



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VALÉRIA MEDINA CAMPRIGHER

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp EM
FELINOS DE ÁREA ENDÊMICA DO ESTADO DE SÃO
PAULO**

Londrina
2017

VALÉRIA MEDINA CAMPRIGHER

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp EM
FELINOS DE ÁREA ENDÊMICA DO ESTADO DE SÃO**

PAULO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Souza
Zanutto

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Camprigher, Valéria Medina.

Ocorrência de anticorpos anti-Leishmania spp em felinos de área endêmica do estado de São Paulo / Valéria Medina Camprigher. - Londrina, 2017.
60 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto.

Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Leishmaniose - Tese. 2. resposta imune - Tese. 3. Sorodiagnóstico - Tese. 4. RIFI-ELISA - Tese. I. Zanutto, Prof. Dr. Marcelo de Souza. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias. III. Título.

VALÉRIA MEDINA CAMPRIGHER

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp EM
FELINOS DE ÁREA ENDÊMICA DO ESTADO DE SÃO
PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Mestrado Profissional em Clínicas
Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina,
como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Clínicas Veterinárias.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT

Londrina, 24 de março de 2017.

Aos animais, seres que conjugam o verbo amar em todos os tempos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por suas bênçãos e proteção;

Aos animais, meu profundo amor e respeito;

Aos meus pais, principais responsáveis pela minha formação acadêmica;

Aos meus filhos, Maria Luiza e Pedro Henrique, por compreenderem minha ausência e intermináveis horas de estudo;

Ao grande amor da minha vida, Augusto, pelo apoio e incentivo ao meu crescimento profissional;

Aos cães, Spock e Brenda, pela companhia constante e amor incondicional;

A minha psicóloga, Nancy Cafisso Vieira;

Ao meu orientador, professor Marcelo Zanutto, pelo incentivo, carinho, pulso firme e conhecimento;

Aos funcionários, residentes, mestrandos, doutorandos e professores do departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL; em especial à residente Andressa Rorato, pela paciência e grande amizade;

A todos os professores do mestrado, em especial ao professor Silvano César da Costa, pela atenção a mim dispensada;

Aos meus colegas de mestrado, pelo carinho, companheirismo e incentivo;

À Dra. Patrícia Neves Batina e a todos os funcionários do Laborcare - Bauru;

A todos os alunos, residentes, funcionários e demais professores da UEL;

Às doutorandas Maria Fernanda Alves Martin e Mirian dos Santos Paixão da Faculdade de Medicina de Botucatu-FMB-UNESP, do Laboratório de Sanidade Animal de Bauru- LASAB.

À Prof^a Dr^a Simone Baldini Lucheis, pesquisadora científica da APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), Laboratório de Sanidade Animal de Bauru - LASAB.

Aos amigos, colegas, chefes imediatos e mediatos da Divisão de Vigilância Sanitária e da Divisão de Vigilância Ambiental da Prefeitura Municipal de Bauru, especialmente ao colega Daniel Godoy Tarcinalli;

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente com meu trabalho e que não foram mencionadas acima;

Muito obrigada.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”*

Fernando Pessoa

CAMPRIGHER, Valéria Medina. **Ocorrência de anticorpos anti-*leishmania* spp em felinos de área endêmica do estado de são paulo**. 60 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ARTIGO I

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma importante zoonose que acomete milhões de pessoas em todo mundo. A resposta imunológica frente à infecção é complexa e determinante na patogenicidade da doença e na variedade de sintomas presentes no hospedeiro vertebrado acometido. Nestes, os protozoários desenvolvem mecanismos de evasão à resposta imune pela inibição das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC-II) e dos mecanismos leishmanicidas intramacrofágicos. O parasito também expressa moléculas em sua superfície, cuja função é protegê-lo das enzimas digestivas no intestino do flebotomíneo. A resposta imunológica frente à infecção por *Leishmania infantum* influencia diretamente na patogenia da doença apresentada nas espécies canina e felina. Os cães são considerados animais susceptíveis à doença por desenvolverem resposta imune predominantemente humoral (Th2) com produção de grande quantidade de imunoglobulinas não protetoras. Os gatos, na ausência de fatores imunossupressores, são resistentes e apresentam resposta imune do tipo celular (Th1) com baixa produção de anticorpos.

Palavras-chave: Leishmania. Resposta imune. Imunidade inata. Imunidade adquirida.

ARTIGO II

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de grande impacto em saúde pública. A infecção nos gatos tem sido relatada nos países onde a doença é endêmica. Seu papel como reservatório não está satisfatoriamente elucidado, embora a transmissão do parasito de um felino infectado para vetor tenha sido reportada por xenodiagnóstico. O objetivo do trabalho foi avaliar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp em animais da espécie felina em área endêmica para LV (Bauru-SP), por meio dos testes sorológicos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e associá-los às variáveis sexo, idade, forma de criação e raça. Foram testados soros de 276 felinos, dos quais 82 foram reagentes pelo método ELISA (29,71%), 17 pelo RIFI (6,15%) e 10 em ambos os testes (3,6%). Não houve diferença estatística significativa entre a soropositividade e as variáveis analisadas ($p > 0,05$), exceto para a variável forma de criação ($p < 0,005$). Não houve concordância entre o resultado dos dois testes, pois o método ELISA é mais sensível que o método RIFI.

Palavras-chave: Leishmaniose. Gato. Sorodiagnóstico. RIFI. ELISA.

CAMPRIGHER, Valéria Medina. **Occurrence of anti-leishmania spp antibodies in felines from the endemic area of the state of São Paulo**. 60 p. Dissertation (Professional Master's degree in Veterinary Clinics) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ARTICLE I

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an important zoonosis that affects millions of people worldwide. The immune response to infection is complex and determinant in the pathogenicity of the disease and in the variety of symptoms present in the affected vertebrate host. In these, protozoa develop mechanisms to evade the immune response by inhibiting major histocompatibility complex molecules (MHC-II) and intramacrophagic leishmanicidal mechanisms. The parasite also expresses molecules on its surface, whose function is to protect it from the digestive enzymes in the gut of the sandfly. The immunological response to *Leishmania infantum* infection directly influences the pathogenesis of the disease present in the canine and feline species. Dogs are considered to be susceptible to disease by developing predominantly humoral (Th2) immune response producing large amounts of non-protective immunoglobulins. Cats, in the absence of immunosuppressive factors, are resistant and present a cellular type (Th1) immune response with low antibody production.

Keywords: Leishmania. Immune response. Innate immunity. Acquired immunity.

ARTICLE II

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis with a great impact on public health. Infection in cats has been reported in countries where the disease is endemic. Its role as reservoir is not satisfactorily elucidated, although transmission of the parasite from an infected feline to vector has been reported by xenodiagnosis. The objective of this study was to evaluate the presence of anti-*Leishmania* spp antibodies in feline species in an area endemic to LV (Bauru-SP), using serological tests for Indirect Immunofluorescence Reaction (IFAT) and ELISA and Associate them with the variables sex, age, lifestyle and breed. Serum of 276 felines were tested, of which 82 were ELISA reagents (29.71%), 17 by IFR (6.15%) and 10 in both tests (3.6%). There was no statistically significant difference between seropositivity and analyzed variables ($p > 0.05$), except for lifestyle ($p < 0.005$). There was no agreement between the results of the two tests, since the ELISA method is more sensitive than the RIFI method.

