilidade de transmissão destes agentes a outros animais e ao homem (HALL, 1982).

As técnicas de flutuação, sedimentação e exame direto são usadas como rotina na investigação da ocorrência de helmintoses nas amostras fecais da espécie canina. Essas técnicas são de baixo custo, sensíveis, de fácil execução e importantes no diagnóstico dos animais parasitados (FISCHER, 2003). Dentre as técnicas coproparasitológicas qualitativas mais utilizadas para o diagnóstico de helmintos em cães estão as técnicas de Fulleborn ou Willis (flutuação) e Ritchie (sedimentação). Para diagnóstico qualitativo e quantitativo, pode ser utilizada a técnica de Gordon & Whitlock.

1.3.1- Técnica de flutuação (Fullerborn)

As técnicas de flutuação se baseiam na diferença de densidade entre os ovos dos helmintos e o material fecal, fazendo com que esses organismos flutuem na superfície dos reagentes de alta densidade, que são as soluções saturadas. Algumas das soluções saturadas utilizadas são a solução saturada de açúcar e solução saturada de sal (NaCl).

A técnica tem como vantagens a flutuação dos ovos mais comuns de helmintos em cães, as soluções usadas são baratas e de fácil preparo e, na leitura das lâminas ao microscó-

pio óptico, há poucos debrís e sujidades que dificultam a visão dos ovos. Uma das soluções mais utilizadas é a solução saturada de açúcar, que tem como vantagem não afetar a viabilidade dos ovos, não alterando sua morfologia. São desvantagens dessa técnica: o tempo de espera relativamente alto (20 minutos) para flutuação dos ovos, caso não seja realizada a centrifugação, e não é recomendada em amostras de fezes contendo gordura (SLOSS, 1999).

1.3.2 Técnica de Sedimentação (Ritchie modificado)

A técnica de Ritchie é uma técnica de centrífugo-sedimentação. O método pode ser usado para a pesquisa de cistos de protozoários, ovos, e larvas de helmintos. Nesta técnica os compostos são sedimentados pela gravidade ou centrifugação, onde ovos e cistos ficam retidos no fundo do tubo, enquanto os detritos são suspensos para a superfície e há a separação das gorduras e dos detritos (YOUNG, 1979).

A técnica tem como desvantagem a grande quantidade de detritos fecais no sedimento, com isso há a dificuldade na identificação dos parasitos se comparado a técnicas de flutuação (FORTES, 2004).

1.3.3 Técnica para contagem de ovos (Gordon & Whitlock)

A técnica de Gordon & Whitlock tem como princípio a identificação e contagem de ovos por gramas de fezes de helmintos, como nematoides gastrointestinais. Para sua realização se faz necessário a utilização de uma lâmina especial denominada câmara de Mc Master (MATTOS JR; MOTTA, 1996).

A técnica apresenta como vantagens a quantificação do número de ovos eliminados nas fezes do hospedeiro e não necessita de um equipamento especializado, sendo viável e pouco oneroso. Já como desvantagens, pode haver demora durante a contagem, principalmente se houver grande quantidade de debrís e não é recomendado em amostras de fezes contendo gordura (SLOSS, 1999).

2 JUSTIFICATIVA

A ocorrência de LVZ em cães no município de Barra Mansa é muito elevada e outras coinfeções podem estar associadas em função da imunossupressão causada por essa protozoonose (MELLO et al., 2014; PINELLI et al., 1994; SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS., 2009). Essas coinfeções também podem agravar a doença, aumentando a mortalidade e o potencial de transmissão dos agentes envolvidos (SARIDOMICHELASKIS et al., 2014; TOEPP et al., 2019)

Um estudo recente no Brasil (AZEREDO-COUTINHO et al., 2016) evidenciou que o parasitismo intestinal por helmintos está associado a formas mais graves da leishmaniose tegumentar em humanos, como a forma mucosa. Entretanto, a relação de coinfeções de helmintos com a LVZ é pouco conhecida, sobretudo em cães. Ademais, de acordo com hipótese de Maurya, Alti, Chandrasekaran (2012), no caso de infecções em humanos por *L. donovani*, espécie causadora da leishmaniose visceral na Ásia e África, infecções por helmintos podem induzir uma resposta imune protetora do tipo Th2 por parte do hospedeiro. Essa resposta pode suprimir a resposta imune do tipo Th1, que é eficiente na leishmaniose visceral e aumentar a taxa de susceptibilidade a essa doença em regiões endêmicas. Entretanto, segundo Tajebe et al. (2017), em humanos com leishmaniose visceral na Etiópia, foi demonstrado que a co-infecção de *L. donovani* com parasitos intestinais não afeta a gravidade da doença. Portanto, esses resultados controversos e a escassez de estudos relacionados a LVZ, demonstram a necessidade de novas pesquisas sobre o assunto.

Nesse contexto, o presente estudo é de relevância científica, pois permite avaliar a ocorrência de helmintos intestinais em cães soropositivos para anticorpos anti-*L. infantum* no município de Barra Mansa. Ademais, este estudo avaliou a ocorrência de coinfeções de *L.(L.) infantum* com helmintos intestinais em cães, bem como os sinais clínicos, alterações histológicas intestinais e hematológicas associadas à essas coinfeções, em comparação com os cães monoinfectados por *L.(L.) infantum*. Como consequência das coinfeções de *L.(L.) infantum* com helmintos intestinais pode haver um aumento da carga parasitária desses helmintos, bem como alterações clínicas mais graves de LVZ e o presente estudo visa confirmar essa hipótese. Portanto, os resultados desse estudo fornecerão informações importantes para saúde pública e para o campo da medicina veterinária sobre o potencial de transmissão destes agentes etiológicos de cães para outros cães e humanos, bem como as alterações associadas a esses agentes e suas coinfeções em cães. Essas informações serão úteis para um melhor controle e prevenção das zoonoses causadas por esses dois agentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de helmintos intestinais em cães sorologicamente positivos para *L. infantum* e comparar com os sinais clínicos, alterações hematológicas e histológicas dos cães coinfectados com a dos monoinfectados por *L. infantum*.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar os sinais clínicos e perfil hematológico de cães sorologicamente positivos para *L. infantum*, coinfectados ou não por helmintos intestinais.
- 2- Avaliar a ocorrência e carga de helmintos intestinais em cães sorologicamente positivos para *L. infantum*;
- 3- Identificar morfologicamente e por técnicas coproparasitológicas as espécies de helmintos intestinais que parasitam cães sorologicamente positivos para *L. infantum* e provenientes do município de Barra Mansa, RJ.
- 4- Avaliar a ocorrência de formas amastigotas de *Leishmania* spp. e de alterações histológicas nos intestinos delgado e grosso em cães sorologicamente positivos para *L. infantum* e verificar sua associação com a coinfecção por helmintos intestinais;
- 5- Comparar, com base nos resultados do diagnóstico parasitológico para *L. infantum* (técnicas histológicas e/ou cultura), os sinais clínicos, alterações hematológicas e alterações histológicas intestinais entre cães com leishmaniose visceral, coinfectados ou não por helmintos intestinais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra

Foi coletada entre fevereiro de 2018 e julho de 2019 uma amostra de conveniência composta por cães soropositivos para *L.(L.) infantum*, de raça, sexo e idade variados. A idade foi categorizada em jovens (até 12 meses), adultos (13 a 60 meses) e idosos (a partir dos 61 meses).

4.1.2- Critérios de inclusão e exclusão

Cães provenientes do município de Barra Mansa, no estado do Rio de Janeiro. Foram incluídos no estudo os cães sorologicamente positivos para *L. infantum* pelas técnicas de imunocromatografia de duplo percurso (DPP[®], Biomanguinhos, Rio de Janeiro), realizada pela Secretaria de Saúde de Barra Mansa, e de ELISA (Biomanguinhos, Rio de Janeiro), realizada pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do estado do Rio de Janeiro. Foram excluídos os cães que tiveram alguma perda amostral durante o estudo.

Os cães soropositivos foram encaminhados para eutanásia, como medida de controle preconizada pelo Ministério da Saúde (2014), no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fiocruz.

4.2 Exame clínico e coleta das amostras

No Lapclin-Dermzoo, os cães sorologicamente positivos foram submetidos a exame clínico constituído de inspeção de pele e de mucosas oral e ocular, palpação de linfonodos superficiais e órgãos abdominais. Durante o exame clínico, foram considerados sinais clínicos compatíveis com LVC: magreza ou caquexia, alopecia geral ou localizada, lesões cutâneas como úlceras e descamação, onicogribose, aumento de linfonodos superficiais, do fígado ou do baço à palpação, ceratoconjuntivite e sinais clínicos de anemia, como mucosas hipocoradas (BRASIL, 2014).

Em relação à quantidade de sinais clínicos, os cães foram classificados como tendo poucos sinais clínicos (até dois sinais), muitos sinais clínicos (que apresentavam mais de dois sinais) e sem sinais clínicos (ASSIS et al., 2010).

Após o exame clínico, os animais foram sedados com cloridrato de cetamina (10 mg/kg) em associação ao maleato de acepromazina (0,2 mg/kg), por via intramuscular e foi feita coleta de sangue por meio da punção da veia cefálica. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos de ensaio contendo anticoagulante EDTA, identificadas e mantidas sob refrigeração até o momento da realização do hemograma completo, que era realizada no mesmo dia. Em seguida, os cães foram submetidos à eutanásia com administração, por via endovenosa, de dose excessiva de tiopental sódico (75 mg/kg) e, posteriormente, de cloreto de potássio a 19,1% (1ml/kg) e necropsiados.

Na necropsia, os intestinos delgado e grosso foram removidos, abertos com tesoura e examinados macroscopicamente. O conteúdo de cada segmento intestinal (duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto) foi lavado em uma peneira de aço inox com abertura de malha de 0,106 mm e Tyler 150 (ABNT 140), colocado separadamente em placas de Petri contendo solução de cloreto de sódio a 0,85% e examinado em microscópio estereoscópico. Os helmintos encontrados foram coletados com auxílio de pincel de número 00, lavados em solução de cloreto de sódio a 0,85%, fixados em solução de A.F.A (álcool a 70° GL, 93%; formaldeído, 5%; ácido acético glacial, 2%) a quente e armazenados até o processamento para contagem e identificação. Adicionalmente, 10g de amostras de fezes frescas foram coletadas da ampola retal, colocadas em frascos plásticos estéreis identificados, fixadas em formalina tamponada a 10% e armazenadas em temperatura ambiente até o momento da análise por meio de técnicas laboratoriais coproparasitológicas.

Um fragmento do intestino delgado (jejuno) e grosso (ceco) foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10% para posterior realização das técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica. Adicionalmente, amostras de linfonodo poplíteo, medula óssea e baço foram coletadas de forma estéril para realização da técnica de cultura parasitológica, seguida da técnica de eletroforese de enzimas multilocus, para isolamento e identificação da espécie *L. infantum*.

4.3 Hemograma completo

Foram realizados como exames complementares o hemograma, plaquetograma e leucograma a fim de avaliar as alterações celulares sanguíneas dos cães estudados. As amostras de sangue foram avaliadas no equipamento Sysmex Poch-100iv DiffTM (Sysmex, Kobe, Japão). Adicionalmente, foi realizada a leucometria específica dos cães, por meio de leitura de lâminas de esfregaço sanguíneo coradas pelo método panótico rápido (IB Laborclin Ltda,

Paraná), no qual é utilizado coloração do tipo Romanowsky, em microscópio ótico na lente objetiva de 40X.

4.4 Exame coproparasitológico

Para detecção e identificação de ovos dos helmintos nas amostras de fezes coletadas a partir da ampola retal, foram realizadas as técnicas coproparasitológicas de Fulleborn, Ritchie modificado e Gordon & Whitlock (MATTOS JR; MOTTA, 1996; YOUNG et al., 1979).

Para a técnica de flutuação de Fullerborn, as fezes foram emulsionadas em solução saturada de açúcar a uma densidade de 1,260 g/ml. Em seguida foi realizado o processo de tamisação com auxílio de uma peneira e gaze (em duas camadas). A amostra obtida após a tamisação foi adicionada a um tubo Erlenmeyer de 100 ml até a formação de um disco ascendente na boca do recipiente. Após 20 minutos, foi coletada uma gota do sobrenadante e esta foi alocada entre uma lâmina e uma lamínula e levada ao microscópio ótico com objetiva de 10 a 40 vezes, buscando-se por ovos de helmintos (HOFFMANN, 1987; MATTOS JR; MOTTA, 1996).

Para a técnica de sedimentação de Ritchie modificado, 1g de fezes foi homogeneizado em formol tamponado a 10%. Em seguida, foi realizado o processo de tamisação com auxílio de uma peneira e gaze (em quatro camadas). Um volume de 10 ml da amostra obtida após a tamisação foi adicionado a um tubo de centrifuga graduado e com fundo cônico de 15 ml. Foi adicionado a esse tubo 3 ml de acetato de etila P.A. e o conteúdo do tubo foi agitado vigorosamente para homogeneização. Na etapa seguinte, o tubo foi centrifugado a 1.500 rpm por 2 minutos e, em seguida, foram desprezadas as três camadas superiores que se formaram no processo de centrifugação. Uma gota do sedimento foi transferida a uma lâmina, coberta com uma lamínula e analisada ao microscópio ótico com objetiva de 10 a 40 vezes, para busca por ovos de helmintos (YOUNG et al., 1979).

Na técnica de contagem de ovos (Gordon & Whitlock), 2 g de fezes foram homogeneizadas em 58 ml de solução saturada de açúcar com densidade de 1,260 g/ml. Em seguida foi realizado processo de tamisação com auxílio de uma peneira e gaze (em quatro camadas). Uma pequena quantidade da amostra obtida após a tamisação foi retirada com pipeta e usada para preencher as duas áreas da câmara Mc Master. Após 2 minutos, foi realizada a contagem dos ovos usando microscópio ótico na objetiva de 40X. O número de ovos de helmintos observados nas duas câmaras foi somado e o resultado multiplicado por 100 para

obtenção do número de ovos por grama de fezes (OPG) (MATTOS JR; MOTTA, 1996). A partir das contagens, os animais foram considerados como tendo alta carga de ovos (>500 OPG), moderada (100-500 OPG) e baixa (<100 OPG) (LAU, 2005).

4.5 Quantificação, processamento e identificação dos helmintos

Os helmintos coletados do duodeno até o final do intestino grosso e fixados em solução de A.F.A a quente foram colocados em placas de Petri e contados com auxílio de microscópio estereoscópico. Para identificação, os helmintos foram corados pelo carmim alcoólico clorídrico de Langeron, diferenciados no ácido acético 0,5%, para remoção do excesso de corante, desidratados em série alcoólica (70°,80°,90° e 100° GL), clarificados em fenol ou creosoto e preservados em bálsamo do Canadá segundo Amato (1985). Com base em análise morfométrica utilizando microscópio óptico equipado com micrômetro ocular, foi feita a identificação dos nematoides de acordo com Vicente et al. (1997) e dos cestoides de acordo com Khalil, Jones e Bray (1994). Foi realizada a contagem de cada espécie de helminto encontrada por cão, para quantificação da carga parasitária, que foi levada em conta para o cálculo da carga parasitária média e da quantidade média de infecção.