Key words: Leishmaniasis. Cat. Serodiagnosis. RIFI. ELISA.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultados da análise para determinação dos fatores de risco para LVF, pelos métodos sorológicos RIFI e ELISA, no município de Bauru no ano de 201542
- Tabela 2.** Valores absolutos e relativos dos resultados dos testes sorológicos isoladamente e entre si44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1A. Microrregião de Bauru, do estado brasileiro de São Paulo	46
Figura 1B. Domicílio dos felinos sororreagentes aos testes ELISA e/ou RIFI em Bauru (2015).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCA	Células Apresentadoras de Antígeno
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Grupamento de Diferenciação)
ELISA	<i>Enzyme Liked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
ELISAI	Ensaio Imunoenzimático Indireto
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferon
LCF	Leishmaniose Cutânea Felina
LPG	Lipofosfoglicano
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVF	Leishmaniose Visceral Felina
MHC-II	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
Pe	Peptídeos
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RRP	Receptores de Reconhecimento Padrão
SRD	Sem Raça Definida
Th	T-helper/auxiliares
TLRs	Toll-like
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	CAPÍTULO 1	11
2.1	ARTIGO DE REVISÃO: Aspectos imunológicos da leishmaniose visceral canina e felina	11
2.1.1	INTRODUÇÃO	12
2.1.2	DESENVOLVIMENTO	13
2.1.2.1	Epidemiologia	13
2.1.2.2	Agente etiológico	14
2.1.2.3	Ciclo de vida	14
2.1.2.4	Transmissão	15
2.1.2.5	Aspectos imunológicos	16
2.1.2.6	Resposta imune inata e adquirida	17
2.1.2.7	Caninos	20
2.1.2.8	Felinos	23
2.1.3	CONCLUSÃO	25
2.1.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
2.2	Normas para publicação do artigo	33
3	CAPÍTULO 2	38
3.1	ARTIGO: Ocorrência de anticorpos anti<i>Leishmania spp</i> em felinos em área endêmica do estado de São Paulo	38
3.1.1	INTRODUÇÃO	39
3.1.2	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1.4	CONCLUSÃO	48
3.1.5	REFERÊNCIAS	48
3.2	Normas para publicação do artigo	54

1 INTRODUÇÃO

A presente dissertação está dividida em dois capítulos. Na primeira parte, apresenta-se um artigo de revisão, onde serão abordados aspectos imunológicos da leishmaniose visceral canina e felina. Na segunda parte, outro artigo avaliará a presença anticorpos anti-*Leishmania* spp em felinos pelos métodos de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) no município de Bauru (SP) em 2015.

2 CAPÍTULO 1

2.1 ARTIGO DE REVISÃO

Aspectos imunológicos da leishmaniose visceral canina e felina

Immunological aspects of visceral leishmaniasis canine and feline

Valéria Medina Camprigher^{I*}; Marcelo de Souza Zanutto^{II}

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma importante zoonose que acomete milhões de pessoas em todo mundo. A resposta imunológica frente à infecção é complexa e determinante na patogenicidade da doença e na variedade de sintomas presentes no hospedeiro vertebrado acometido. Nestes, os protozoários desenvolvem mecanismos de evasão à resposta imune pela inibição das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC-II) e dos mecanismos leishmanicidas intramacrofágicos. O parasito também expressa moléculas em sua superfície, cuja função é protegê-lo das enzimas digestivas no intestino do flebotomíneo. A resposta imunológica frente à infecção por *Leishmania infantum* influencia diretamente na patogenia da doença apresentada nas espécies canina e felina. Os cães são considerados animais susceptíveis à doença por desenvolverem resposta imune predominantemente humoral (Th2) com produção de grande quantidade de imunoglobulinas não protetoras. Os gatos, na ausência de fatores imunossupressores, são resistentes e apresentam resposta imune do tipo celular (Th1) com baixa produção de anticorpos.

Palavras-chave: leishmania, resposta imune, imunidade inata, imunidade adquirida.

(I) Médica-veterinária, mestranda em Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), E-mail: val_vet@hotmail.com

* Autora para correspondência

(II) Professor Doutor, departamento de Clínicas Veterinárias, CCA-UEL. E-mail: mzanutto@gmail.com

1 ABSTRACT

2 Visceral leishmaniasis (VL) is an important zoonosis that affects millions of people
3 worldwide. The immune response to infection is complex and determinant in the
4 pathogenicity of the disease and in the variety of symptoms present in the affected vertebrate
5 host. In these, protozoa develop mechanisms to evade the immune response by inhibiting
6 major histocompatibility complex molecules (MHC-II) and intramacrophagic leishmanicidal
7 mechanisms. The parasite also expresses molecules on its surface, whose function is to protect
8 it from the digestive enzymes in the gut of the sandfly. The immunological response to
9 *Leishmania infantum* infection directly influences the pathogenesis of the disease present in
10 the canine and feline species. Dogs are considered to be susceptible to disease by developing
11 predominantly humoral (Th2) immune response producing large amounts of non-protective
12 immunoglobulins. Cats, in the absence of immunosuppressive factors, are resistant and
13 present a cellular type (Th1) immune response with low antibody production.

14 **Key words:** leishmania, immune response, innate immunity, acquired immunity.

15

16 2.1.1 INTRODUÇÃO

17 A leishmaniose visceral (LV) é a terceira doença mais importante transmitida por
18 vetores, acometendo o homem. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS),
19 estima-se que ocorram entre 1,5 a 2 milhões de novos casos de leishmaniose humana
20 anualmente. Contudo, mesmo sendo relatada em 98 países (88 são considerados endêmicos),
21 acredita-se que muitos casos sejam negligenciados, pois em somente 33 deles é de notificação
22 compulsória (PENNISI et al., 2013; PIRAJÁ et al., 2013; MAIA et al., 2015).

23 O Brasil é o país da América Latina com o maior número de casos anuais registrados,
24 sendo a região nordeste considerada a principal zona endêmica da LV (VIDES et al., 2011;
25 MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1 O aumento da prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) no país gera
2 preocupação entre os profissionais que atuam junto aos órgãos de saúde pública, clínicos
3 veterinários da iniciativa privada e na população residente em áreas de risco.

4 Esta revisão tem como objetivo abordar os aspectos imunológicos da Leishmaniose
5 Visceral na espécie canina e felina.

6 7 **2.1.2 DESENVOLVIMENTO**

8 **2.1.2.1 Epidemiologia**

9 A população de felinos domésticos vem aumentando a cada ano nos grandes centros
10 urbanos (MARODIN, 2011; PIRAJÁ et al., 2013).

11 Estudos apontam a possibilidade de o gato, mais que um hospedeiro acidental, ser
12 considerado reservatório, tendo papel fundamental, até agora desconhecido, na epidemiologia
13 dessa zoonose (NASEREDDIN et al., 2008; MAIA et al., 2010; SILVA et al., 2010;
14 TRAINOR et al., 2010; MARODIN, 2011; VIDES et al., 2011; SOBRINHO, 2012). A
15 transmissão do parasito de um gato infectado para o flebotomíneo já foi confirmada por
16 xenodiagnóstico (MAROLI et al., 2007). Sobretudo nos animais com acesso ao exterior de
17 seus domicílios, alguns comportamentos típicos dos felinos podem favorecer a disseminação
18 do parasito, incluindo seu instinto predatório, deslocamentos de até 1,5 km de distância das
19 suas casas, contato com reservatórios silváticos ou sinantrópicos e hábitos crepusculares e
20 noturnos, similares ao do vetor (SIMÕES-MATTOS et al., 2005; SOBRINHO, 2012).

21 A infecção nos gatos (*Felis catus domesticus*) tem sido relatada em vários países onde
22 a doença é endêmica e são naturalmente infectados pelas mesmas espécies de leishmanias que
23 afetam os cães e os humanos em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo
24 (GRAMICCIA & GRADONI, 2005; MAROLI et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al.,
25 2007; MARODIN, 2011; VIDES et al., 2011; PENNISI et al., 2013; NEMATİ et al., 2015). O

1 primeiro caso relatado de leishmaniose visceral felina no Brasil ocorreu na cidade de Cotia,
2 estado de São Paulo, em julho de 2000 (SAVANI et al., 2004). De acordo com SIMÕES-
3 MATTOS et al. (2005), inquéritos epidemiológicos, sorológicos e parasitológicos, realizados
4 em vários países têm demonstrado taxas preocupantes de infecção nos gatos domésticos por
5 *Leishmania* ssp (NEMATI et al., 2015).

6

7 **2.1.2.2 Agente etiológico**

8 Os parasitos causadores da leishmaniose visceral no Brasil são protozoários do gênero
9 *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e duas espécies
10 envolvidas - *L.infantum* (= *L.chagasi*) e *L. amazonenses* (FRANÇA-SILVA et al., 2005;
11 TOLEZANO et al., 2007; DIAS et al., 2011; HOFFMANN et al., 2012). São seres
12 unicelulares, eucariotas heterotróficos e sua reprodução é assexuada e ocorre por fissão
13 binária (DESJEUX, 2004).

14

15 **2.1.2.3 Ciclo de vida**

16 Apresenta ciclo de vida dimórfico: a forma promastigota, no inseto vetor (flebotomo),
17 e a forma amastigota, que é intracelular obrigatória no hospedeiro vertebrado. A forma
18 amastigota, adquirida pelo flebotomíneo durante repasto sanguíneo, é uma estrutura
19 arredondada/ovalada, aflagelar, que se modifica no interior do aparelho intestinal do vetor e
20 adquire a forma infectante promastigota, cuja estrutura é alongada e flagelar. Quando se
21 multiplica no inseto, bloqueia o proventrículo, sendo regurgitada durante novo repasto
22 sanguíneo em outro vertebrado susceptível (DESJEUX, 2004). É então fagocitada por
23 macrófagos, onde multiplica-se por divisão binária, perde o flagelo (amastigotas) ocasionando
24 lise celular macrofágica. Novamente fagocitada, dissemina-se, via linfática ou hematogena,
25 para macrófagos da medula óssea, fígado, baço, rins e intestino (GALATI et al., 1997;

1 BASANO & CAMARGO, 2004; GONTIJO & MELO, 2004; COUTINHO et al., 2005;
2 GRAMICCIA & GRADONI, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; VIDES et al., 2011).

3 O parasito é denominado heteroxênico por completar seu ciclo de vida em dois
4 hospedeiros, sendo a *Lutzomya longipalpis* (flebotomíneo) o hospedeiro invertebrado e os
5 mamíferos (homem, animais domésticos e silvestres), os hospedeiros vertebrados (GALATI
6 et al., 1997; GONTIJO & MELO, 2004; BARATA et al., 2005; GRAMICCIA & GRADONI,
7 2005; MONTEIRO et al., 2005).

8

9 **2.1.2.4 Transmissão**

10 A forma de transmissão de maior importância epidemiológica é a vetorial e, no Brasil,
11 a espécie de flebotomíneo envolvida é a *Lutzomya longipalpis* (BARATA et al., 2005;
12 LAINSON & RANGEL, 2005). O *habitat* natural do vetor foi afetado pela devastação de
13 áreas silvestres para exploração econômica, culminando assim com sua translocação para o
14 meio urbano; fenômeno adaptativo denominado de *trophotaxis* (ALMEIDA et al., 2005;
15 MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SOBRINHO, 2012). Nestas áreas, os flebótomos passaram
16 a habitar o peridomicílio, principalmente de localidades sem saneamento básico, onde há
17 acúmulo de lixo, presença de abrigo de animais, galinheiros e conseqüentemente grande
18 quantidade de matéria orgânica em decomposição (GALATI et al., 1997; DIAS et al., 2003;
19 BASANO & CAMARGO, 2004; DESJEUX, 2004; FRANÇA-SILVA et al., 2005;
20 MONTEIRO et al., 2005). Possuem 0,5 cm de comprimento, cor parda, pernas alongadas e
21 delgadas e corpo piloso, comumente denominado mosquito palha. Mantêm as asas eretas
22 mesmos em repouso e seu voo é saltitante (BASANO & CAMARGO, 2004; OLIVEIRA,
23 2013). Percorrem pequenas distâncias de até 300 metros, não se dispersando mais que um
24 quilômetro do local de criação (NOLI, 1999; BANETH & SOLANO-GALLEGO, 2011;
25 VIEIRA, 2013). Sua ocorrência é maior em períodos de chuvas e temperaturas elevadas

1 (FRANÇA-SILVA et al., 2005) e são mais encontrados no horário compreendido entre 19 e
2 23 horas (DESJEUX, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; OLIVEIRA, 2013).
3 Alimentam-se de seiva de plantas, néctar e frutas, de onde retiram suas fontes de carboidratos.
4 A hematofagia é hábito exclusivo das fêmeas que necessitam de sangue para maturação de
5 seus ovários (DIAS et al., 2003; BARATA et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006;
6 OLIVEIRA, 2013). Picam o hospedeiro vertebrado preferencialmente em zonas glabras tais
7 como plano nasal, pavilhão auricular e regiões inguinal e perianal.

8 A transmissão por transfusão sanguínea (FREITAS et al., 2006), venérea (SILVA et
9 al., 2009) e vertical (PANGRAZIO et al., 2009) já foram relatadas na espécie canina. A
10 transmissão por mordeduras (VIEIRA, 2013), picada de pulgas (FERREIRA et al., 2009) e
11 carrapatos (COUTINHO et al., 2005; VIOL et al., 2016) poderiam explicar a presença de
12 casos clínicos de leishmaniose visceral canina autóctones em áreas não endêmicas na ausência
13 de flebotomíneos. Em humanos, a transmissão por compartilhamento de agulhas é razão da
14 grande coinfeção HIV-leishmaniose entre usuários de drogas e foi descrito na Europa
15 (GRIENSVEN et al., 2014).

16

17 **2.1.2.5 Aspectos imunológicos**

18 Algumas características relacionadas ao protozoário como sua espécie, zimodemo
19 (agrupamento de isoenzimas com determinada mobilidade eletroforética) e carga parasitária
20 no hospedeiro vertebrado são determinantes na patogenia desencadeada (SOLANO-
21 GALLEGO et al., 2009). Os parasitos expressam glicoconjugados em sua superfície,
22 considerados fatores de virulência, que permitem a endocitose pelos macrófagos ou a ligação
23 das opsoninas (complemento, anticorpos, entre outros) para posterior fagocitose. No vetor, o
24 parasito desenvolve mecanismos de sobrevivência pela indução da secreção da membrana
25 peritrófica (proteoglicanos e quitina), retardando a difusão e ação das proteases sobre os

1 parasitos; pela fixação das nectomonas ao estômago através de lipofosfoglicanos (LPG) à sua
2 superfície, pela obstrução física e degradação da válvula estemodal sob ação das quitinases
3 produzidas pelas haptomonas; pela produção do gel secretor de promastigotas
4 (proteofosfoglicanos filamentosos) pelas leptomonas; pela secreção de neuropeptídios que
5 diminuem o peristaltismo intestinal do inseto (BATES, 2007; SÉGUIN & DESCOTEAUX,
6 2016).

7 Nos hospedeiros vertebrados, os parasitos desenvolvem mecanismos de evasão à
8 resposta imunitária inata, como a alteração do sistema complemento, inibição das Moléculas
9 do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC-II), evasão aos mecanismos
10 intramacrofágicos, especificamente às moléculas com capacidade leishmanicida (Óxido
11 Nítrico - NO e hidrolases), modulação do perfil de citocinas e indução da atividade de
12 linfócitos T reguladores (ALVAR et al., 2012; ORDEIX & SOLANO-GALLEGO, 2013).