Para identificação das espécies de ancilostomídeos, observou-se a região anterior onde foram contados os pares de dentes na cápsula bucal. O ancilostomídeo que possuía três pares de dentes foi identificado como *Ancylostoma caninum* e, se possuía um par de dentes, foi classificado como *Ancylostoma braziliense* (VICENTE et al., 1997).

Para identificação das espécies de cestóide, observou-se o comprimento e largura do corpo, morfometria dos órgãos do trato genital feminino (vitelária e ovários) e masculino (testículos e cirro) nos proglotes maduros e morfologia do escólex. Foram identificados como *D. caninum* os cestóides com comprimento de 15-40 cm, que possuíam: escólex de formato cônico com quatro ventosas contendo um rostelo retrátil armado com anéis de pequenos ganchos em forma de espinho de rosa; proglotes maduros com dois poros genitais, um no meio de cada margem lateral e possuindo em seu interior o aparelho reprodutor masculino (testículos) e feminino (ovários, útero reticulado, vagina); proglotes gravídicos contendo cápsulas ovígeras (KHALIL; JONES; BRAY, 1994).

Para identificação dos ascarídeos encontrados, foram examinadas principalmente a região anterior e posterior dos nematoides. Caso o nematoide possuísse na região anterior asa cervical em forma de cabeça de seta e esôfago terminando em bulbo esofágico e espículos subiguais alados foi classificado no gênero *Toxocara*. Se o nematoide apresentasse na

região anterior asa cervical em forma de lança, esôfago sem bulbo esofágico e espículos subiguais não alados, foi classificado no gênero *Toxascaris*. Para diferenciação das espécies do gênero *Toxocara*: *T. canis* e *T. cati*, foram medidos os espículos dos machos. Os espículos dos machos da espécie *T. canis* medem de 0,75 a 0,95 mm de comprimento e os espículos da espécie *Toxocara cati* medem de 1,7 a 1,9 mm de comprimento (VICENTE et al., 1997).

Para identificação das espécies de tricurídeos parasitos de cães: *T. vulpis* e *T. serratus* foram medidos os espículos dos machos. O espículo único dos machos de *T. vulpis* mede de 9 a 11 mm, enquanto o espículo único do macho de *T. serratus* mede 1,2 mm (VICENTE et al., 1997).

Os índices ecológicos avaliados foram a carga média parasitária, prevalência, intensidade de infecção, abundância média a amplitude de variação. A carga média parasitária foi calculada pela média aritmética do número de helmintos encontrados. A prevalência foi calculada pelo número de cães infectados por um ou mais indivíduos de uma espécie de helminto sobre o número de cães analisados, multiplicado por 100. A intensidade de infecção foi calculada pelo número de indivíduos de uma determinada espécie de parasito em um único hospedeiro infectado. A abundância média foi calculada pelo número total de indivíduos de uma espécie de parasito em uma amostra de uma espécie hospedeira divididas pelo número total de hospedeiros da espécies estudada (incluindo animais infectados e não infectados). A amplitude de variação é a variação entre a carga parasitaria mínima e máxima de um determinado parasito. (BUSH et al.,1997)

Para avaliação da diversidade de parasitismo por helmintos intestinais, os cães foram classificados em: não parasitados, quando não apresentaram helmintos intestinais; monoparasitados, quando apresentaram somente uma espécie de helminto intestinal; e poliparasitados, quando apresentaram mais de uma espécie de helminto intestinal.

Os cães também foram alocados em dois grupos de comparação de acordo com a presença ou não de helmintos intestinais. O grupo dos cães coinfectados por *L.(L.) infantum* e helmintos (n=22) e o grupos de cães monoinfectados pelo protozoário (n=19).

4.6 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica

As técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica foram realizadas no Serviço de Anatomia Patológica do INI/ Fiocruz.

4.6.1 Histopatologia

Os fragmentos de intestino coletados para histopatologia foram clivados e emblocados em parafina. Cortes de 5 μm de espessura foram realizados nos blocos parafinados por meio de micrótomo e colocados em lâminas, para serem corados pela hematoxilina-eosina (HE) (CARSON; CAPPELANO, 2015).

4.6.2 Avaliação das alterações histológicas em jejuno e ceco

Nos tecidos, o infiltrado inflamatório foi classificado em granulomatoso, quando apresentou predomínio de macrófagos e não granulomatoso, quando houve predomínio de outras células inflamatórias (ACKERMANN, 2017). O infiltrado inflamatório não granulomatoso foi classificado como linfoplasmocitário, composto predominantemente por linfócitos e plasmócitos.

4.6.3 Imuno-histoquímica (IHQ) para diagnóstico de *Leishmania* spp.

Foram feitos cortes histológicos seriados de 5 μm de espessura nos blocos de parafina, que foram colocados em lâminas sinalizadas. Esses cortes foram processados de acordo com o protocolo de Oliveira et al. (2017). Resumidamente, esses cortes foram submetidos inicialmente à desparafinização em xilol, seguida de reidratação em concentrações decrescentes de etanol, sendo a água destilada o último banho. Após essas etapas, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena por meio da imersão dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio a 3% e metanol (45 ml de peróxido de hidrogênio e 55ml de metanol), por 40 min e à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e submetidos à etapa de recuperação antigênica. A recuperação do antígeno dos cortes foi realizada em tampão de citrato de sódio, pH 6,0, a 65 ° C por 30 minutos em banho-maria. A seguir, para bloqueio da ligação inespecífica às proteínas, os cortes foram incubados em Lab Vision™ Ultra V Block (Thermo Fisher Scientific, Cheshire, Reino Unido). Após o bloqueio, os cortes foram incubados durante a noite, a 4 °C, com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* diluído a 1: 500. O kit de detecção por polímeros HiDef Detection™ HRP Polymer System (Cell Marque, EUA) foi utilizado para a detecção de *Leishmania* de acordo

com as recomendações do fabricante. O cromógeno-substrato utilizado na reação de revelação foi a diaminobenzidina (DAB) associada ao peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich, EUA). Nos casos positivos, as formas amastigotas são marcadas em castanho. A contra-coloração foi feita com hematoxilina modificada de MEYER (Thermo Scientific, EUA) por 2 minutos. Cortes histológicos de tecidos intensamente parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* foram incubados com soro homólogo não-imune como controle negativo e com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* como controle positivo.

4.7 Cultura parasitológica para diagnóstico de *L. infantum*

Para realização da cultura parasitológica, as amostras de linfonodo foram mergulhadas imediatamente após coletada, em solução salina, e o aspirado medular alocado em tubo estéril contendo EDTA. Essas amostras foram enviadas para o laboratório de Vigilância em Leishmanioses/INI, onde foram semeadas em meio de cultura bifásico NNN (Novy, Mac Neal e Nicolle) / Schneider Medium Insect (Sigma-AldrichCo. St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino e incubadas a 26-28 °C. As formas promastigotas de *Leishmania* spp. isoladas foram identificadas por eletroforese enzimática multilocus, utilizando cinco sistemas enzimáticos (CUPOLILLO; BOITÉ; PORROZZI, 1994).

4.8 Análise estatística

Os dados analisados foram armazenados em Excel® e analisados usando o pacote estatístico R versão 3.6.2 (R Core Team, 2019) através da interface R Studio versão 1.2 (R Studio Team, 2019). Foram descritas frequências simples dos sinais clínicos, presença de alterações hematológicas, positividade para helmintos e *L. infantum* e alterações histológicas intestinais. Para avaliação da carga parasitária de helmintos intestinais foram calculados a mediana, valores mínimos e máximos de cada espécie de helminto encontrada. Os valores de OPG e carga parasitária foram convertidos a logarítmicos naturais (de 10) +1 por conta de alguns resultados terem sido “0”. Para a análise valores de OPG e carga parasitaria em comparação com demais variáveis foi feita uma análise de correlação não paramétrica utilizando o coeficiente de correlação de Spearman rho e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para uma segunda comparação das amostras. Para comparar a mediana do número de hemácias e leucócitos obtidos no hemograma completo, entre os cães coinfectados por helmintos e

aqueles monoinfectados por *L. (L.) infantum*, bem como verificar associação de sinais clínicos, as alterações histológicas e positividade de *Leishmania* nos intestinos pela IHQ entre os grupos de cães mono e coinfectados foi realizado o Teste Qui-quadrado de Pearson com correção de continuidade e o Teste Exato de Fisher . Associações foram consideradas significativas quando $p < 0.05$ (PETT, 2016).

5 ASPECTOS ÉTICOS

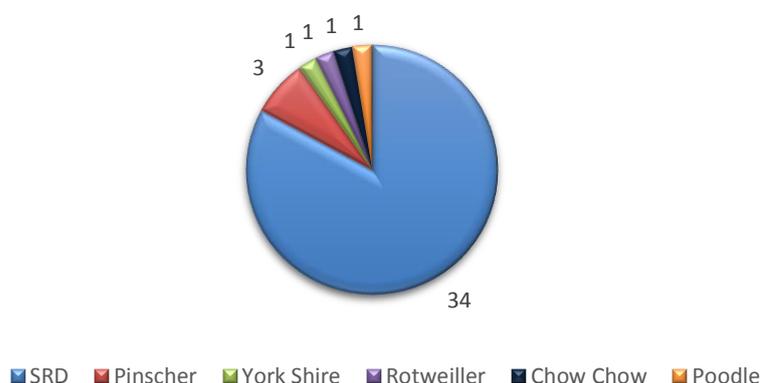
Todos os procedimentos realizados nos cães foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Fiocruz), licença LW-24/17.

6 RESULTADOS

6.1 População do estudo

Foram incluídos no estudo 41 cães, sendo 22 cães do sexo feminino e 19 cães do sexo masculino. Em relação à raça dos cães, houve uma frequência de 83% sem raça definida e 17% com raça definida (Figura 11). Os valores mínimo e máximo de idade foram, respectivamente, 9 e 96 meses de vida. A média da idade foi de 44 meses.

Figura 11- Distribuição das raças em cães soropositivos para *L. (L.) infantum*, fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).



6.2 Sinais Clínicos

Dentre os 19 cães monoinfectados pelo protozoário, sete (36,8%) apresentaram poucos sinais clínicos, dez (52,6%) tinham muitos sinais e dois (10,5%) apresentavam-se sem sinais clínicos. No grupo dos 22 cães coinfectados, dezesseis (72,7%) apresentaram muitos sinais clínicos, cinco (22,7%) poucos sinais clínicos, e um (4,5%) sem sinal clínico. Na tabela 1, é possível observar as frequências dos diferentes sinais clínicos em ambos os grupos. A diferença entre ambos os grupos quanto às frequências e quantidade de sinais clínicos não foi significativa estatisticamente ($p < 0.5$).

Tabela 1 - Sinais clínicos de leishmaniose visceral zoonótica em cães soropositivos para *L. (L.) infantum*, coinfectados ou não por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Sinais clínicos	Monoinfectados por <i>L. infantum</i> (N=19)		Coinfectados por helmintos e <i>L. infantum</i> (N=22)	
	n	%	n	%
Esplenomegalia	11	57,8	12	54,5
Caquexia	7	36,1	9	40,9
Onicogribose	5	26,3	8	36,4
Desidratação	4	21	3	13,6
Hepatoesplenomegalia	2	11,8	7	31,8
Descamação furfurácea	6	31,6	9	40,9
Adenite regional	5	26,3	8	36,4
Alopecia local	2	11,8	4	18,1
Lesão cutânea local	4	21	3	13,6
Lesão cutânea generalizada	3	15,8	3	13,6
Úlcera crostosa	3	15,8	2	9,1
Ceratoconjuntivite	2	11,8	1	4,5
Mucosas hipocoradas	3	15,8	4	18,1
Adenite generalizada	1	5,7	2	9,1
Epistaxe	1	5,7	0	0
Icterícia	1	5,7	0	0

N, número total de cães por grupo; n, número de cães com sinal clínico; %, porcentagem de frequência do sinal clínico.

6.3 Quantificação, processamento e identificação dos helmintos

Um total de 22 (53,6%) cães soropositivos para *L. (L.) infantum* incluídos nesse estudo apresentavam-se coinfectados por algum tipo de helminto intestinal. As espécies de helmintos encontradas durante a identificação foram *Ancylostoma caninum* (Figuras 12 e 13), *Ancylostoma brasiliense* (Figuras 12 e 14), *Dipylidium caninum* (Figura 15), *Trichuris vulpis* (Figuras 12 e 16) e *Toxocara canis* (Figuras 12 e 17). A frequência de positividade destes helmintos é mostrada na Tabela 2-

Na Tabela 3 é possível observar a carga parasitária média, prevalência, intensidade média, abundância média e amplitude de variação das espécies de helmintos encontradas nos cães analisados. As frequências de positividade de monoparasitismos e poliparasitismos das espécies de helmintos encontrados estão evidenciadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 2: Frequência das diferentes espécies de helmintos nos cães coinfetados por helmintos e *L. (L.) infantum*. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Helmintos	Frequência (N=22)	
	n	%
<i>Ancylostoma</i> spp.	14	63,3
<i>Dipylidium caninum</i>	13	59,1
<i>Trichuris vulpis</i>	8	36,4
<i>Toxocara canis</i>	3	13,6

N número total de cães parasitados; n número de animais; %, porcentagem.

Tabela 3: Carga parasitaria média, prevalência, intensidade média de infecção, abundância média e amplitude de variação de helmintos em cães soropositivos para *L. infantum*. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Helmintos	Prevalência (%)	Carga parasitaria média	Intensidade média de infecção	Abundância média na população	Abundância média nos parasitados	Amplitude de variação
<i>A. caninum</i>	31,7	10,7	17,2	6,3	11,7	1-89
<i>A. braziliense</i>	2,4	0,3	7,0	0,2	0,3	7
<i>D. caninum</i>	31,7	23,1	39,1	12,4	23,1	1-231
<i>T. vulpis</i>	19,5	13,0	40,8	7,0	13,0	2-82
<i>T. canis</i>	7,3	1,8	9,5	0,9	1,7	1-22

Tabela 4: Frequência de monoparasitismo helmíntico nos cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Monoparasitismo por helmintos (N=11)	Frequência (N=11)	
	n	%
<i>Ancylostoma</i> spp.	4	36,4
<i>T. vulpis</i>	1	9,1
<i>D. caninum</i>	6	54,5
<i>T. canis</i>	0	0

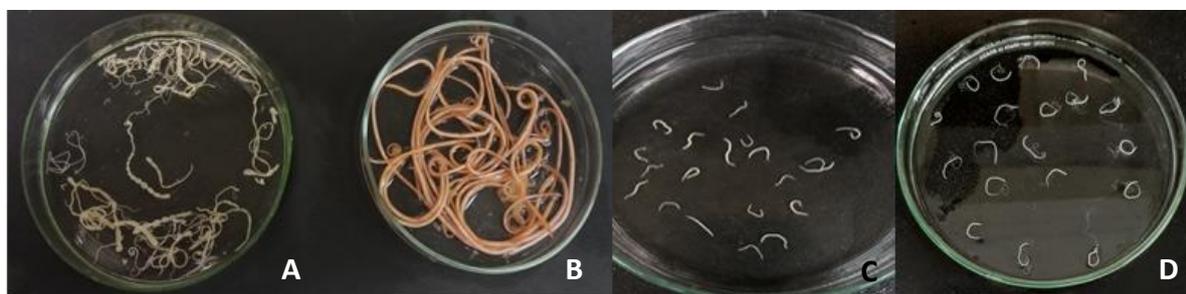
N, número total; n, número de animais; %, porcentagem.

Tabela 5: Frequência de poliparasitismo helmíntico nos cães soropositivos para *L. (L.) infantum*. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Poliparasitismo por helmintos (N=11)	Frequências (N=11)	
	N	%
<i>Ancylostoma</i> sp. + <i>T. vulpis</i>	3	27,2
<i>Ancylostoma</i> sp.+ <i>D. caninum</i>	3	27,2
<i>T. vulpis</i> + <i>D. caninum</i>	1	9,1
<i>T. vulpis</i> + <i>D. caninum</i> + <i>Ancylostoma</i> sp.	1	9,1
<i>Ancylostoma</i> sp. + <i>D. caninum</i> + <i>T. canis</i>	1	9,1
<i>T. vulpis</i> + <i>D. caninum</i> + <i>T. canis</i>	1	9,1
<i>D. caninum.</i> + <i>Ancylostoma</i> spp.+ <i>T. vulpis</i> + <i>T. canis</i>	1	9,1

N, número total de cães poliparasitados por helmintos; n, número de cães parasitados; %, porcentagem de cães parasitados.

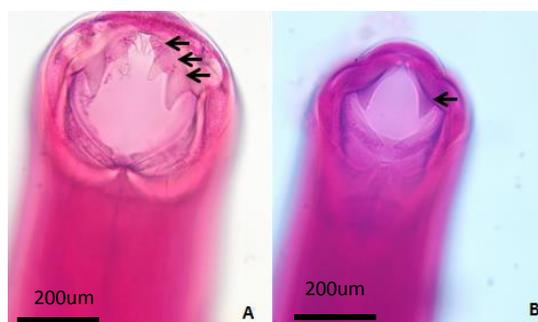
Figura 12 - Achados de necropsia em intestino de cães soropositivos para *Leishmania (Leishmania) infantum*.



Legenda: (A) *Dipylidium caninum*, (B) *Toxocara canis*, (C) *Ancylostoma* sp. e (D) *Trichuris vulpis*.

Fonte: Próprio autor.

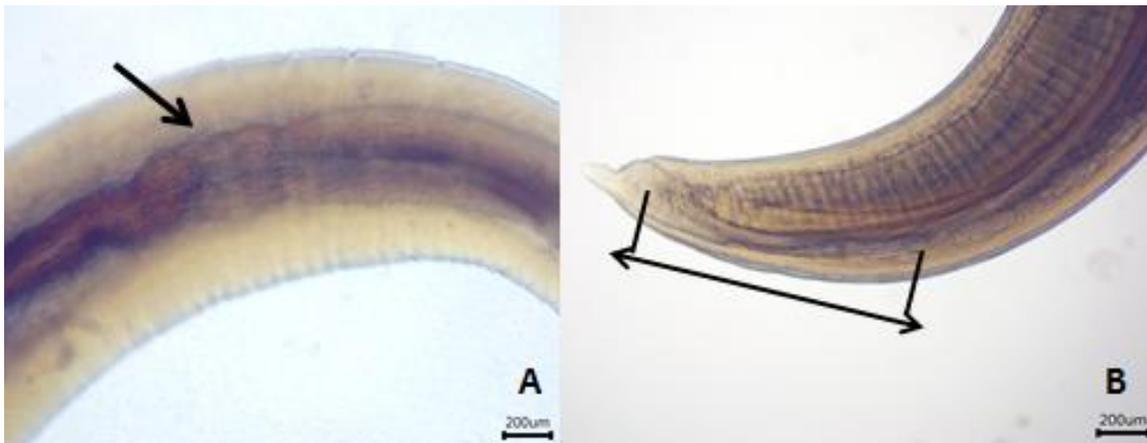
Figura 13 - Cápsula bucal de *Ancylostoma* spp. de espécimens desse nematoide encontrados em cães soropositivos para *L. (L.) infantum*.



Legenda: (A) Cápsula bucal de *Ancylostoma caninum*, apresentando 3 pares de dentes (setas pretas). (B) Cápsula bucal de *Ancylostoma brasiliense*, apresentando 1 par de dentes (seta preta). Objetiva de 40 x.

Fonte: Próprio autor.

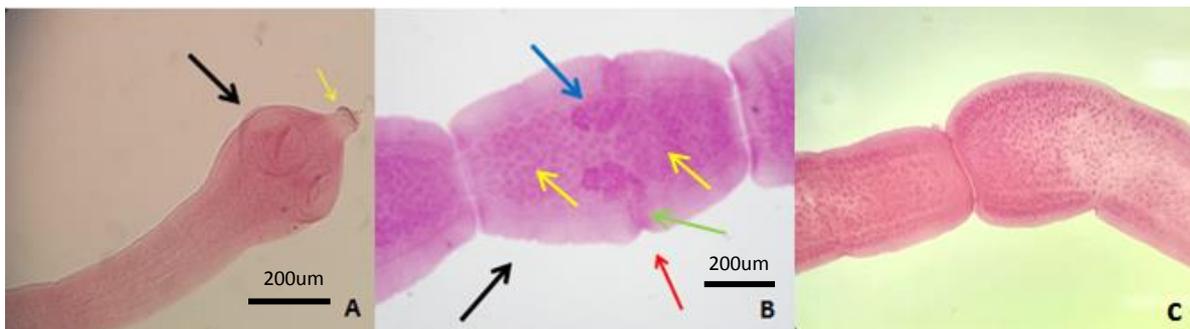
Figura 14 – Características morfológicas de espécimens do nematoide *Toxocara canis* encontrados em cães soropositivos para *L. (L.) infantum*.



Legenda: (A) Região anterior evidenciando bulbo esofágico (seta preta); (B) Região posterior de *T. canis* evidenciando espículo (linhas pretas).

Fonte: Próprio autor

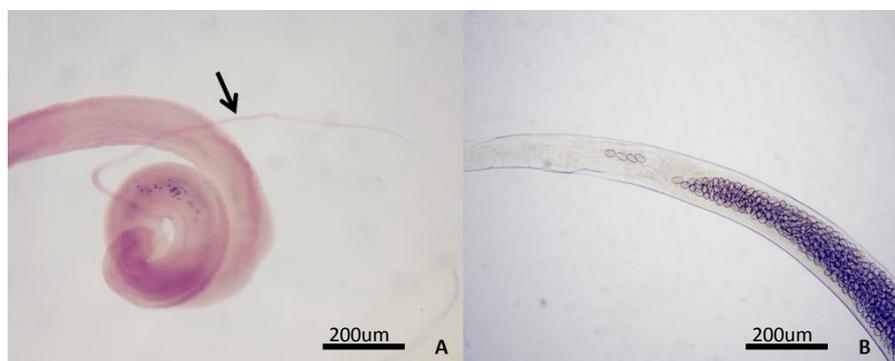
Figura 15- Características morfológicas de espécimens do cestóide *Dipylidium caninum* encontrados em cães soropositivos para *L. (L.) infantum*.



Legenda: (A) Escólex apresentando ventosas (seta preta) e rostelo evaginado com ganchos (seta amarela) Microscópio óptico na objetiva de 10x. (B) Proglote madura (seta preta) evidenciando poro genital (seta vermelha), ovários (seta azul), cirro (seta verde) e testículos (setas amarelas). Microscópio óptico na objetiva de 10x. (C) Proglote gravídico com capsulas ovíferas em seu interior. Microscópio estereoscópico na objetiva de 10x.

Fonte: Próprio autor.

Figura 16- Características morfológicas de espécimes do nematoide *Trichuris vulpis* encontrados em cães soropositivos para *L. (L.) infantum*.

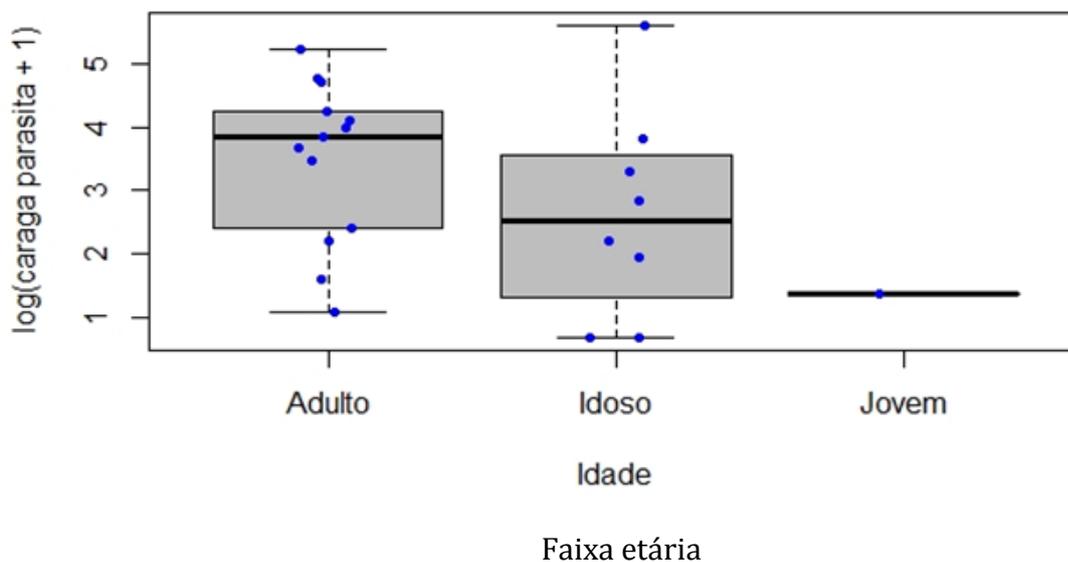


Legenda: (A) Região posterior do macho apresentando espículo exposto de 10 mm (seta preta). (B) Região posterior da fêmea revelando ovos no interior do trato reprodutivo. Objetiva de 5x.

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 17 é possível observar a relação entre idade e carga parasitária dos animais coinfectados. Foram observados 27 cães adultos, 12 cães idosos e 2 jovens. Não foi significativa a relação entre idade e carga parasitária (p -valor = 0.6797) segundo o teste de soma de postos de Wilcoxon com correção de continuidade.

Figura 17 –Gráfico em boxplot da relação carga parasitária e faixa etária dos cães coinfectados por *L. (L.) infantum*, entre fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).



6.4 Exames coproparasitológicos

O teste de Fulleborni, assim como o Gordon & Whitlock, apresentaram uma sensibilidade para detecção dos ovos de 90%, já no teste de Ritchie foi de 78%. As frequências de positividade de cada técnica para cada espécie de helminto encontrada no exame coproparasitológico em comparação com a necropsia, encontram-se na Figura 18. Na tabela 6 é possível observar a positividade e correlação entre as técnicas de flutuação e sedimentação em ambos os grupos.

Figura 18 – Frequência de positividade dos exames parasitológicos em cães infectados por *L.(L.) infantum*, fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)

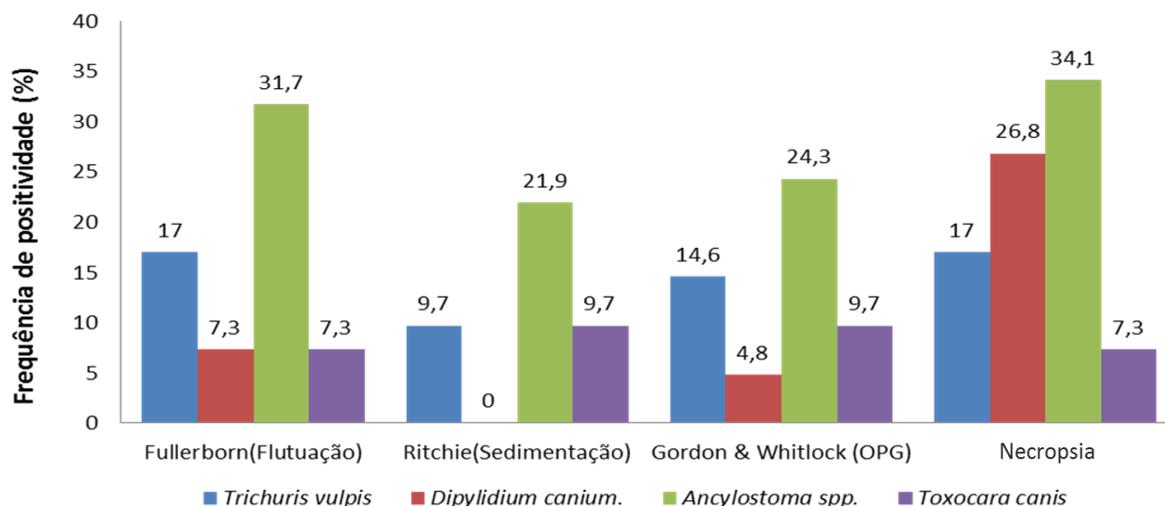
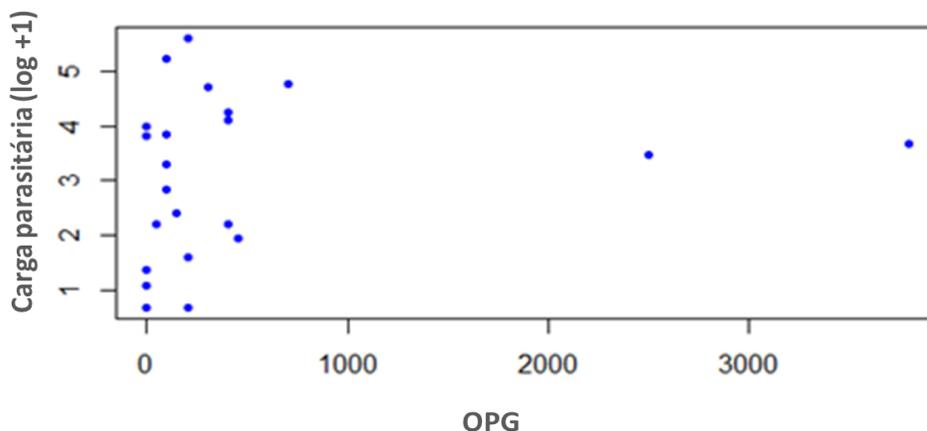


Tabela 6 – Positividade das técnicas de Fulleborn e Ritchie nas amostras fecais de cães coinfectados por *L. infantum* e helmintos, fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Fulleborn	Ritchie		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	15	4	19
Negativo	1	16	17
Total	16	20	36

Os resultados quanto a dispersão do número de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG), obtidos pela técnica de Gordon e Whitlock, e do número de helmintos recuperados na necropsia encontram-se na Figura 19 (p-valor = 0.1718). É possível observar uma carga parasitária mais elevada em cães que apresentavam contagem de ovos por grama de fezes mais elevada.

Figura 19 – Dispersão entre as cargas parasitárias e o OPG dos cães coinfectados por *L.(L.) infantum* e helmintos, fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)



6.5 Hemograma completo

Dentre as alterações hematológicas, 92,7 % dos cães deste estudo apresentaram anemia. No grupo monoinfectado, a frequência de anemia foi de 89,5% e no grupo coinfectado a frequência foi de 95,5%. (Tabela 7). A mediana em relação ao número de eritrócitos nos cães monoinfectados foi de 4.100.000/mm³, o valor máximo foi de 5.670.000/mm³ e o valor mínimo foi de 416.000 /mm³. No grupo dos cães coinfectados, a mediana da contagem de eritrócitos foi de 4.065.000/mm³, com valor máximo de 6.050.000/mm³ e o valor mínimo de 133.000/mm³. Na comparação da mediana do número de eritrócitos entre os grupos monoinfectados e coinfectados não houve diferença estatisticamente significativa (p= 0,4046507).