13

14 **2.1.2.6 Resposta imune inata e adquirida**

15 A imunidade inata representa uma resposta rápida a um número grande número de
16 estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas
17 (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células Natural Killer) e moléculas solúveis,
18 independentemente de contato prévio com agentes agressores (CRUVINEL et al., 2010).

19 A fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema
20 complemento, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata. São
21 ativados por estímulos específicos, comumente encontrados na superfície de microorganismos
22 que constituem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por interação com
23 diferentes receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (RRP),
24 dentre os quais a família dos receptores Toll-like (TLRs). Os TLRs destacam-se por seu papel
25 central na ligação a patógenos e iniciação da resposta inflamatória. Esses receptores estão

1 presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (ENGWERDA et
2 al., 2004; CRUVINEL et al., 2010; KAWAI & AKIRA, 2011; ORDEIX & SOLANO-
3 GALLEGO, 2013).

4 A inflamação, como resposta a um organismo invasor ou lesão tecidual, garante que os
5 mecanismos de defesas concentrem-se rapidamente no local agredido. A presença de
6 microrganismos é detectada por células sentinelas (macrófagos, células dendríticas,
7 mastócitos), dispersas por todo o organismo e encontradas, em maior número, abaixo das
8 superfícies corpóreas. Seus receptores (TLRs) ligam-se aos PAMPs, expressos pelos
9 microrganismos ou pelas alarminas dos tecidos lesados e ativam o fator de transcrição gênico
10 denominado Fator Nuclear Kappa no interior da célula, que, sob ação da enzima Caspase 1,
11 transformam moléculas precursoras em ativas (Interleucina 1-IL1, IL-6, Fator de Necrose
12 Tumoral-TNF- α , prostaglandinas e leucotrienos) (TIZARD, 2008; ORDEIX & SOLANO-
13 GALLEGO, 2013).

14 A resposta imune adaptativa, ao contrário da resposta inata, depende da ativação de
15 células especializadas e suas principais características são: especificidade e diversidade de
16 reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a
17 componentes do próprio organismo (CRUVINEL et al., 2010).

18 Fragmentos antigênicos (peptídeos - Pe) só induzem uma resposta imune se acoplados
19 às MHC-II das células apresentadoras de antígeno - CCA (macrófagos, células dendríticas e
20 linfócitos B) e estas, às moléculas marcadoras de superfície celular - CD 4 (Cluster of
21 Differentiaton) dos linfócitos T-helper/auxiliarers (Th). Contudo, moléculas co-estimuladoras
22 adicionais são necessárias para que a resposta imune adquirida seja desencadeada. Moléculas
23 de superfície de linfócitos Th (CD 154) ligam-se às das CAA (CD 40), que estimulam novas
24 moléculas do linfócito Th (CD 28) a se ligarem às das CCA (CD 80 ou CD 86). Assim, as
25 CAA produzem citocinas (IL 1, IL 6, IL 8, IL 12, TNF- α) que determinam o tipo de resposta

1 imune desencadeada pelo linfócito Th. Além das moléculas co-estimuladoras, moléculas de
2 adesão (integrinas) estimulam o contato entre linfócitos Th e CAA, formando assim uma
3 estrutura supramolecular, denominada sinapse imunológica (OLIVIER et al., 2005; TIZARD,
4 2008; FREITAS-SILVA et al., 2014; PAPADOGIANNAKIS & KOUTINAS, 2015).

5 A ativação do sistema imune celular é a base da resistência dos hospedeiros frente a
6 uma infecção. Quando as células Th1 são ativadas, ocorre a produção de citocinas, IFN γ ,
7 TNF- α , IL-2, fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), IL-3 e
8 IL-12, que promoverão ativação de macrófagos e estímulo da imunidade celular pela ativação
9 de outras células ou por sua proliferação, eliminando assim a infecção. Linfócitos T induzem
10 produção de citocinas ativadoras de macrófagos e produtoras de fatores antimicrobianos:
11 oxigênio reativo intermediário, nitrogênio reativo intermediário, hidrolases lisossomais,
12 peptidases neutras e óxido nítrico, sendo esse último, o mais importante com característica
13 leishmanicida. Quando a infecção está associada à indução das células Th2, há produção de
14 IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que irão mediar a imunidade humoral e as reações alérgicas. A IL-4
15 relaciona-se com produção de anticorpos da classe de Imunoglobulinas E (IgE), IgG; a IL-5 é
16 importante para diferenciação, multiplicação e ativação de eosinófilos, enquanto a IL-10 inibe
17 a síntese de citocinas produzida pelos macrófagos, diminuindo a função destas células como
18 apresentadoras de antígeno, além de inibir eventos metabólicos associados a sua ativação,
19 interferindo na atividade leishmanicida dos macrófagos (ALMEIDA et al., 2005; BANETH &
20 SOLANO-GALLEGO, 2011; VIEIRA, 2013).

21 Depois da inoculação das promastigotas na derme, as CAA processam e transportam o
22 antígeno para linfonodos regionais para células T-*priming*. Na sequência, células T efetoras
23 armadas retornam para a pele, no sítio de inoculação, contribuindo assim decisivamente para a
24 resposta imune contra a leishmania (BANETH & SOLANO-GALLEGO, 2011; VIEIRA,
25 2013).

1 2.1.2.7 Caninos

2 Cães infectados por *Leishmania* spp apresentam um misto de resposta imune celular
3 (Th1) e humoral (Th2). Sabe-se que quando esse equilíbrio tende para resposta Th2, os cães
4 tornam-se susceptíveis à doença e quando tende para Th1, são resistentes. Na resposta Th1, as
5 citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α induzem ativação macrofágica com produção de óxido nítrico;
6 substância com potente ação leishmanicida. Em contraste, na resposta Th2, IL-10 e IL-4 estão
7 envolvidos na disseminação do parasito com aumento de linfócitos B e
8 hipergamaglobulinemia (ORDEIX & SOLANO-GALLEGO, 2013).

9 ALMEIDA et al. (2005) em estudos com cães, compararam níveis de IgE, IgG1, IgG2
10 em animais sintomáticos e assintomáticos/saudáveis em área endêmica para leishmaniose
11 visceral canina. Observaram aumento de IgE, IgG1 e IgG2 nos cães sintomáticos em relação
12 aos assintomáticos e saudáveis. Porém, concluíram que apenas 36% deles apresentaram
13 aumento policlonal das imunoglobulinas. Foi constatado também um maior nível de IgE em
14 cães sintomáticos para LVC quando comparado aos saudáveis, menor nível da IgG entre cães
15 saudáveis e assintomáticos, quando comparado aos sintomáticos e níveis elevados de IgG1 e
16 IgG2 em cães sintomáticos, quando comparados aos assintomáticos e saudáveis.

17 CARDOSO et al. (2007) compararam níveis de IgG, IgG1 e IgG2 em dois grupos de
18 cães-saudáveis/assintomáticos e sintomáticos para LVC. Observaram que os níveis das
19 imunoglobulinas foram significativamente maiores no segundo grupo, principalmente da
20 IgG2 e observou também aumento na relação IgG2/IgG1. LEANDRO et al. (2001)
21 compararam níveis de IgG2 e IgG1 entre cães naturalmente infectados por *L. infantum* e
22 apresentando sintomatologia clássica de LVC e animais saudáveis (grupo controle).
23 Observaram altos níveis de IgG2 quando comparados aos animais do grupo controle, porém
24 observaram o mesmo nível de IgG1 em ambos os grupos.

1 CARSON et al. (2010) testaram associação entre IgG1 e IgG2 utilizando anticorpos
2 policlonais comercialmente disponíveis. A análise foi realizada para detectar associações
3 entre níveis absolutos e razões de IgG1 e IgG2 e uma gama de medidas de resultados de
4 infecção (sinais clínicos de leishmaniose, PCR de medula óssea e cultura parasitológica).
5 Observaram associações inconsistentes entre níveis de subclasses de IgGs e resultados
6 parasitológicos; níveis mais elevados de IgG1 e IgG2 em cães clinicamente sintomáticos
7 quando comparados aos assintomáticos e níveis similares de proporção de IgG2/IgG1 em cães
8 sintomáticos e assintomáticos. A interpretação de subclasses de IgG na resposta canina ainda
9 não está clara. Referem ainda que em alguns estudos ocorra um aumento de IgG2 em relação
10 à IgG1 em animais assintomáticos e, em outros, observaram exatamente o oposto. Estudos
11 que avaliaram IgG1 e IgG2 utilizando anticorpos policlonais frequentemente alcançaram
12 resultados conflitantes devido à falta de especificidade dos reagentes comerciais (DAY,
13 2007).

14 O IFN- γ age diferenciando as células Th1 e inibindo as Th2, enquanto a IL-4 age
15 diferenciando Th2 e inibindo Th1, ação potencializada pela citocina IL-10. As citocinas
16 presentes no ambiente de estimulação, o tipo de célula apresentadora de antígeno e a
17 natureza/quantidade de antígenos determinam a diferenciação para Th1, defesa mediada por
18 fagócito (microrganismo intracelular), bem como a Th2, defesa mediada por
19 IgE/eosinófilo/mastócito (NOLI, 1999; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007; BANETH &
20 SOLANO-GALLEGO, 2011; MARODIN, 2011; VIDES et al., 2011; PENNISI et al., 2013).

21 RODRÍGUEZ-CORTÉS et al. (2007) relataram forte associação entre resposta
22 humoral e doença em cães devido à formação de imunocomplexos circulantes. Foram
23 avaliados os níveis de IgG, IgM e IgA em cães de região altamente endêmica para LVC e
24 observaram que todas estavam bem aumentadas em cães sintomáticos, quando comparados
25 aos cães assintomáticos, sendo que a classe de imunoglobulina com aumento mais expressivo

1 foi a IgG. Essas se depositaram no endotélio vascular causando vasculite (uveíte, poliartrite,
2 glomerulonefrite, polimiosite) e trombocitopenia imunomediada (BANETH & SOLANO-
3 GALLEGO, 2011). Segundo ALMEIDA et al. (2005), as articulações úmero-rádio-ulnar, do
4 carpo, tarso e fêmuro-tíbio-patelar são mais acometidas. Ao exame radiográfico, visualizou-se
5 poliartrite erosiva com edema dos tecidos moles adjacentes. O líquido sinovial mostrou
6 alterações físico-químicas e reação inflamatória mononuclear, permitindo identificar o
7 parasito no exame citopatológico.

8 Desse modo, a evolução da doença, a quantidade e variabilidade de sintomas
9 apresentados pelo cão (assintomático, oligossintomático e polissintomático) estão diretamente
10 relacionadas ao balanço entre as citocinas as quais determinam o padrão de resposta
11 imunológica envolvida (ALMEIDA et al., 2005).

12 Na LVC, há elevada prevalência de infecção subclínica, onde os animais não
13 desenvolvem sinais clínicos. Podem manifestar a doença de forma autolimitante ou como
14 doença grave/fatal, apresentando ampla gama de fenômenos imunológicos e clínicos
15 (VIEIRA, 2013). Importante ressaltar que, mesmo sendo assintomáticos, os cães são fontes de
16 infecção para o vetor e, conseqüentemente, para o homem (GONTIJO & MELO, 2004).

17 No Brasil, a forma assintomática da doença é encontrada com taxas entre 40 a 60% da
18 população canina soropositiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Assim, os níveis de
19 infecção não devem ser medidos pelos sinais clínicos e sim, por meio de exames sorológicos e
20 moleculares (BANETH & SOLANO-GALLEGO, 2011).

21 INIESTA et al. (2005) relataram que não se pode afirmar que na LV e na LVC a
22 resposta Th1 esteja relacionada com resistência e cura e que a Th2 com desenvolvimento de
23 sinais clínicos; entretanto, um equilíbrio entre ambas as respostas pode ser importante para o
24 controle da replicação do parasito.

1 SANCHEZ et al. (2004) compararam a estrutura histológica hepática e esplênica de
2 cães sintomáticos e assintomáticos de áreas endêmicas. Foram observados granulomas
3 maduros e bem organizados em cães assintomáticos com o núcleo das células de Kupffer
4 rodeadas por linfócitos. Nos cães sintomáticos, observaram muitas células de Kupffer
5 carregadas de parasitos espalhados por todo o órgão e um profuso infiltrado mononuclear
6 desorganizado. Níveis de Th1, CD4+ e CD8+ estavam muito maiores nos assintomáticos. O
7 parênquima esplênico de cães sintomáticos mostrou ausência de organização topográfica e
8 celular quando comparados aos dos cães assintomáticos.

9

10 **2.1.2.8 Felinos**

11 O papel do gato como reservatório ainda é duvidoso, embora a transmissão do parasito
12 de um gato infectado para o flebotomíneo tenha sido confirmada por xenodiagnóstico
13 (MAROLI et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; SHERRY et al., 2011; PENNISI
14 et al., 2013; CHATZIS et al., 2014).

15 Diferentemente dos cães, anticorpos específicos anti-*Leishmania* spp estão ausentes ou
16 são muito baixos no soro nesta espécie, o que indicaria que a maioria dos felinos não sofre de
17 desequilíbrio da resposta imunitária e superprodução de anticorpos. Acredita-se que gatos
18 infectados possuam certo grau de resistência natural à enfermidade, provavelmente
19 relacionada a fatores genéticos (COSTA et al., 2010). A resposta imunológica dos gatos frente
20 à enfermidade parece ser diferente daquela desenvolvida nos cães. Enquanto os caninos
21 apresentam predominantemente uma resposta humoral, a resposta dos felinos parece ser
22 predominantemente celular, na ausência de fatores imunossupressores, explicando a presença
23 de um maior número de animais assintomáticos em relação aos que desenvolveram quadro
24 clínico dentro de uma população (GOMES, 2015). A resposta imune celular dessa espécie
25 seria efetiva o suficiente para controlar a infecção e conferir certo grau de resistência natural,

1 razão pela qual apresentam sintomatologia cutânea. Nos casos onde ocorrem eventos
2 imunossupressores, tais como infecções por retrovírus, neoplasias, diabetes mellitus, doenças
3 autoimunes, terapia com corticoides e outras drogas imunossupressoras, a disseminação e
4 visceralização do parasito provoca sintomatologia sistêmica (RÜFENACHT et al., 2005;
5 SIMÕES-MATTOS et al., 2005; MAROLI et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007;
6 TRAINOR et al., 2010; SHERRY et al., 2011; PENNISI et al., 2013, VIEIRA, 2013;
7 CHATZIS et al., 2014).

8 SOBRINHO et al. (2012) afirmaram que os vírus da imunodeficiência felina e da
9 leucemia felina são capazes de induzir à perda progressiva de linfócitos T-CD4+ e T-CD8+
10 devido ao tropismo por linfócitos e macrófagos, permitindo infecções crônicas e recorrentes.
11 Entretanto, MAIA et al. (2010) não observaram tal associação. Afirmaram que os gatos
12 mostraram susceptibilidade ao parasito, não havendo associação com outras doenças
13 imunossupressoras.