Tabela 7 - Alterações no hemograma dos cães soropositivos para *L. (L.) infantum*, mono e coinfectados por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Alterações no hemograma	Monoinfectados por <i>L. infantum</i> (N=19)		Coinfectados por helmintos e <i>L. infantum</i> (N=22)	
	n	%	n	%
Anemia normocítica normocrômica	10	53,0	15	63,6
Anemia normocítica hipocrômica	3	15,8	2	9,1
Anemia microcítica normocrômica	3	15,8	2	9,1
Anemia microcítica hipocrômica	1	5,7	1	4,5
Anemia macrocítica hipocrômica	0	0	1	4,5
Sem alterações	2	10,5	1	4,5

N, número total; n, número de animais; %, porcentagem.

A frequência de trombocitopenia na população estuda foi de 65,8%. Na Tabela 8, são descritas as frequências de trombocitopenia em ambos os grupos. A mediana, valor máximo e valor mínimo absoluto do número de plaquetas no grupo de cães mono infectados foram de 91.000/ μl , 302.000/ μl e 8.000/ μl respectivamente. Para grupo dos cães co infectados, esses valores foram de 154.000/ μl , 459.000/ μl e 17.800 / μl . Na comparação entre a mediana do número de plaquetas entre os grupos mono infectados e co infectados não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,5570521$)

Tabela 8- Plaquetometria de cães soropositivos para *L. (L.) infantum*, mono e co infectados por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)

Plaquetometria	Cães mono infectados por <i>L. infantum</i> (N=19)		Cães co infectados por helmintos e <i>L. infantum</i> (N=22)	
	N	%	N	%
Trombocitopenia	15	78,9	12	54,5
Sem alteração plaquetária	4	21,1	10	45,4

N, número total; n, número de animais; %, porcentagem.

No leucograma, as frequências de alterações no grupo dos cães co infectados e mono infectados foram de 90,1% e 73,7%, respectivamente. Foram 5 animais sem alteração no leucograma no grupo de cães mono infectados e 2 no grupo de cães co infectados (Tabela 9). O valor da mediana, valor máximo e valor mínimo da leucometria geral (em valores absolutos) no grupo de cães mono infectados foi de 8.350/ μl , 13.100/ μl e 2.000/ μl , respectivamente. No grupo dos cães mono infectados, esses valores foram de 9.300/ μl , 31.400/ μl e 1.300 / μl . Na comparação entre os valores de leucometria global entre os grupos mono infectados e co infectados não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0.54$)

Tabela 9 - Leucograma de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, mono e coinfectados por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Alterações no Leuco-grama	Monoinfectados por <i>L. infantum</i> (N=19)		Coinfectados por helmintos e <i>L. infantum</i> (N=22)		P-valor
	n	%	n	%	
Leucopenia	2	10,5	4	18,2	0,36
Leucocitose	2	10,5	0	0	
Linfopenia	9	47,3	9	41,0	0,61
Linfocitose	0	0	2	9,0	
Eosinofilia	0	0	3	13,6	0,41
Monocitose	1	5,3	4	18,2	0,64
Monocitopenia	1	5,3	0	0	
Neutrofilia	3	15,8	2	9,0	0,26
Neutropenia	1	5,3	3	13,6	
Sem alteração	5	26,3	2	9,0	

N, número total; n, número de animais; %, porcentagem.

6.6 Achados histopatológicos

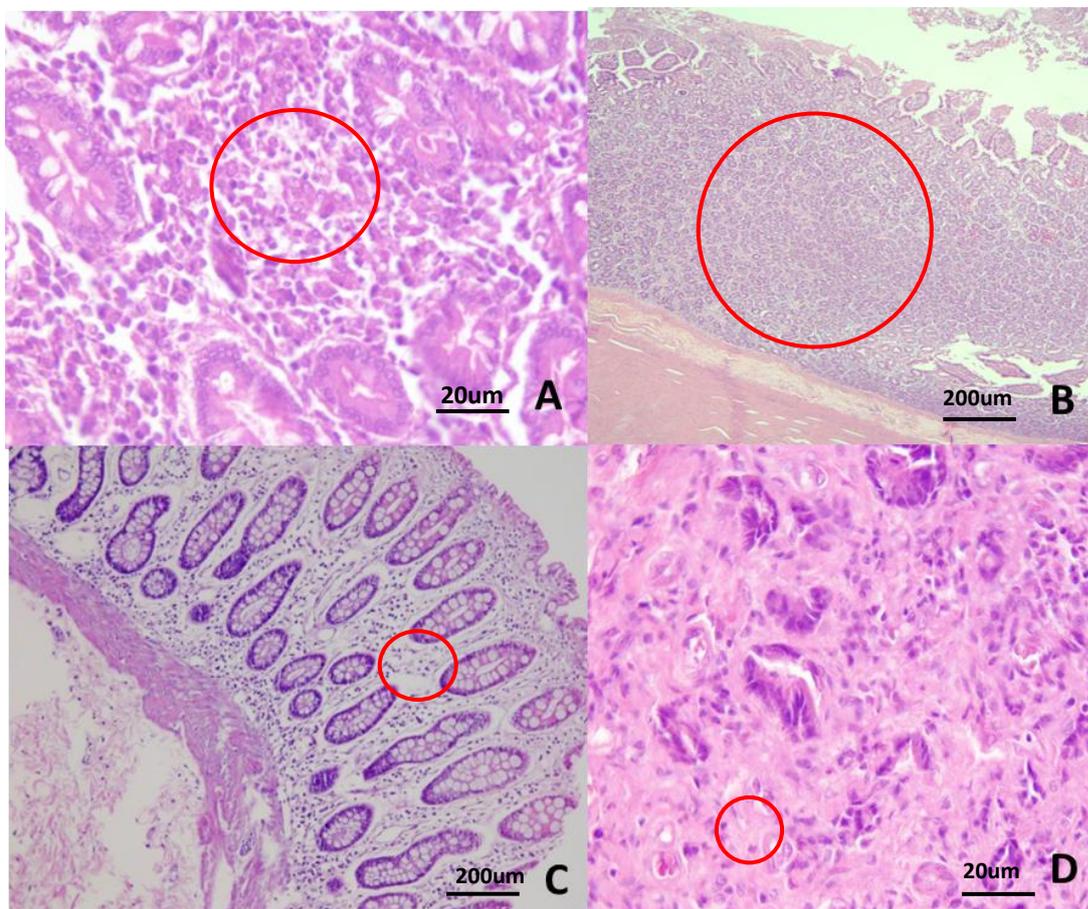
Reações inflamatórias do tipo não-granulomatosa e granulomatosa foram observadas em jejuno e ceco (figuras 20 e 21). A frequência de inflamação intestinal no grupo dos cães coinfectados foi de 69% e no grupo dos cães monoinfectados foi de 31%. Na comparação entre as frequências de inflamação intestinal entre os grupos monoinfectados e coinfectados, houve diferença estatisticamente significativa (p valor= 0,002). As alterações histológicas encontradas podem ser observadas na Tabela 10, juntamente as suas respectivas frequências. As alterações histológicas se concentravam principalmente na mucosa, lâmina própria e submucosa e menos frequente em muscular e serosa de ambos os segmentos intestinais analisados. No grupo dos cães coinfectados foi possível a observação de helmintos no corte histológico 8 cães, que esteve associada ao achatamento de vilosidades e a reação inflamatória próxima ao local de fixação do helminto na mucosa (Figura 21).

Tabela 10 - Alterações histológicas intestinais de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* coinfectados ou não por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)

Órgão	Alterações histológicas	Mono infectados (<i>Leish-</i> <i>mania</i> sp.)		Coinfectados (<i>Leishma-</i> <i>nia</i> sp. + Helmintos)	
		N= 19		N=22	
		n	%	n	%
Jejuno (N=40)	Inflamação não granulomatosa	7	36,8	13	59,1
	Atrofia de vilosidades	4	21	8	36,3
	Fibrose	4	21	6	27,3
	Hiperplasia glandular	3	15,8	5	22,7
	Inflamação granulomatosa	1	5,2	3	13,6
	Sem alteração	8	42,1	3	13,6
Ceco (N=38)	Inflamação não granulomatosa	6	31,5	12	54,5
	Hiperplasia glandular	0	0	5	22,7
	Atrofia glandular	2	10,5	3	13,6
	Fibrose	5	26,3	4	18,1
	Hiperplasia de tecido linfoide	4	26,3	2	9,1
	Atrofia de tecido linfoide	3	15,8	3	13,6
	Inflamação granulomatosa	1	5,2	2	9,1
	Sem alteração	6	31,5	2	9,1

N, número de amostras teciduais que foram examinadas; n, número de cães; %, porcentagem.

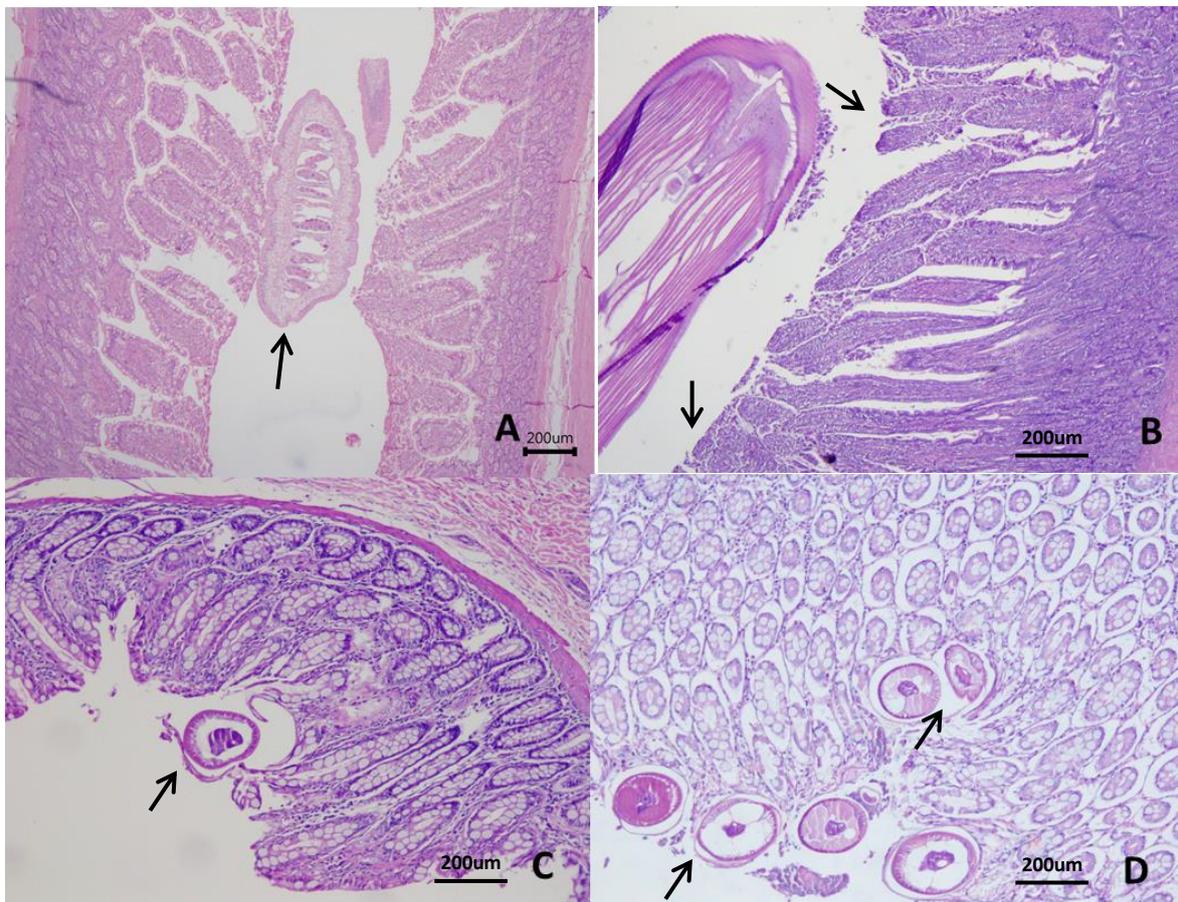
Figura 20- Alterações histológicas em jejuno e ceco de cães naturalmente monoinfectados por *L. (L.) infantum*.



Legenda: (A) Inflamação não granulomatosa com presença de infiltrado linfoplasmocitário (círculo vermelho) em mucosa de jejuno. Objetiva de 10x. HE. (B) Hiperplasia glandular em mucosa de jejuno (círculo vermelho). Objetiva de 4x. HE (C) Inflamação não granulomatosa em mucosa cecal com áreas de edema (círculo vermelho) e fibrose. Objetiva de 10X. HE. (D) Fibrose (círculo vermelho) e atrofia glandular em mucosa cecal. Objetiva de 40x.HE.

Fonte: Próprio autor.

Figura 21– Alterações histológicas em jejuno e ceco de cães coinfetados por *L. (L.) infantum* e helmintos.



Legenda: (A) *Dipylidium caninum* (seta) em luz intestinal de jejuno. (B) *Toxocara canis* em luz intestinal de jejuno, mucosa intestinal apresentando achatamento de vilosidade (seta preta). Objetiva de 4x. HE. (C) *Trichuris vulpis* (seta) inserido superficialmente na mucosa. Objetiva de 10x. HE. (D) Diversos espécimes de *T. vulpis* (setas) inseridos em mucosa cecal, que se encontrava hiperplásia. Objetiva de 10x. HE

Fonte: Próprio autor.

6.7- Identificação das amastigotas de *Leishmania* sp.

A frequência de positividade para formas amastigotas de *L. infantum* no intestino (jejuno mais ceco) pela técnica de imuno-histoquímica na população do estudo foi de 58,5%. No grupo dos cães monoinfectados, a frequência de positividade foi de 52,6%, já no grupo dos cães coinfetados a frequência de positividade foi de 63,6%. Na tabela 11, é possível identificar a positividade de acordo com cada segmento intestinal. Nos cães positivos na IHQ intestinal, as amastigotas foram observadas na mucosa (Figura 22) e/ou submucosa

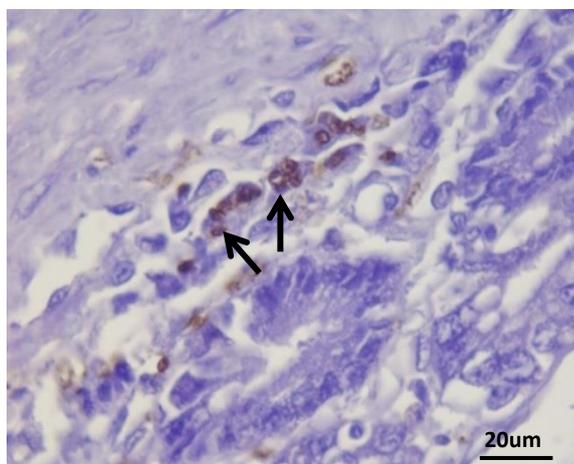
tanto no estudo imuno-histoquímico de jejuno como de ceco. Na comparação entre os valores de frequência de positividade na IHQ dos intestinos (jejuno e ceco) nos grupos mono e coinfectados, não houve diferença estatisticamente significativa (p valor= 0,7).