14 Não existem estudos efetivos acerca da resposta imunitária face à infecção por *L.*
15 *infantum* nos gatos (PENNISI et al., 2013). O que se aborda é o que está sendo estudado nos
16 cães. SIMÕES-MATTOS et al. (2005), no Ceará, constataram que o método sorológico não é
17 ideal para fins de diagnóstico nos felinos. Nesse estudo, anticorpos não foram detectados por
18 métodos sorológicos convencionais em gatos com lesões dermatológicas ativas. As
19 soroconversões ocorreram quando essas estavam em estágio de resolução e o pico de
20 anticorpos ocorreu quando as lesões estavam regredindo. Segundo MAIA et al. (2010), a
21 detecção do felino infectado torna-se difícil, pois o sorodiagnóstico parece não ser um exame
22 com boa sensibilidade para essa espécie. A baixa quantidade de anticorpos produzida pelos
23 gatos poderia estar relacionada com o fato de não sofrerem desequilíbrio do seu *status*
24 imunológico.

25

1 2.1.3 CONCLUSÃO

2 A resposta imunológica frente à infecção por *Leishmania infantum* influencia
3 diretamente na patogenia da doença apresentada nas duas espécies, o que se sugere,
4 determinará a resistência - resposta imune celular predominante, característica dos felinos; ou
5 a susceptibilidade - resposta imune humoral predominante, característica dos caninos.

6

7 2.1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 ALMEIDA, M.A. et al. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with
9 *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.106, n.1-2, p.151-
10 8, 2005.

11 ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**,
12 v.7, n.5, 2012.

13 BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. (Ed). **Infectious**
14 **Diseases of the Dog and Cat**, 4.th. St Louis: Saunders Elsevier, p.734-49, 2011.

15 BARATA, R.A. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área
16 endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de**
17 **Medicina Tropical**, v.38, n.5, p.421-5, 2005.

18 BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico,
19 epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3,
20 p.328-37, 2004.

21 BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand
22 flies. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.10, p.1097-106, 2007.

23 CARDOSO, L. et al. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally
24 infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and**
25 **Immunopathology**, v.117, n.1-2, p.35-41, 2007.

- 1 CARSON, C. et al. Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of
2 canine IgG1 and IgG2, and associations with infection outcome in *Leishmania infantum*
3 naturally infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.133, n.2-4,
4 p.264-68, 2010.
- 5 CHATZIS, M.K. et al. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in
6 different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, v.202, n.3-4,
7 p.217-25, 2014.
- 8 COSTA, T.A.C. et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para
9 leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**,
10 v.47, n.3, p.213-7, 2010.
- 11 COUTINHO, M.T.Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the
12 epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.1-2, p.149-
13 55, 2005.
- 14 CRUVINEL, W.M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com
15 ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira**
16 **de Reumatologia**, v.50, n.4, p.434-47, 2010.
- 17 DAY, M.J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and
18 analysis of pitfalls in interpretation. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.1-2, p.2-8, 2007.
- 19 DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative**
20 **Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.27, n.5, p.305-18, 2004.
- 21 DIAS, E.S. et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu,
22 state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.176, n.2-3, p.101-11, 2011.
- 23 DIAS, F.O.P. et al. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis*
24 (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.5,
25 p.1373-80, 2003.

- 1 ENGWERDA, C.R. et al. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental
2 visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v.20 n.11, p.524-30, 2004.
- 3 FERREIRA, M.G. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp.
4 **Veterinary Parasitology**, v.165, n.1-2, p.150-4, 2009.
- 5 FRANÇA-SILVA, J.C. et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of
6 transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality,
7 Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.131, n.3-4, p.213-20, 2005.
- 8 FREITAS, E. et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs:
9 potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v.137,
10 n.1-2, p.159-67, 2006.
- 11 FREITAS-SILVA, R. et al. Targeting dendritic cells as a good alternative to combat
12 *Leishmania* spp. **Frontiers in Immunology**, v.5, p.604, 2014.
- 13 GALATI, E.A.B. et al. Estudo de flebotomíneos (*Diptera: Psychodidae*) em foco de
14 leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**,
15 v.31, n.4, p.378-90, 1997.
- 16 GOMES, P.I.S. **Detecção da infecção por *Leishmania* spp., em gatos da área metropolitana**
17 **de Lisboa, através de técnicas de diagnóstico serológico (IFI e ELISA) e de uma técnica**
18 **molecular (qPCR) aplicada a células conjuntivais e a sangue.** 2015. 155f. Dissertação
19 (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de
20 Lisboa.
- 21 GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e
22 perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338-49, 2004.
- 23 GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and
24 approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v.35, n.11-12,
25 p.1169-80, 2005.

- 1 GRIENSVEN, J. et al. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. **Clinical**
2 **Microbiology and Infection**, v.20, n.4, p.286-299, 2014.
- 3 HOFFMANN, A. R. et al. *Leishmania amazonensis* in dog with clinical diagnosis of visceral
4 leishmaniasis in Paraná State, Brazil - a case report. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.6,
5 supl 2, p.3265-70, 2012.
- 6 INIESTA, L. et al. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine
7 leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.103, n.1-2, p.77-81,
8 2005.
- 9 KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in
10 infection and immunity. **Immunity**, v.34, n.5, p.637-50, 2011.
- 11 LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American
12 visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto**
13 **Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.811-27, 2005.
- 14 LEANDRO, C. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response
15 in natural and experimental canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and**
16 **Immunopathology**, v.79, n.3-4, p.273-84, 2001.
- 17 MAIA, C. et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region,
18 Portugal. **Veterinary Parasitology**, v.174, n.3-4, p.336-40, 2010.
- 19 MAIA, C.S. et al. Neurological disease in human and canine leishmaniasis: clinical features
20 and immunopathogenesis. **Parasite Immunology**, v.37, n.8, p.385-93, 2015.
- 21 MARODIN, N.B. **Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pela**
22 **Leishmania spp. nos felinos domésticos de uma região periurbana Distrito Federal.**
23 2011. 69f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina
24 Veterinária, Universidade de Brasília.

- 1 MAROLI, M. et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania*
2 *infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.145, n.3-4, p.357-60, 2007.
- 3 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância
4 Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**, Brasília:
5 Editora do Ministério da Saúde, 2014.
- 6 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância
7 Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**, Brasília:
8 Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- 9 MONTEIRO, E.M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina
10 em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**,
11 v.38 n.2, p.147-52, 2005.
- 12 NASEREDDIN, A. et al. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation.
13 **Veterinary Parasitology**, v.158, n.4, p.364-9, 2008.
- 14 NEMATI, T. et al. Study on *Leishmania* infection in cats from Ahar, East Azerbaijan
15 Province and North West Iran by parasitological, serological and molecular methods. **Asian**
16 **Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, n.1, p.40-3, 2015.
- 17 NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, v.9, n.2, p.16-24, 1999.
- 18 OLIVEIRA, D.F. **Identificação dos criadouros naturais de *Lutzomyia longipalpis***
19 **(DIPTERA: PSYCHODIDAE) em área endêmica para a Leishmaniose Visceral, do**
20 **estado da Bahia, Brasil**. 2013. 62f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e
21 Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.
- 22 OLIVIER, M. et al. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the
23 host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2,
24 p.293-305, 2005.

- 1 ORDEIX, L.; SOLANO-GALLEGO, L. What is new on host-parasite interaction and
2 immunity in canine Leishmaniosis? In: INTERNATIONAL SCIVAC CONGRESS CANINE
3 LEISHMANIOSIS AND OTHER VECTOR-BORNE DISEASES: OUR CURRENT STATE
4 OF KNOWLEDGE, 2013. **Proceedings...** Pisa: Società Culturale Italiana Veterinari per
5 Animali da Compagnia, 2013, p.53.
- 6 PANGRAZIO, K.K. et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in
7 transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected
8 bitches. **Veterinary Parasitology**, v.165, n.3-4, p.327-31, 2009.
- 9 PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F. Cutaneous immune mechanisms in canine
10 leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and**
11 **Immunopathology**, v.163, n.3-4, p.94-102, 2015.
- 12 PENNISI, M.G. et al. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and
13 management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.15, n.7, p.638-42, 2013.
- 14 PIRAJÁ, G.V. et al. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**,
15 v.20, n.2, p.203-16, 2013.
- 16 RODRÍGUEZ-CORTÉS A. et al. A long term experimental study of canine visceral
17 leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.6, p.683-93, 2007.
- 18 RÜFENACHT, S. et al. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. **The Veterinary**
19 **Record**, v.156, n.17, p.542-5, 2005.
- 20 SANCHEZ, M.A. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of
21 symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **American**
22 **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, n.6, p.618-24, 2004.
- 23 SAVANI, E.S. et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania*
24 (*Leishmania*) *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo
25 State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.120, n.3, p.229-33, 2004.

- 1 SÉGUIN, O.; DESCOTEAUX, A. Leishmania, the phagosome, and host responses: The
2 journey of a parasite. **Cellular Immunology**, v.309, p.1-6, 2016.
- 3 SHERRY, K. et al. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in
4 cats from the Island of Ibiza (Spain). **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.11, n.3, p.239-
5 45, 2011.
- 6 SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary**
7 **Parasitology**, v.160, n.1-2, p.55-9, 2009.
- 8 SILVA, S.M. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania*
9 (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**,
10 v.174, n.1-2, p.150-4, 2010.
- 11 SIMÕES-MATTOS, L. et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental
12 infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.3-4, p.199-208,
13 2005.
- 14 SOBRINHO, L.S. et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline
15 Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic
16 area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.187, n.1-2, p.302-6,
17 2012.
- 18 SOLANO-GALLEGO, L. et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in
19 ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical**
20 **Medicine and Hygiene**, v.76, n.4, p.676-80, 2007.
- 21 SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and
22 prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.165, n.1-2, p.1-18, 2009.
- 23 TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

- 1 TOLEZANO, J.E. et al. The first records of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs
2 (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba
3 County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.149, n.3-4, p.280-4, 2007.
- 4 TRAINOR, K.E. et al. Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. **Veterinary**
5 **Pathology**, v.47, n.6, p.1076-81, 2010.
- 6 VIDES, J.P. et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an
7 endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.178, n.1-2,
8 p.22-8, 2011.
- 9 VIEIRA, A.M.M. **Leishmaniose canina: estudos de casos clínicos**. 2013. 93f. Dissertação
10 (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- 11 VIOL, M.A. et al. Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries,
12 and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. **Parasitology**
13 **Research**, v.115, n.9, p.3479-84, 2016.

2.2 Normas para publicação do artigo

Revista Ciência Rural

1. Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica editados em idioma Português ou Inglês, todas as linhas deverão ser numeradas e paginados no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297 mm, com no máximo, 25 linhas em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5 cm, fonte Times New Roman, tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações. Cada figura e ilustração deverá ser enviado em arquivos separados e constituirá uma página. Tabelas, gráficos e figuras não poderão estar com apresentação paisagem.

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. (Modelo .doc, .pdf).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. (Modelo .doc, pdf).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. (Modelo .doc, pdf).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista (www.scielo.br/cr).

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave e resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. The practice of large animal surgery. Philadelphia: Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros. Manaus: INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. The thyroid. Baltimore: Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. Sampling techniques. 3.ed. New York: John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte. São Paulo: Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

Sempre que possível o autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers) conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Product Research, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em:

<[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X (00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. *Ciência Rural*, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. Anais... Santa Maria: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad). 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. Indústria da lactose. São Paulo: Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico. São Paulo: Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. Proceedings...

Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Capturado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. Transgênicos. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Capturado em 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>.

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. *Maturitas*, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. Anais... Corrientes: Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do (s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist pdf ou doc)

14. A taxa de tramitação é de R\$ 80,00 e a de publicação é de R\$ 100,00 por página impressa. A taxa de publicação somente deverá ser paga após a revisão final das provas do manuscrito pelos autores. Professores do Centro de Ciências Rurais e os Programas de Pós-graduação do Centro têm os seus artigos previamente pagos pelo CCR, estando isentos da

taxa de publicação. Trabalhos submetidos por esses autores, no entanto, devem pagar a taxa de tramitação. No caso de impressão colorida, todos os trabalhos publicados deverão pagar um adicional de R\$ 600,00 por página colorida impressa, independentemente do número de figuras na respectiva página.

Os pagamentos poderão ser efetuados por:

a) Transferência/depósito no Banco do Brasil, Agência 1484-2, Conta Corrente 36.189-5 em nome da FATEC (CNPJ: 89.252.431/0001-59) - Projeto 96945. A submissão do artigo obrigatoriamente deve estar acompanhada da taxa de tramitação, podendo ser enviada via fax (55 3220 8695/3220 8698) ou ainda enviado por e-mail (cienciarural@mail.ufsm.br) para que se possa fazer a verificação e prosseguir com a tramitação do artigo (Em ambos os casos o nome e endereço completo são obrigatórios para a emissão da fatura).

b) Solicitação de fatura (.doc ou .pdf). Nessa modalidade o formulário disponível deverá ser encaminhado devidamente preenchido via e-mail ou fax (55 3220 8695/3220 8698) para que possamos encaminhar a solicitação a Fundação que administra os nossos recursos e esta encaminhará a fatura ao endereço especificado no formulário.

c) O pagamento da taxa de tramitação também pode ser feito por meio online através de cartão de crédito (VISA) através deste link

15. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

16. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

17. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

Critérios de avaliação

Todos os trabalhos submetidos são inicialmente examinados pela equipe CR, comitê editorial e de área e então enviados a dois avaliadores ad hoc no mínimo. As revisões são submetidas normalmente para três consultores ad hoc.

3 CAPÍTULO 2

3.1 ARTIGO

Ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* spp em felinos em área endêmica do estado de São Paulo

Occurrence of anti-*Leishmania* spp antibodies in felines in an endemic area of the state of São Paulo

V.M. Camprigher¹, A.M.R.N. Matos², F.P. Ferreira³, P.N. Batina⁴, S.C. Costa⁵, I.T. Navarro⁶, M.S. Zanutto⁷

¹Médica-veterinária, mestranda em Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), e-mail: val_vet@hotmail.com

²Médica-veterinária, mestranda do programa de Ciência Animal, departamento de Medicina Veterinária Preventiva, CCA-UEL, e-mail: andressarorato@gmail.com

³Médica-veterinária, doutoranda do programa de Ciência Animal, departamento de Medicina Veterinária Preventiva, CCA-UEL, e-mail: nandaferreiravet@gmail.com

⁴Médica-veterinária, proprietária do Laboratório Veterinário Laborcare, e-mail: laborcare@laborcare.com.br

⁵Professor Doutor, departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas (CCE)-UEL, e-mail: silvano@uel.br

⁶Professor Doutor, departamento de Medicina Veterinária Preventiva, CCA-UEL, e-mail: italmar@uel.br

⁷Professor Doutor, departamento de Clínicas Veterinárias, CCA-UEL, e-mail: mzanutto@gmail.com

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de grande impacto em saúde pública. A infecção nos gatos tem sido relatada nos países onde a doença é endêmica. Seu papel como reservatório não está satisfatoriamente elucidado, embora a transmissão do parasito de um felino infectado para vetor tenha sido reportada por xenodiagnóstico. O objetivo do trabalho foi avaliar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp em animais da espécie felina em área endêmica para LV (Bauru-SP), por meio dos testes sorológicos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e associá-los às variáveis sexo, idade, forma de criação e raça. Foram testados soros de 276 felinos, dos quais 82 foram reagentes pelo método ELISA (29,71%), 17 pelo RIFI (6,15%) e 10 em ambos os testes (3,6%). Não houve diferença estatística significativa entre a soropositividade e as variáveis analisadas ($p > 0,05$), exceto para a variável forma de criação ($p < 0,005$). Não houve concordância entre o resultado dos dois testes, pois o método ELISA é mais sensível que o método RIFI.