Tabela 11 - Estudo imuno-histoquímico do intestino delgado e grosso para detecção de amastigotas de *Leishmania* sp. de cães soropositivos para *L. (L.) infantum*, coinfectados ou não por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)

Órgão	IHQ	Monoinfectados por <i>L. (L.) infantum</i>		Coinfectados por <i>L. (L.) infantum</i> e helmintos		P- valor
		N=19		N=22		
		n	%	n	%	
Jejuno (N=41)	Positivo	6	31,6	4	18,2	0,83
	Negativo	13	68,4	18	81,8	
Ceco (N=41)	Positivo	7	36,8	11	50	0,64
	Negativo	12	63,1	11	50	

N, número de amostras teciduais que foram examinadas; n, número de cães; %, porcentagem.

Figura 22: Corte histológico de ceco mostrando formas amastigotas de *Leishmania* sp. coradas em castanho no interior de macrófagos (setas) da lâmina própria da mucosa, em área adjacente à muscular da mucosa, evidenciado pela técnica de IHQ. Objetiva de 100x.



As alterações histológicas intestinais de acordo com a detecção ou não de formas amastigotas de *Leishmania* spp., no jejuno e ceco, pela técnica de IHQ encontram-se descritas na Tabela 12. Na comparação entre os valores de frequência de positividade na IHQ dos

intestinos e as alterações histológicas, não houve diferença estatisticamente significativa (p valor= 0.71)

Tabela 12- Alterações histológicas intestinais em cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* de acordo com resultados de imuno-histoquímica para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp: Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Órgão	Alterações histológicas	Imuno-histoquímica para <i>Leishmania</i> sp.				P-valor
		Positivo		Negativo		
		n	%	n	%	
Jejuno (N=40)	Inflamação não granulomatosa	12	30	8	20	0,90
	Fibrose	4	10	4	10	0,77
	Inflamação granulomatosa	2	5	2	5	
	Hiperplasia glandular	7	17,5	5	12,5	0,80
	Sem alteração	2	5	9	22,5	
Ceco (N=38)	Inflamação não granulomatosa	12	31,6	0	0	0,15
	Hiperplasia glandular	3	7,9	19	50	0,21
	Atrofia glandular	6	15,8	1	2,6	
	Fibrose	8	21	3	7,9	0,81
	Hiperplasia de folículos linfoides	6	15,8	3	7,9	0,73
	Atrofia de folículos linfoides	6	15,8	1	2,6	
	Inflamação granulomatosa	4	10,5	0	0	
	Sem alteração	2	5,2	7	18,4	

N, número de amostras teciduais que foram examinadas; n, número de amostras teciduais na IHQ; %, porcentagem.

O jejuno de cães coinfectados apresentou uma frequência de positividade de 18,2% para amastigotas de *Leishmania* sp. pela IHQ e no ceco essa frequência foi de 50 %. Na tabela 13 é possível observar a frequência de positividade para *Leishmania* sp. em jejuno e ceco de acordo com o tipo de parasitismo helmíntico dos cães coinfectados. Entre os valores

de positivos na IHQ do jejuno e ceco e as alterações histológicas nesses segmentos intestinais, não houve diferença estatisticamente significativa (p valor= = 0,48)

Tabela 13 – Frequência de positividade para formas amastigotas de *Leishmania* spp. pela técnica de IHQ no jejuno e ceco de cães soropositivos *L. (L.) infantum*, de acordo com o tipo de parasitismo por helmintos. Fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Órgão	Imuno-histoquímica para <i>Leishmania</i> sp.	Tipo de parasitismo helmíntico				P-valor
		Cães monoparasitados		Cães poliparasitados		
		n	%	n	%	
Jejuno (N=21)	Positivo	2	9	3	14,3	0,72
	Negativo	9	42,9	7	33,3	
Ceco (N=21)	Positivo	5	26,3	7	36,9	0,28
	Negativo	6	31,6	3	15,8	

N, número de amostras teciduais que foram examinadas; n, número de cães parasitados; %, frequência.

6.8 Cultura parasitológica para diagnóstico de *L. infantum*

Os resultados da cultura parasitológica para diagnóstico de LVZ nos cães soropositivos para *L. (L.) infantum*, coinfectados ou não por helmintos está demonstrado na tabela 14. Entre as frequências de positividade para *L. infantum* em medula óssea e ou linfonodo pela cultura parasitológica e os grupos monoinfectados por *L. (L.) infantum* e coinfectado por *L. (L.) infantum* e helmintos, não houve diferença estatisticamente significativa (p valor= 0,08)

Tabela 14: Frequência de positividade em linfonodo e medula óssea pela cultura parasitológica em cães soropositivos para *L. (L.) infantum*, coinfectados ou não por helmintos, no período de fevereiro de 2018 a julho de 2019 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).

Cultura parasitológica para <i>Leishmania</i> (Medula óssea/ linfonodo) N=41	Tipo de parasitismo			
	Mono infectados (<i>Leishmania</i> sp.)		Coinfectados <i>Leishmania</i> sp. +helmintos)	
	n	%	n	%
Positivo	18	43,9	15	36,6
Negativo	1	2,4	7	17,1

N, número de amostras que foram examinadas; n, número de cães parasitados;%, frequência.

7 DISCUSSÃO

A prevalência de helmintos em cães no presente estudo foi superior a 50 %. Castro (2019) observou por meio de exames coproparasitológicos uma positividade de 65% (n = 30) de helmintos intestinais em cães soropositivos para *L. infantum*, sendo esse um resultado maior do que o observado no presente estudo. É importante ressaltar que a região de onde provinha a população estudada por Castro (2019) foi Fortaleza, CE. Brener et al. (2005) observaram uma prevalência de 33% de helmintos intestinais nos cães provindos do município do Rio de Janeiro, sendo um resultado inferior ao encontrado no presente estudo. Os cães analisados por Brener et al. (2005) não foram testados para LVC, como no presente estudo. Essa diferença de prevalência pode estar relacionada às diferentes regiões estudadas nos três estudos, bem como pelo fato de Brener et al. (2005) terem utilizado para o diagnóstico apenas técnicas coproparasitológicas, que possuem sensibilidade inferior à da necropsia. É importante ressaltar que os cães destes estudos eram domiciliados e, portanto, deveriam receber os cuidados básicos de saúde como tratamento anti-helmíntico pelo tutor. Portanto, como base nos resultados de prevalência obtidos, pressupõem-se que o esquema de tratamento anti-helmíntico não era realizado ou não de maneira correta.

Pelo fato da maioria dos cães desse estudo serem adultos e domiciliados, esperava-se uma prevalência baixa de cães infectados por helmintos, uma vez que helmintos são mais prevalentes em cães errantes e jovens (AHID et al. 2008; BALASSIANO, et al., 2009). Cães jovens, sobretudo os que tem até 3 meses de idade, são mais susceptíveis às helmintoses do que os adultos devido ao fato de não terem ainda adquirido imunidade e os adultos são menos predispostos devido à imunidade estabelecida pelas infecções anteriores (AHID et al. 2008; BALASSIANO, et al., 2009). Adicionalmente, os cães jovens já podem nascer infectados pela transmissão via transplacentária ou adquirem a infecção durante o aleitamento pela infecção transmamária (ARAÚJO, 1998; DESPOMMIER, 2003; FORTES, 2004). Entretanto, diferentemente desses autores, no presente estudo, não houve diferença estatística significativa entre a idade dos cães e a prevalência de helmintos. Houve mais cães adultos apresentando coinfeção por helmintos, porém o número de cães adultos recebidos neste estudo foi maior do que o de jovens, representando um viés. Outra hipótese é a de que a coinfeção por *L.(L.) infantum* tenha causado uma imunossupressão, deixando os cães adultos mais susceptíveis às helmintoses, como já foi sugerido para coinfeções de *L. infantum* com outros patógenos em cães (SARIDOMICHELASKIS et al., 2009; TOEPP et al., 2019)

Os cães deste estudo apresentaram como sinais clínicos mais frequentes a esplenomegalia e a descamação furfurácea, caquexia e adenite local, independentemente da coinfeção por helmintos intestinais. Uma das principais alterações em pacientes humanos infectados por *L. infantum* e coparasitados por helmintos ou monoparasitados pela *L. infantum* é a hepatoesplenomegalia (TAJEB et al., 2017). Camundongos BALB/c, coinfectados experimentalmente por *L. infantum* e *Trichinella spiralis* apresentaram como alteração clínica mais frequente a esplenomegalia (ROUSSEAU et al., 1997). Apesar das frequências dos tipos de sinais clínicos terem sido semelhantes entre cães coinfectados por helmintos e monoinfectados por *L. infantum*, no grupo de cães coinfectados a frequência de cães com muitos sinais clínicos foi mais alta se comparado ao grupo de cães monoinfectados, no presente estudo. Esses resultados sugerem uma possível relação dos helmintos com a gravidade da leishmaniose visceral canina corroborando com Toepp et al. (2019) e Castro (2019). Segundo Toepp et al. (2019), cães coinfectados com 2 ou mais patógenos (*Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* e *Bartonella* spp.) estavam associados a quadros clínicos mais intensos da LVC comparados a cães coinfectados com somente um dos patógenos. De acordo com Castro (2019), cães coinfectados por helmintos intestinais apresentaram mais sinais clínicos da LVC comparados aos cães não coinfectados. Entretanto, no presente estudo a associação da maior frequência de sinais clínicos da LVC em cães coinfectados por helmintos não foi comprovada estatisticamente, possivelmente pelo pequeno número de cães estudados nos grupos mono e coinfectados. O número elevado de animais com muitos sinais clínicos, no grupo de cães coinfectados, pode ter relação com a resposta imune destes animais em relação aos helmintos, na qual, animais sintomáticos podem apresentar uma imunomodulação para uma resposta Th2 na intenção de expulsar os helmintos (CORTÉS et al., 2017). Por sua vez, a resposta do tipo Th2 pode ter influenciado na manifestação clínica da leishmaniose visceral, já que animais infectados com *L. infantum* e que expressam uma resposta polarizada para Th2 são incapazes de obter a cura da doença protozoária (FALEIRO et al., 2014). O'Neal et al. (2007) observaram em humanos a relação da coinfeção entre leishmaniose tegumentar e helmintoses com as manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar, segundo esse autor, embora os pacientes coinfectados apresentassem lesões cutâneas principais menores, o seu tempo de cura era aproximadamente o dobro dos doentes monoinfectados pelo protozoário. Um estudo recente no Brasil (AZEREDO-COUTINHO et al., 2016) evidenciou que o parasitismo intestinal por helmintos está associado a formas mais graves da leishmaniose tegumentar, como a forma mucosa em humanos. Estes estudos

corroboram com a hipótese do presente trabalho, bem como os resultados observados de que a coinfeção aumenta a frequência de sinais clínicos.

Em relação aos helmintos encontradas em jejuno e ceco, o nematoíde *A. caninum* e o cestóide *D. caninum* foram os mais frequentes nos cães desse estudo, corroborando em parte com as pesquisas realizadas por outros autores (BRENER et al., 2005; EGUÍA-AGUILAR ; CRUZ-REYES; MARTÍNEZ-MAYA, 2005; TARANTO et al., 2000; VASCONCELLOS; BARROS; OLIVEIRA, 2006), nas quais os ancilostomídeos foram os principais causadores de infecção nos cães de todas as faixas etárias. Taranto et al. (2000) observaram que amostras fecais de cães que habitam área domiciliar e peridomiciliar do Chaco Salteño (Argentina), apresentam uma porcentagem de contaminação de quase 70% para *Ancylostoma* sp. e 17% para *T. canis*, indicando alta potencialidade de transmissão destas parasitoses ao homem. Eguía-Aguilar et al. (2005) observaram prevalência de parasitoses em cães vadios da Cidade do México, onde o *Ancylostoma caninum* em 75 (62,5%) animais e *T. canis* em 16 (13,3%) dos animais foram os mais prevalentes. Vasconcellos, Barros e Oliveira (2006) observaram uma prevalência de 34,8% de ovos de *A. caninum*, 8,8 % de ovos de *T. canis* (n=18;8,8%) e 3,4 % de ovos/capsulas ovígeras de *D. caninum* em amostras fecais de cães recolhidos no município do Rio de Janeiro. Brener et al. (2005), analisaram as fezes de cães provindos do município do Rio de Janeiro e verificaram que os ancilostomídeos foram os principais causadores de infecção nos cães de todas as faixas etárias (20,3%), seguido por *T. canis* em 7,1% das amostras de cães testadas. A segunda espécie mais encontrada (*T. canis*) nos estudos citados não corroboram com a segunda espécie mais frequente no presente estudo, que foi o *D. caninum*. O presente estudo analisou a frequência de helmintos tendo como padrão de análise a necropsia como Eguía-Aguilar, Cruz-Reyes e Martínez-Maya (2005). Por sua vez, Taranto et al. (2000) e Brener et al., 2014 analisaram essa frequência de acordo com técnicas coproparasitológicas, que subestimam a identificação do parasitismo por *D. caninum*, pois segundo Gennari et al. (1999) a observação da proglotes nas fezes ou identificação dos parasitos no intestino, é a melhor forma de diagnóstico desta helmintíase. Vasconcellos, Barros e Oliveira (2006) corroboraram com o presente estudo em relação à frequência de *A. caninum*, que foi o parasito mais prevalente em ambos os estudos.

Em relação às técnicas coproparasitológicas, a técnica de Fülleborn (flutuação) e Gordon Whitlock se mostraram as mais sensíveis para detecção de ovos de nematódeos e cápsulas ovígeras de *D. caninum*. A técnica de Ritchie modificada teve uma sensibilidade também alta e foi capaz de identificar uma amostra negativa no Fülleborn. As cápsulas ovígeras de *D. caninum* apresentaram menor frequência de positividade nas três técnicas copro-

parasitológicas. Segundo Gennari et al. (1999), a presença de cápsulas ovíferas nos exames coproparasitológicos é subestimada, pois o diagnóstico desta helmintíase é feito pelo encontro das proglotes em fezes frescas ou achados de parasitas adultos durante a necropsia e a eliminação de proglotes grávidos é irregular.

De forma semelhante ao presente estudo, a técnica de flutuação Willis & Mollay, mostrou uma sensibilidade maior se comparada as técnicas de sedimentação e contagem de ovos, no diagnóstico de ovos de *Ancylostoma* sp., *T. canis* e *Trichuris vulpis* nas fezes de cães domiciliados provindos do município de Araçatuba (São Paulo) (AMARANTE, 2006). Sumitomo (2010) também observou que para a detecção de ovos de *Ancylostoma* spp. e *T. canis*, os testes de flutuação (Willis Mollay e Faust) mostraram uma maior eficiência de detecção em relação ao teste sedimentação em amostras fecais de cães provindos do canil municipal de Jaboticabal (São Paulo). Esses resultados eram esperados, pois ovos leves são melhor identificados pelas técnicas de flutuação. Por sua vez, Tapáro et al. (2006) verificaram que na maioria dos casos de infecção por *Trichuris* spp., os ovos foram observados tanto por meio das técnicas de flutuação como de sedimentação. O observado no presente estudo corrobora com o resultado observado e discutido por Táparo et al. (2006), no qual recomenda-se a associação das técnicas coproparasitológicas de flutuação e sedimentação, visto que a técnica de sedimentação no presente estudo foi capaz de identificar uma amostra negativa na técnica de flutuação.

Não houve correlação do OPG com a carga de helmintos. O teste de Gordon & Whitlock foi um bom teste para avaliar a quantidade de ovos eliminados por grama de fezes, porém não é um bom indicador da quantidade de helmintos infectando o cão. Diferente de ruminantes, nos quais essa técnica mostra correlação diretamente proporcional (GORDON; WHITLOCK, 1939). As amostras evidenciaram números elevados de ovos e positividade no teste de flutuação nas amostras fecais de cães infectados por *T. canis*, seguidos por cães infectados por *Ancylostoma* spp., o que já era esperado pois as fêmeas destas espécies produzem uma quantidade grande de ovos (FORTES, 2004). Tal evidência demonstra um maior potencial de contaminação ambiental pelos ovos desses helmintos, que possuem potencial zoonótico, aumentando o risco dos humanos, ao entrarem em contato com o solo, adquirirem a infecção e evoluírem para os quadros de larva *migrans* cutânea e visceral- (MAGNAVAL, 2001; SANTARÉM; GIUFFRIDA; ZANIN, 2004; SILVA, 2015).

Os animais que apresentaram parasitismo por *D. caninum*, seguidos por *T. vulpis*, apresentaram valores mais elevados de carga parasitária média e intensidade média de infecção, porém as técnicas não mostraram boa sensibilidade na identificação destes helmintos.

Segundo Amarante (2006), a baixa sensibilidade no exame coproparasitológico e alta carga parasitaria média durante o parasitismo podem ser justificados por vários fatores como: formas imaturas dos parasitas, fase de não eliminação de ovos, espécie helmíntica envolvida no parasitismo assim como o ciclo do parasito, ausência de ovos naquela amostra coletada, gerando um exame coproparasitológico falso-negativo. Em relação a tais resultados, é recomendável a associação das técnicas bem como a observação das proglótides de *D. caninum* nas fezes para melhor diagnóstico das helmintíases em cães, conforme concluído por Taparo et al. (2006) e Ribeiro et al. (2015).

Neste estudo foi possível observar que a anemia normocítica normocrômica de caráter não regenerativo, foi o achado hematológico mais frequente tanto no grupo dos cães monoinfectados como no grupo dos cães coinfectados. Esse tipo de anemia e é um achado comumente relatado na LVC (PALTRINIERI et al., 2016), portanto provavelmente esteve relacionado à infecção por esse parasito no nosso estudo. Segundo Braga (2007) e Çelik et al. (2007), nos cães monoinfectados por *L. infantum*, o achado hematológico mais frequente é a anemia normocítica normocrômica não regenerativa. Segundo Costa-Val et al. (2007), a ausência de regeneração da anemia por leishmaniose visceral canina dar-se à pela infecção medular pelo parasito, o que leva a infiltração de linfócitos, plasmócitos e macrófagos nesse tecido, o que compromete a produção de eritrócitos. A anemia na LVZ também se dá pelo sequestro de ferro como nutriente para a multiplicação do parasita no meio intracelular. O sequestro de ferro pelas amastigotas intracelulares ocorre também para a posterior formação de promastigotas com capacidade infectante presente no hospedeiro invertebrado (MESQUITA – RODRIGUES et al., 2013). As helmintoses em cães também podem ocasionar anemia e até a morte de cães recém-nascidos. Porém, essa anemia é comumente regenerativa, do tipo normocítica hipocrômica, causada por deficiência ferropriva (URQUHART et al., 1998). Em cães adultos com helmintoses, as alterações hematológicas são mais brandas, como anemias leves, pois a resposta medular é capaz de compensar durante um período variável (BREMM, 2007). Em relação à hemoglobina, Castro (2019) verificou que grupo de cães coinfectados por *L. infantum* e helmintos apresentou valores abaixo dos valores normais para a espécie e houve diferença significativa para o grupo monoinfectado por helmintos ($p < 0,00004$). Entretanto, a autora desse estudo não mencionou o tipo e nem a frequência de anemia nos cães estudados. Esses resultados obtidos por Castro (2019) mostram que os dois tipos de parasitismo somados agravaram o estado anêmico e corroboraram para os dados observados no presente estudo, no qual a frequência de anemia normocítica normocrômica foi maior no grupo de cães coinfectados por helmintos intestinais. as causas dessa alte-

ração relacionadas aos dois tipos de parasitismo podem estar se somando e agravando o quadro.

A trombocitopenia foi a principal alteração plaquetária em ambos os grupos estudados. A plaquetopenia é um achado frequente em cães com LVZ, cuja contagem de plaquetas em casos graves chega a menos de 40 mil e pode ser acompanhada também de leucopenia (BRAGA, 2007 e TORRECILHA, et al., 2016). No trabalho realizado por Silva et al. (2010), demonstrou-se 45% de trombocitopenia nos cães parasitados por *Ancylostoma*, que foi significativamente maior do que os cães não parasitados por esse nematoídeo. Segundo esses autores, esse resultado indicou que o parasitismo por *Ancylostoma* pode ser incluído no diagnóstico diferencial das trombocitopenias. Um dos achados hematológicos mais frequentes em cães parasitados por *L. infantum* é a trombocitopenia, que pode estar ligada ao comprometimento medular por conta da multiplicação parasitária e substituição do tecido medular por tecido inflamatório (MEDEIROS et al., 2008). No presente estudo, a trombocitopenia provavelmente esteve mais associada a *L. infantum*, pois foi mais frequente no grupo de cães monoinfectados se comparado aos coinfectados por helmintos.

A linfopenia foi a alteração no leucograma mais encontrada em ambos os grupos estudados, com frequência ligeiramente superior para o grupo dos monoinfectados. Essa alteração corrobora com a literatura. Segundo Mattos Jr. et al. (2004), a alteração leucocitária mais frequente nos cães com LVC foi linfopenia. Na LVC, a linfopenia ocorre devido ao confinamento temporário dos linfócitos nos órgãos linfoides secundários mediante a resposta ao agente infeccioso ou pela destruição linfocitária indiretamente pelos parasitos (BUSH, 2004). A alta frequência de infiltrado linfoplasmocitário nos intestinos no presente estudo, e que provavelmente estava presente em outros órgãos dos cães infectados, pode ter contribuído para linfopenia de acordo com a hipótese levantada por Bush (2004). Outra possível hipótese para a linfopenia é o comprometimento medular por conta da multiplicação parasitária e substituição do tecido medular por tecido inflamatório (MEDEIROS et al., 2008).

A segunda alteração mais encontrada no presente estudo no grupo dos monoinfectados foi a neutrofilia e no grupo coinfectado foi a monocitose. Dados mostram que cães com leishmaniose visceral podem apresentar leucocitose com neutrofilia associada a infecções secundárias e a fase inicial da leishmaniose induz leucocitose associado a neutrofilia (FEITOSA et al., 2000; MEDEIROS et al., 2008). A neutrofilia do presente estudo pode estar ligada também a uma resposta mediante uma inflamação sistêmica estando presente principalmente em casos com lesões cutâneas ulcerativas e infecção bacteriana secundária durante do curso da LVC (PALTRINIERE et al., 2016). Em relação à monocitose nos cães coinfec-

tados, essa pode ser justificada como decorrente a resposta orgânica a reação de estresse ou estar relacionada à fase de evolução do processo infeccioso, na qual, durante a fase monocitária defensiva, o organismo se defende energeticamente da infecção helmíntica (BIRGEL, et al. 2014). A monocitose caracteriza os processos inflamatórios crônicos em geral (NELSON & COUTO, 1994). Mattos Jr et al. (2004) explicam que na LV humana ocorre monocitose compensatória à presença de linfopenia.

A eosinofilia foi somente observada nos cães coinfectados por helmintos, apesar de ter sido encontrada em uma baixa frequência. A eosinofilia é um achado comumente associado a infecções por helmintos, porque esses parasitos induzem resposta Th2 a partir de helmintos fixados ou migração de larvas nos tecidos. A baixa frequência de eosinofilia nos coinfectados, portanto, pode ter sido associada à baixa carga parasitária encontrada na maioria dos cães coinfectados. Segundo Lacerda (2017), a presença do protozoário à nível tecidual, pode levar a migração de eosinófilos para os tecidos e envolvimento dos mesmos em um mecanismo leishmanicida adicional. Outra causa provável para a baixa frequência de eosinofilia nos coinfectados é o comprometimento medular pela infecção por *L. infantum*, que leva a substituição do tecido hematopoiético por macrófagos parasitados (REY, 2008). Uma resposta imune Th1 como resposta do organismo frente a infecção por *L. infantum* pode influenciar também os níveis de eosinófilos diante a uma coinfeção desse protozoário com helmintos (MAURYA; ALTI ; CHANDRASEKARAN, 2012).

Segundo Çelik (2007), a leishmaniose visceral pode evoluir para formas graves, gerando desordens hematológicas expressivas incluindo a pancitopenia caracterizada pela presença de anemia, trombocitopenia e leucopenia com neutropenia, marcada eosinopenia e uma relativa linfocitose e monocitose. Portanto, a anemia e a trombocitopenia, que foram achados frequentes principalmente no grupo de cães monoinfectados por *L. infantum*, no presente estudo, foram provavelmente causados por esse parasito. Diversas alterações hematológicas podem ser observadas em cães parasitados por helmintos e/ou protozoários. Porém, não foi possível a determinação de nenhuma alteração hematológica específica relacionada a um único parasito. Portanto, para o diagnóstico de LVC e de helmintoses se faz necessário a utilização de exame parasitológico específico. Assim, as alterações hematológicas observadas neste trabalho como anemia e eosinofilia, podem servir como indicativo da presença dos helmintos em cães infectados por *L. (L.) infantum*. Estes dados podem ser utilizados em conjunto com as técnicas de diagnóstico coproparasitológico, para se obter uma melhor avaliação da gravidade do parasitismo por helmintos no hospedeiro (SILVA et al., 2010).

A alteração histológica encontrada com maior frequência no jejuno e ceco dos cães foi a inflamação não granulomatosa (linfoplasmocitária) tanto nos cães coinfectados como nos cães monoinfectados, em ambos os segmentos intestinais, corroborando com as observações de Luz (2005) e Pinto et al. (2011). Luz (2005) observou que o principal infiltrado celular encontrado no intestino delgado de pacientes humanos infectados por leishmaniose visceral é o infiltrado linfoplasmocitário. Um exsudado celular crônico foi observado em todos os segmentos intestinais de cães infectados por *L. infantum* e era composto predominantemente por plasmócitos e linfócitos, com raros macrófagos e polimorfonucleares, o que caracteriza o infiltrado linfoplasmocitário (PINTO et al., 2011). O infiltrado inflamatório juntamente com a presença de formas amastigotas no interior de macrófagos foram encontrados principalmente em lâmina própria dos segmentos intestinais analisados neste estudo. Tal alteração também foi observada por Pinto et al (2011), Casanova (2019) e Toplu e Aydogan (2011). Isso se deve possivelmente a concentração de células do sistema imunológico, dentre elas os linfócitos, plasmócitos e macrófagos, na mucosa intestinal, mais especificamente na lâmina própria. O infiltrado linfoplasmocitário nas infecções por leishmaniose visceral no intestino, não foi capaz de montar uma resposta imune eficaz contra o parasito, principalmente pela baixa produção local do δ -interferon (LUZ, 2005). Este resultado encontrado por Luz (2005) corrobora com o presente estudo, pois a frequência de positividade de amastigotas no intestino foi de 58%, sugerindo que o infiltrado linfoplasmocitário não atua de maneira efetiva sobre a multiplicação do protozoário a nível intestinal.

Na lâmina própria não inflamada, 15% das células mononucleares são macrófagos e a sua outra grande maioria é composto por linfócitos e plasmócitos, que compõem o sistema imune adaptativo local, e durante o processo de inflamação intestinal, o número destas células aumenta. Este aumento é gerado pelo processo de quimiotaxia das células endoteliais locais e das células mononucleares da lâmina própria, como os linfócitos, gerando processos de colite e possível diarreia no paciente (SCHOELMERICH et al., 1988 e FERRER et al, 1991. Toplu e Aydogan (2011) e Ferrer et al. (1991) descreveram que a diarreia crônica é a primeira manifestação clínica da LVC nos animais estudados e com infecção intestinal. Em nosso estudo, não tivemos como observar essa associação de infecção intestinal por *L. infantum* e diarreia, pois não foram realizadas nos cães examinados a avaliação e controle quanto ao volume e frequência de defecações e presença de alterações nas fezes relacionadas à consistência e presença de muco e sangue.

Achados histopatológicos intestinais em cães parasitados por helmintos são as úlceras e descamação em mucosa, congestão e hemorragia, infiltrado eosinofílico e mononuclear

fagocitário intenso e com encapsulamento do parasita, conforme observado por Campos, J. Moraes e F. Moraes (2009), Kalkofen (1976), Kirkova e Dinev (2005), Klockiewicz et al. (2019) e Sloss (1999). Apesar da presença de helmintos parasitas nos segmentos intestinais de 2 cães, Pinto et al. (2011) observaram que esta não interferiu com a análise histológica de segmentos do trato gastrointestinal de cães com LVC. O presente estudo não corrobora com Pinto et al. (2011), pois o grupo de cães coinfectados por helmintos apresentou maior frequência de alterações histológicas, demonstrando que os helmintos podem ter contribuído para a presença de lesões. Entretanto, as alterações histológicas observadas no presente estudo foram diferentes das descritas para infecção intestinal por helmintos (CAMPOS; MORAES, J.; MORAES, F., 2009; KALKOFEN, 1976; KIRKOVA;DINEV, 2005; KLOCKIEWICZ et al., 2019; SLOSS, 1999). As alterações histológicas observadas no presente estudo foram semelhantes ao reportado na literatura em infecções intestinais por *L.(L.) infantum* em cães, tais como infiltrado linfoplasmocitário e eosinofílico (leve), achatamento de vilosidades bem como áreas focais de fibrose, hiperplasia glandular e rara inflamação granulomatosa (CASANOVA, et al 2019; PINTO et al, 2011.; FIGUEIREDO, 2013). A possível explicação para essas alterações histológicas intestinais não específicas e leves, diante um parasitismo helmíntico, observadas no presente estudo, pode ser a imunoproteção intestinal criada pelos cães adultos frente a um parasitismo helmíntico, os tornando menos predispostos as helmintoses intestinais de alta carga (BALASSIANO, et al., 2009). De fato, observamos baixas cargas de helmintos nos cães reforçando essa hipótese.·

Toplu e Aydogan (2011) encontraram no trato gastrointestinal aumento moderado da celularidade. Os autores descreveram que o infiltrado linfoplasmocitário foi restrito à lâmina própria adjacente à muscular da mucosa, semelhante aos achados de Pinto et al. (2011) e observado também do presente estudo. Essa localização mais frequente das amastigotas e do infiltrado inflamatório pode estar relacionado à circulação da linfa no intestino. Na lâmina própria, próximo a muscular da mucosa há uma rede de vasos linfáticos que se conectam com os vasos linfáticos que drenam as vilosidades (MILLER; NEWBERRY; MCDOLE, 2010). Possivelmente, nessa rede se concentram as células inflamatórias, incluindo os macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* sp. Segundo Pinto et al (2011), corroborando com a hipótese do presente estudo, o tipo de circulação presente no trato gastrointestinal possibilita maior passagem celular e, com isso, maior concentração de parasitos nas regiões onde estão presentes os vasos mais calibrosos.

Foi encontrado neste estudo um aumento das alterações histológicas intestinais em cães com amastigotas nas camadas teciduais do jejuno e ceco. Tanto Ferrer et al. (1991)

quanto Adamama-Moraitou et al. (2007) observaram colite e alterações intestinais nos animais com e sem manifestação de sinais clínicos e visualização da *Leishmania* sp. no intestino grosso, corroborando com o resultado do presente estudo, onde o ceco apresentou maior frequência de positividade para *Leishmania* sp. pela técnica de imuno-histoquímica se comparado ao jejuno. A maior parte dos cães deste estudo apresentaram negatividade para *Leishmania* sp. em jejuno, sobretudo no grupo de cães coinfectados por helmintos. Esse achado corrobora com os resultados de Rousseau et al. (1997) que observaram que após dezoito dias da inoculação de *L. infantum*, que corresponde a fase aguda da leishmaniose visceral, a carga parasitária de amastigotas no fígado dos camundongos coinfectados com *L. infantum* e *Trichinella spiralis* foi significativamente inferior ($p < 0,001$) a de camundongos infectados com *L. infantum* unicamente. Setenta dias pós inoculação da *L. infantum*, que corresponde à fase crônica da doença, a carga de amastigotas no baço foi significativamente mais baixa em camundongos coinfectados, podendo este achado estar relacionado a reposta imunológica Th2 frente a infecção pelos helmintos. Porém tais resultados não eram esperados neste estudo. Esperava-se maior presença de amastigotas teciduais de *Leishmania* sp. em cães coinfectados, mediante a uma resposta Th2 afim de expulsar os helmintos depreciando a resposta de caráter Th1 que atuam sobre as amastigotas. Este resultado pode estar presente por conta da baixa carga parasitaria de helmintos encontrada no jejuno dos animais coinfectados ou por conta do baixo número populacional do experimento.

No presente estudo no ceco, a frequência de positividade para formas amastigotas foi maior nos cães coinfectados e poliparasitados por helmintos. Esses resultados são diferentes dos relatados por Pinto et al. (2011), que observaram que a presença de helmintos não interferia com a análise histológica de segmentos do trato gastrointestinal de cães com LVC. Porém González-Sánchez, Cuquerella e Alunda (2018), verificaram um aumento notável na produção de ovos de *Heligmosomoides polygyrus* (uma espécie de helminto de roedores), bem como a longevidade dos parasitas adultos, e aumento do número de helmintos em camundongos, após coinfeção experimental com *Leishmania infantum*. Estes resultados são consistentes com a anulação parcial da resposta Th2 para *H. polygyrus*, e a polarização da resposta tipo Th1, resultando em uma taxa de fecundidade elevada e longevidade de helmintos. Este estudo corrobora com o achado no presente estudo, onde o grau de parasitismo por helminto (poliparasitados) estava associado positivamente à presença de amastigotas no ceco. Outra hipótese para aumento da frequência das amastigotas no ceco de cães coinfectados é a presença do *T. vulpis*, que pode estar relacionado diretamente ao crescimento das formas amastigotas no local.

Em relação a cultura parasitológica, o presente estudo obteve uma alta frequência de positividade no isolamento do protozoário derivados da amostra de linfonodo e medula óssea dos cães estudados. Houve maior positividade nos cães monoinfectados, porém esperava-se encontrar maior positividade na cultura nos cães coinfectados por conta da resposta imunológica antagônica. Tal achado pode estar ligado ao baixo número de cães avaliados, bem como a carga parasitaria helmíntica baixa nos coinfectados, não sendo suficiente para aumentar a resposta Th2 a ponto de favorecer a infecção por *Leishmania*. Portanto, são necessários estudos com um número maior de animais para confirmar os resultados obtidos no presente estudo.

Houveram limitações no presente estudo como a falta de um grupo controle, o não acompanhamento destes cães com coletas de amostras em um determinado período de tempo, acompanhando-se assim a evolução de ambas das infecções e quadro clínico dos animais. Também seria de grande valia um estudo da resposta imunológica da população de cães analisados.

8 CONCLUSÕES

- A ocorrência de helmintos intestinais em cães soropositivos para *Leishmania infantum* foi alta, mesmo sendo a maioria dos cães adultos e domiciliados, demonstrando que esses animais não eram rotineiramente tratados com anti-helmínticos e representando um potencial risco de transmissão desses parasitos para humanos e animais.
- O maior número de sinais clínicos nos cães coinfectados sugere que a infecção por helmintos pode agravar a LVC, sendo a esplenomegalia, caquexia e descamação furfurácea os sinais clínicos mais frequentes, o que pode comprometer o estado de saúde geral do animal.
- Os helmintos mais prevalentes em cães provindos de Barra Mansa coinfectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* são o *Ancylostoma caninum* e o *Dipylidium caninum*, o que aumentou o risco a humanos de adquirirem a larva *migrans* cutânea e a dipilidiose.
- Os testes coproparasitológicos foram sensíveis, sobretudo os testes de flutuação (Fulleborn e Gordon Whitlock). Recomenda-se associar a técnica de sedimentação (Ritchie modificado) para melhor diagnóstico dos helmintos intestinais através da observação e contagem dos ovos.
- A anemia normocítica normocrômica, a trombocitopenia e a linfopenia são alterações hematológicas frequentes em cães infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*, que sugere um possível indicador para o diagnóstico da doença. Nos cães coinfectados a anemia é a alteração mais frequente.
- Os cães coinfectados apresentam maior frequência de alterações histológicas intestinais, como a presença do infiltrado linfoplasmocitário, e maior ocorrência de formas amastigotas de *Leishmania* spp. sobretudo no ceco, sugerindo influência dos helmintos no agravamento das lesões intestinais por *Leishmania (Leishmania) infantum*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organizacion Pan Americana de la Salud. 2003

ACKERMANN, M. R. Inflammation and healing. In: ZACHARY, J.F. **Pathologic bases of veterinary diseases**. 6th ed. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 73-131.

ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; RALLIS, T. S.; KOYTINAS, A. F. et al. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, [Cleveland], v.76, n. 1, p. 53-57. 2007.

AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. N. D.; MAIA, M. B. et al. Ovinos da região oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira** v.9, n.1 p.212-218, 2008. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/3681> Acesso em: 15 abr. 2020.

ALHO, A.M.; CRUZ, R.; GOMES, L. et al. *Dipylidium caninum*, da ingestão da pulga ao controle do cestóide mais comum do cão e do gato. **Clínica Animal**, v. 3, n. 3, p. 26-29, 2015.

AMARANTE, E. et al. Comparação entre técnicas para diagnóstico coproparasitológico de helmintos em cães (*Canis familiares*) e correlação com a presença de parasitos adultos. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, Rio de Janeiro, v.3, n.3, p. 7. 2006. Disponível em : <http://www.castelobranco.br/pesquisa/vol3/>. Acesso em 14 de janeiro de 2020.

AMATO, J. F. **Manual de técnicas para a preparação de coleções zoológicas: Plelmintos (temnocefálicos, trematódeos, cestóides, cestodários) e acantocéfalos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Zoologia, 1985. p.11.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V. et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, [Jaboticabal], v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.

ARAÚJO, A. Origem dos Ancilostomídeos Parasitos do Homem. In: FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A.; CONFALONIERI, U. **Paleoparasitologia no Brasil**. Rio de Janeiro: PEC/ENSP/Fiocruz, 1988, p. 138-43.

ARAÚJO, V. E. M.; PINEHIRO, C. L.; ALMEIDA, M. C. M. et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: A spatial analysis in urban área. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, [São Francisco], v.7, n.11, e2540. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3820760/>. Acesso em: 15 abr. 2020.

AZEREDO-COUTINHO, R. B.; PIMENTEL, M. I.; ZANINI, G. et al. Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. **Acta Trop.**, v.154, p. 42-49, 2016.

BALASSIANO, B. C. C.; CAMPOS, M. R.; MENEZES, R. C. A. A. et al. Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, [Seul], v.91, p. 234-240, 2009.

BIRGEL, D. B.; MULLER, A. F.; FANTINATO-NETO, P. et al. Avaliação do quadro eritrocitário e da repercussão do estado anêmico no leucograma de caprinos com verminose gastrintestinal. **Pesq. Vet. Bras.**, Seropédica, v.34, n.3, p. 199-204, 2014.

BRAGA, A. S. C. **Fatores associados à evolução clínica da leishmaniose visceral em crianças hospitalizadas em centro de referência de Belo Horizonte, 2001 a 2005**, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

BRAZIL, R. P.; GOMES, B. Bionomia. In: RANGEL E.F, Lainson R (orgs) **Flebotômicos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p.257-274.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. PN de Leishmaniose visceral **Boletim Epidemiológico Leishmanioses 001/2017**. Rio de Janeiro, 1^a à 44^a semana epidemiológica, 2017. Disponível em: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=ocwS%2FdIJO80%3D> Acesso em: 15 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed., 5. Reimpr. Brasília, 2014. Disponível em: http://crmvm.org.br/files/materiais/Manual%20Leishmaniose%202014_21558931.pdf Acesso em: 15 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Letalidade de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015. Brasília, 2016. Atualizado em 31 abr. 2019. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Letalidade.pdf>. Acesso em 05 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação.2017. Atualizado em 11 set. 2109 Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leishvrj.def>. Acesso em: 12 nov. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação.2018. Atualizado em 11 set. 2109 Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leishvrj.def>. Acesso em: 06 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**. Brasília – DF, 106 p, 2011. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) Disponível em: <http://www.saude.gov.br/bvs>. Acesso em: 03 set. 2019.

BREMM, M. **Infecção parasitária por nematódeos em cães do canil municipal de Santa Cruz do Sul/RS.2007**. 2007. Monografia (Especialização em Análises clínicas veterinária) - Faculdade de veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, 2007.

BRENER, B.; LISBOA, L.; MATTOS, D. P. B. G. et al. Frequência de enteroparasitas em amostras fecais de cães e gatos dos municípios do Rio de Janeiro e Niterói. **R. bras. Ci. Vet.**, Niterói, v.12, n.1/3, p.102-105, 2005.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *The Lancet*, [S.l.], v. 392, p.951–970, 2018.

BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. São Paulo. Roca, 2004. p.37.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D. ; LOTZ, L. M. et al. Parasitology Meets Ecology on its own Terms: Margolis et al. Revised. **J. Parasitol.**, [Nova York], v.83, n. 4, p.575–583, 1997.

ÇELIK, U.; LEBLEBISATAN, G.; ALHAN, E. et al. Immune Hemolytic Anemia in Association with Visceral Leishmaniasis. **J. Pediatr. Inf.**, v.1, p: 36-38, 2007.

CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Histopatologia do intestino de pseudoplatystoma fasciatum (osteichthyes, pimelodidae) parasitados com cestodas proteocefalídeos e nematodas. **Bol. Inst. Pesca**, Santos, v.35, n. 1, p. 153 – 158, 2009.

CAPRON, M.; CAPRON, A. Effector functions of eosinophils in schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, p. 167-170, 1992.

CARSON, F. L.; CAPPELLANO, C .H. **Histotechnology: a self-instructional text**. 4th ed. Chicago: ASCP Press, 2015.

CASANOVA, M. I.; MARTIN, S.; MARCO, A. et al. Detection of *Leishmania* spp. Infection by Immunohistochemistry in Archived Biopsy Samples from Dogs with Colitis in an Area Endemic for Leishmaniasis. **J. Comp. Pathol.**, [Liverpool], v. 167, p. 12 – 17. 2019

CASTRO, C.G. **Aspectos hematológicos, citológicos e histológicos da mucosa intestinal de cães soropositivos para *leishmania infantum* coinfectados com helmintos intestinais** .2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2016.

CORTES, S.; VAZ, Y.; NEVES, R.; et al. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Vet Parasitol.**, v. 189, n. 2-4, p. 189-196, 2012.

CORTÉS, A.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J. G. et al. Th2 and Th1 responses: clear and hidden sides of immunity against intestinal helminths. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 678–693, 2017.

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F. et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636-643, 2007

CUPOLILLO, E.; BOITÉ, M. C.; PORROZZI, R. Considerações Sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. (org.). **Leishmanioses do Continente Americano**. 22. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. cap. 2. p. 39-51.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the Law of priority. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** , Rio de Janeiro, v.101,n. 1, p. 117-118, 2006.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medial ecology, and molecular aspects. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.16, p. 65-72, 2003.

DIAS, F. O. P. et al. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, vol.19, n.5, p.1373-1380, 2003.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites Vectors**, v. 5, n. 276 , p. 1-12, 2012.

ENGWERDA C. R.; ATO, M.; STAGER, S. et al. Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania Donovanii* infection. **Am. J. Pathol.**, v.165, n. 6, p. 2123–2133, 2004.

EGUÍA-AGUILAR, P.; CRUZ-REYES, A.; MARTÍNEZ-MAYA, J. J. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. **Vet. Parasitol.**, v.127, n.2, p.139-146, 2005.

FALEIRO, R. J.; KUMAR, R.; HAFNER, L. M. et al. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLOS Negl. Trop. Dis.**,[São Francisco], v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clin. Vet.**, v. 28, n.28, p.36-44, 2000.

FERRER, G.; JUANOLA, B.; RAMOS, J.A. et al. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. **Vet. Pathol.**, v. 28, n. 4, p. 342-343, 1991

FIGUEIREDO, M.M. **Estudo histológico, imunológico e parasitológico do tubo gastrointestinal de cães infectados**, 2013. Tese (Doutorado em patologia geral)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,2013.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; DUARTE, G.; EL-BEITUNE, P. et al. Visceral leishmaniasis (kalazar) and pregnancy. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v.12, n.1, p.31-40, 2004.

FISCHER, C. D. B. Prevalência de helmintos em *Canis familiaris* (Linnaeus,1758) no Hospital de Clínicas Veterinárias do Rio Grande do Sul através de diagnóstico pós-mortem. **Acta Sci. Vet.**, v. 31, n. 1, p. 63-64, 2003.

FONSECA-ALVES, C. E.; CORRÊA, A. G.; ELIAS, F. Eosinophilic gastroenteritis in basset hound dog. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 2, n. 2, p. 110-112, 2012.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Ícone, 2004.

FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LOPES-NETO, B. E. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 1, p. 24–29, 2012.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J. et al. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 36, n.2, p. 87-91, 1999.

GONZALEZ, J. L.; FERMIN, M. L.; GARCIA, P. et al. Erosive colitis inexperimental canine Leishmaniasis. **J. Vet. Med.**, v. 37, p.377-382, 1990.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ ,M. E.; CUQUERELLA M.; ALUNDA, J. M. Superimposed visceral leishmanial infection aggravates response to *Heligmosomoides polygyrus*. **Parasites Vectors**, v.11, p. 404. 2018.

GORDON, H. McL; WHITLOCK, A.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. **J. Coun. Sci. Ind. Res.**, Melbourne, v. 12, p. 50-52, 1939.

GRAÇA, M. I. **Infecção por toxocara em animais de companhia: abordagem ao tratamento e ao controlo**. 2015. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra. 2015.

HALL, A. Intestinal helminths of man: the interpretation of egg counts. **Parasitology**, Cambridge, v.85, p. 605-13, 1982.

HARHAY M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol.**, v.27, p. 403-409, 2011.

HOFFMANN, R. P. **Diagnóstico de Parasitismo Veterinário**. Porto Alegre: Sulina, 1987.

JIANG,P.; ZHANG, X.; LIU, D. R.; et al. Human Case of Zoonotic Dog Tapeworm, *Dipylidium caninum* (Eucestoda: Dilepidiidae), in China. **Korean J. Parasitol.**, Seul, v. 55, n. 1,p. 61-64, 2017

KALKOFEN, U. P. Intestinal trauma resulting from Feeding activities of *Ancylostoma caninum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 23, n.8, p. 1046 – 1052, 1976.

KHALIL, L.F.; JONES A.; BRAY R.A. **Keys to the cestode parasites of vertebrates**. Wallingford: CAB International, 1994.

KIRAL, F. K.; SEYREK, K.; PASA, S. et al. Some haematological, biochemical and electrophoretic findings in dogs with visceral leishmaniasis. **Revue Méd. Vét.**, v. 155, p. 226-229, 2004.

KIRKOVA, Z.; DINEV, I. Morphological changes in the intestine of dogs, experimentally infected with *Trichuris vulpis*. **Bulg. J. Vet. Med.**, [Stara Zagora], v.8, n. 4, p. 239-243, 2005.

KLOCKIEWICZ, M. ; SOBCZAK-FILIPIAK, M.; JAKUBOWSKI, T. et al. Histopathological lesions caused by experimental *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina* infections in farm mink (*Neovison vison*). **J. Vet. Res.**, Puławy, v. 63, p. 205-214, 2019

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Vet. Pathol.**, v.51, p. 527 e 538 , 2014.

LACERDA, M. S.; SAMPAIO, R. L.; REZENDE, R. S.; et al. Perfil hematológico de cães (*Canis lupus familiaris*) soropositivos para *Leishmania* spp atendidos no hospital veterinário de Uberaba – MG. **Nucleus Animalium**, Uberaba, v.9, n.1, p. 109-118, 2017.

LAU, H. D. **Rotação de pastagem no controle de helmintos gastrintestinais em búfalos**. Belem: Embrapa Amazonia Oriental, 2005.

LITTLE, M. D. Observations on the positive role of insects as paratenic hosts for *Ancylostoma caninum*. **J. Parasitol.**, [S.I.], v. 47, p. 263 – 267, 1961.

LONGO, C. E. M.; SANTOS, G. R.; OLIVEIRA, J. L. S. et al. *Trichuris vulpis*. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 6, n.8, 2008.

LUZ, K. G. **Avaliação das alterações imunohistológicas da mucosa do intestino delgado em pacientes portadores da leishmaniose visceral**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2005.

MAGNAVAL, J. F. ; GLICKMAN, L. T.; DORCHIES, P. et al. Highlights of human *Toxocariasis*. **Korean J. Parasitol** .,Seul, v.39 , n.1, p.1-11, 2001

MARKWELL, E. K.; VOGEL, M.; JOHN, D. T. **Parasitologia Veterinária**, 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MATTOS Jr., D. G. **Manual de helmintoses comuns em cães**. Niterói: EdUFF, 1999.

MATTOS Jr., D. G.; MOTTA, O. V. **A rotina laboratorial em doenças Parasitárias no Laboratório de Sanidade Animal**. Campos dos Goytacazes: UENF, 1996.

MATTOS Jr., D. G.; PINHEIRO, J. M.; MENEZES, R. C. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Niterói, v. 56, n. 1, p. 119-122, 2004.

MAURYA, R.; ALTI, D.; CHANDRASEKARAN, S. A risk of visceral leishmaniasis in case of helminths co-infection in endemic regions. **Innovative Journal of Medical and Health Science**, Hyderabad, v. 2, n. 4, p. 47-50, 2012. Disponível em: <http://www.innovativejournal.in/index.php/ijmhs>. Acesso em: 28 novembro. 2019.

MCGWIRE, B. S., SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndrome and treatment. **Q. J. Med.**, v. 107, e.1, p. 7-14. 2013.

MEDEIROS, C. M. O.; MELO, A. G. C.; LIMA, A. K. F. et al. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, v.8, n.1, p.43-50, 2008.

MELLO, C. X.; SANGENIS, L. H. C.; LIMA, S. R. A.; et al. Expansion of visceral leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil: report of the first autochthonous case in the municipality of Volta Redonda and the difficulty of diagnosis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.56, p.271-274, 2014

MESQUITA-RODRIGUES, C.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; SABÓIA-VAHIA, L. et al. Cellular growth and mitochondrial ultrastructure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes are affected by the iron chelator 2,2-dipyridyl. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [São Francisco], v. 7, n. 10, p. e2481, 2013.

MILLER, M. J.; NEWBERRY, R.D.; MCDOLE, J. R. Microanatomy of the intestinal lymphatic system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, Nova York, v. 1207, n. 1, p.21-8, 2010.

MURRAY, H.W.; TSAI, C.W.; LIU, J. et al. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 4370–4374, 2006.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1994, 737p.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. et al. **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

NICOLATO, R. C.; DE ABREU, R.T.; ROATT, M.B. et al. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS ONE**. [São Francisco], v. 8, n. 8, e.82947, 2013

OKAN, M.; SATOSKAR, A.R; NISHIZAKI, K. et al. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. **J. Immunol** , v. 163, n.12, p.6712-6717, 1999.

OLIVEIRA, F.; FAGUNDES, E.; BIAZOTTO, G. et al. Ancilostomíase. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. São Paulo, ano 6, n.11. 2008.

OLIVEIRA, V. S. F.; MELO, D. P. G.; FERNANDES, P. R. et al. Ocorrência de helmintos gastrointestinais em cães errantes na cidade de Goiânia – Goiás. **Rev. patol. trop**, v.38, n. 4, p. 279-283, 2009.

OLIVEIRA, V. C.; BOECHAT, V. C.; MENDES, J. R. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **PLoS One**, [São Francisco] v. 12, n. 4, e0175588, 2017.

O'NEAL, S. E.O; GUIMARAES, L. H.; MACHADO, P. R. et al. Influence of helminth infections on the clinical course of and cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, [S.l], v. 195, p.142–148, 2007.

OPAS/OMS. Leishmanioses – Informe Epidemiológico das Americas. Informe Leishmaniose nº 3 – Julho 2015. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754. Acesso em: 25 de junho de 2018.

PALTRINIERI, S.; GRADONI, L.; ROURA, X. et al. Laboratory teste for diagnosis and monitoring canine leishmaniasis. **Vet Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 552 -578, 2016.

PEARSON, R.D.; WHELER, D.A.; HARRISON, L.H. et al. The immunobiology of leishmaniose. **Rev. Infect. Dis.**, v. 5, n.5, p. 907-927, 1983.

PETT, M. A. **Nonparametric statistics for health care research: Statistics for small samples and unusual distributions**. 2th ed. Thousand Oaks: SAGE Publications, 2016.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK R.; WAGENAAR, J. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINHEIRO, R.O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late, but not early control of *Leishmania amazonensi* infection in C57BL/6 mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n.1 , p. 79-82, 2007.

PINTO, A. J. W.; FIGUEIREDO M . M.; SILVIA, F. B. et al. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Acta Vet. Scand.**, v. 53, n 67, 2011.

PRATES, L.; PACHECO, L. S.; KUHL, J. B. et al. Frequência de parasitos intestinais em cães domiciliados da cidade de Maringá, PR. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** , Belo Horizonte, v. 61, n. 6, p. 1468-1470, 2009.

RANGEL, E. F., LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses. In: RANGEL, E.F & LAINSON, R. (org.), **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.291-309. 2003.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2019. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 20/01/2020.

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIBEIRO, E. S.; AMARANTE, A. F. T.; SERRANO, A. C. M. et al. Diagnosis of gastrointestinal parasites in cats: a comparison of different methodologies. **Acta Veterinaria Brasília**. Mossoró, v.9, n.4, p.381-385, 2015

ROUSSEAU, D., et al. Progression of Visceral Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum* in BALB/c Mice Is Markedly Slowed by Prior Infection with *Trichinella spiralis*. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 12, p. 4978–4983. 1997.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA, 2018. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>. Acesso em: 20/01/2020.

SÁNCHEZ, A.C.; QUÍLEZ, J.; DEL CACHO, E. Cestodosis: Teniosis, Equinococosis, Dipilidiosis, Mesocestoidosis y Difilobotriosis. In: CORDERO DEL CAMPILLO, M.; ROJO, F.A.V.; MARTÍNEZ, A.R.F. **Parasitología Veterinaria**, p. 626-635, 1999.

SANTARÉM, V.A.; GIUFFRIDA, R.; ZANIN, G.A. Larva Migrans Cutânea: Ocorrência de Casos Humanos e Identificação de Larvas de *Ancylostoma* spp em Parque Público do Município de Taciba, São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, n. 2, p. 179-181, 2004.

SANTOS, F. A. G.; YAMAMURA, M. H.; VIDOTTO, O. et al. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em cães (*Canis familiaris*) com diarreia aguda oriundos da região metropolitana de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Semin. Cienc. Agrar.**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 257-268, 2007.

SANTOS, L. A. C. **Estudo prospectivo sobre a dinâmica da evolução clínica e imunológica da infecção canina por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de leishmaniose visceral no estado do Pará. 2016.** Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; KOUTINAS, A.F. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Vet. Dermatol.**, Oxford, v.25, n.2, p. 61-71, 2014.

SCHOELMERICH J, SCHMIDT E, SCHUMICHEN C. et al. Scintigraphic assessment of bowel involvement and disease activity in Crohn's disease using technetium 99m hexamethyl propylene amine oxine as leukocyte label. **Gastroenterology**, v.95, p.1287-93, 1988.

SERAFIM, T.D.; FIGUEIREDO A. B.; COSTA P. A. et al. *Leishmania* metacyclogenesis is promoted in the absence of purines. **Plos Neglected Tropical Disease.**, Ouro Preto, v. 6, n. 9 , p.1-10, 2012.

SILVA, A. M. G. **Toxocaríase experimental em hamster.** 2015. Tese- (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5144/tde-17062015-162133/> >. Acesso em 23/01/2020.

SILVA, B. J. A.; FREIRE, I. M. A.; DA SILVA, W. B. et al. Evaluation of haematological changes in parasitic helminths and protozoa infections in dogs (*Canis lupus familiaris*, linnaeus, 1758). **Neotrop. Helminthol.**, [Lima], v.4, n.1, 2010.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical Leishmania species. **Trends Parasitol.**, v. 21, n.12, p. 550-552, 2005.

SILVA, D. T.; NEVES, M. F.; DEQUEIROZ, N. M. et al. Estudo de correlação e descrição histopatológica de alterações intestinais em cães infectados com *Leishmania infantum*. **J. Vet. Parasitol.**, v. 25, n. 1, p. 24-36, 2016 .

SILVA, S. I.; BORBA, E.; PHILIP, A. C. et al. Avaliação da prevalência de enteroparasitoses e a sua associação a presença de anemia e/ou carência nutricional em escolares do município de Flores da Cunha/RS. **Revista News Lab**, São Paulo, v.107, p.120-129, 2011.

SLOSS, M. W. **Parasitologia Clínica Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Manole. 1999.

SOUZA, M. A. S. **Leishmanioses: Uma Revisão Bibliográfica**. 2015. Monografia. Faculdade Tecsoma,Paracatu, 2015.

SUMITOMO, A. H. **Comparação entre técnicas coproparasitológicas para o diagnóstico das principais enteroparasitoses**. 2010. Programa de Aprimoramento Profissional (Conclusão da Residência Médico Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista/UNESP, Jaboticabal, 2010.

TAJEBE, F.; GETAHUN, M.; ADEM, E. et al. Disease severity in patients with visceral leishmaniasis is not altered by co-infection with intestinal parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [São Francisco], v. 11, n. 7, p. e0005727, 2017.

TÁPARO, C. V.; PERRI, S. H. V; SERRANO, A. C. M. et al. Comparação entre técnicas coproparasitológicas no diagnóstico de ovos de helmintos e oocistos de protozoários em cães. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**,[Jaboticabal], v. 15, n. 1, p.1-5, 2006.

TOEPP, A. J.; MONTEIRO, G. R. G.; COUTINHO J. F. V. et al.. Comorbid infections induce progression of visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors**, [London],v. 12, n. 54, p. 1–12, 2019.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitol. Res.**, Berlin, v.109, p.1051-1057, 2011.

TORRECILHA, R. B. P.; UTSUNOMYA, Y. T.; BOSCO, A. M.; et al. Correlations between peripheral parasites load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. **Prev. Vet. Med.**, Amsterdã, v. 132, p. 83-82, 2016

TARANTO, N. J.; PASSAMONTE, L.; MARINCONZ, R. et al. Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chaco Salteño. **Medicina (Buenos Aires)**, [Buenos Aires], v. 60,n. 2, p. 217-220, 2000.

URQUHART, M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara. 1998. p. 119-120

VARIZA P. F. **Zoonoses provocadas pelo parasita canino *Ancylostoma caninum***. 2012. Monografia (Especialização em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.2012.

VASCONCELLOS, M. C.; BARROS, S. L. J.; OLIVEIRA C.S. Parasitas gastrointestinais em cães institucionalizados no Rio de Janeiro, RJ. **Rev Saúde Pública**. v.40, n. 2, p.321-323, 2006.

VICENTE, J. J. RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C. et al. Nematóides do Brasil. Parte V: nematóides de mamíferos. **Rev. Bras. Zool.**, São Paulo, v.14, n.1, p.1-452, 1997.

VIEIRA, R. J. F. **Clínica e Cirurgia de Animais de Companhia**. 2014. Dissertação- Departamento de medicina veterinária, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade De Évora, 2014.

VILA, A.; MOVILLA, R.; LLORET, A. et al. Chronic Small Bowel Diarrhea Due to Granulomatous Duodenitis by Leishmania in two Dogs. **Jornal de Medicina Veterinária e Investigação**, v. 53, p.101 - 106 ,2016.

WHELAN, M.; MOVILLA, L.; LLORET, A. et al. Filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. **J. Immunol.**, v.164, p. 6453-6460. 2000

WANI, Z. A.; ALLAIE, I. M.; SHAH, B. M. et al. *Dipylidium Caninum* Infection in Dogs Infested with Fleas. **J. Parasit. Dis.**, Lucknow, v.39, n. 1, p. 73-75, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the Leishmaniases: Report of a meeting of the WHO Expert Comite on the Control of Leishmaniases.** Geneva: World Helth Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis country profile.** Brasil: 2014. World HelthOrganization, 2016.

YOUNG, K. H.; BULLOCK, S. L.; MELVIN, D. M. et al. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether the formalin-ether sedimentation technique. **J. Clin. Microbiol.**, Atlanta, v.10, n.6, p. 852-853, 1979.

9 ANEXOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-24/17

Certificamos que o protocolo (P-51/16-4), intitulado "OCORRÊNCIA DE *Brucella canis* e *Coxiella burnetii* EM CÃES SOROLOGICAMENTE POSITIVOS PARA *Leishmania infantum*", sob a responsabilidade de RODRIGO CALDAS MENEZES, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 10/07/2021 e inclui o uso total de :

Canis familiaris

- 90 Machos.
- 90 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 10 de julho de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Etelcia M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096
10/07/2017