Palavras-chave: Leishmaniose. Gato. Sorodiagnóstico. RIFI. ELISA.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis with a great impact on public health. Infection in cats has been reported in countries where the disease is endemic. Its role as reservoir is not satisfactorily elucidated, although transmission of the parasite from an infected feline to vector has been reported by xenodiagnosis. The objective of this study was to evaluate the presence of anti-*Leishmania* spp antibodies in feline species in an area endemic to LV (Bauru-SP), using serological tests for Indirect Immunofluorescence Reaction (IFAT) and ELISA and Associate them with the variables sex, age, lifestyle and breed. Serum of 276 felines were tested, of which 82 were ELISA reagents (29.71%), 17 by IFR (6.15%) and 10 in both tests (3.6%). There was no statistically significant difference between seropositivity and analyzed variables ($p > 0.05$), except for lifestyle ($p < 0.005$). There was no agreement between the results of the two tests, since the ELISA method is more sensitive than the RIFI method.

Key words: Leishmaniasis. Cat. Serodiagnosis. RIFI. ELISA.

3.1.1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades infecciosas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Infectam em torno de 12 milhões de pessoas em todo mundo e colocam outras 350 milhões sob o risco de infecção. Estima-se que ocorram entre 1,5 a 2 milhões de novos casos de leishmaniose humana anualmente, sendo 500 mil casos de Leishmaniose Visceral e 1,5 milhão de Leishmaniose Cutânea (Alvar *et al.*, 2012).

O Brasil é o país da América Latina com o maior número de casos anuais registrados, sendo a região nordeste considerada a principal zona endêmica da Leishmaniose Visceral nas Américas (Ministério da Saúde, 2017). Atualmente, tem sido apontada como doença reemergente em evidente processo de transição epidemiológica, com aumento de casos nas áreas endêmicas e a expansão geográfica para estados da região sul do Brasil, em franco processo de urbanização (Ministério da Saúde, 2006). No Brasil, nas regiões consideradas endêmicas, a prevalência da leishmaniose felina encontrada variou de 0 a 62,75% na RIFI e de 0 a 72,55% no ELISA (Rossi 2007; Figueiredo *et al.*, 2009; Bresciani *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010; Vides, 2010; Coelho *et al.*, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012; Cardia *et al.*, 2013; Martin, 2013; Sousa *et al.*, 2014; Noé *et al.*, 2015). Inquéritos epidemiológicos realizados em vários países têm demonstrado taxas preocupantes de infecção nos gatos domésticos (Nasereddin *et*

al., 2008, Diakou *et al.*, 2009; Sarkari *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2010; Sherry *et al.*, 2011; Longoni *et al.*, 2012; Pennisi *et al.*, 2012; Garrido, 2012; Spada *et al.*, 2013; Chatzis *et al.*, 2014; Gomes, 2015; Nemati *et al.*, 2015).

Os felinos são naturalmente infectados pelas mesmas espécies de leishmanias que afetam os cães e os humanos em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo (Martin, 2013; Nemati *et al.*, 2015). A transmissão do parasito de um gato infectado para o flebotomíneo já foi confirmada por xenodiagnóstico (MAROLI *et al.*, 2007). Estudos apontam a possibilidade de o gato ser considerado reservatório, tendo assim papel fundamental na epidemiologia dessa zoonose (Sobrinho *et al.*, 2012). A justificativa do trabalho é alertar os médicos-veterinários para a importância da leishmaniose visceral na espécie felina e para que a insira na lista de seus diagnósticos diferenciais. O objetivo do trabalho foi avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* spp em felinos de região endêmica (Bauru-SP) pelas técnicas sorológicas de RIFI e ELISA em 2015.

3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

O local de estudo foi o município de Bauru (Latitude 22°18'52" S; Longitude 49°03'38" W), estado de São Paulo, região considerada endêmica para leishmaniose visceral. Localiza-se em uma área de 673.488 quilômetros quadrados. Deste total, 604,51 km² em áreas referentes à zona rural e 68,976 km² em localidades urbanizadas. Segundo informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população de Bauru em 2015 foi estimada em 366.992 habitantes. Com altitude de 526 metros, sua temperatura média anual é de 22,6°C e na vegetação original predomina o cerrado. Estima-se que a população felina local seja de 5.670 animais (IBGE, 2016; Instituto Pasteur, 2016).

Foram disponibilizadas amostras de soros por conveniência de 276 felinos de Bauru, as quais foram encaminhadas por Médicos Veterinários da cidade para análise no laboratório veterinário LABORCARE. Tais amostras foram analisadas no Laboratório de Zoonoses, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Estadual de Londrina e submetidas aos exames sorológicos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de anticorpos antileishmania. Os gatos foram identificados e rastreados para análise de seus dados cadastrais (idade, gênero, raça e forma de criação) no laboratório.

Preparo do antígeno solúvel de *L. amazonensis* para RIFI e ELISA

O antígeno solúvel de *L. amazonensis* foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Szargiki *et al.* (2009), com modificações. Após quatro dias de incubação das formas promastigotas em meio líquido Brain Heart Infusion – BHI (Hi-media, Índia) e meio Sólido Blood Agar Base - BAB (Hi-media, Índia), a 24°C, a cultura foi lavada com salina 0,9% de NaCl e centrifugada durante 10 minutos a 1000 x G, três vezes. O sedimento foi ressuspendido em 10 mL de salina a 0,3% de NaCl e submetido a seis ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido por seis ciclos de ultrassom (modelo FB120 - Fisher Scientific, EUA) de 0,5 minutos, a 60 Hz, a 30% de potência, em banho de gelo. Foi realizada a centrifugação (16.000 x g, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado e a concentração proteica foi determinada por meio do kit Pierce BCA Protein Assay (Termo Fisher Scientific, EUA), conforme recomendações do fabricante. As alíquotas foram armazenadas em *freezer* a -20°C até o momento da sua utilização.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para realização da RIFI, utilizaram-se lâminas com antígeno bruto solúvel de *L. amazonensis*. Anticorpos anti-leishmania foram detectados utilizando-se as diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Os soros controle positivo e negativo, utilizados em todas as lâminas, eram oriundos de gatos das cidades de Ilha Solteira e Londrina respectivamente. Para a leitura das lâminas, utilizou-se microscópio de Epifluorescência LEICA DMLB no aumento 400x. Foram considerados positivos os resultados de fluorescência igual ou superior a 1:40 (Guimarães *et al.*, 1974, Marzochi *et al.*, 1980).

Teste ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay)

O ensaio imunoenzimático indireto (ELISAI) para felinos foi realizado de acordo com técnica descrita previamente por Paranhos-Silva *et al.* (1996), com adaptações. As microplacas foram sensibilizadas com antígeno de *Leishmania amazonensis*, na concentração de 2,5 µg/mL, os soros e o conjugado foram diluídos a 1:100 e 1:5.000, respectivamente, em solução de caseína. Todas as placas apresentavam dois controles positivos, quatro controles negativos e um branco. O cálculo do *cut-off* de cada placa foi obtido pela média das absorbâncias dos soros controle negativos, com exclusão da média do branco, adicionado de três desvios-padrão. Após determinação do *cut-off* por placa, realizou-se a correção dos pontos de corte, para que a sensibilidade e especificidade fossem otimizadas, para isso foi

construída a curva *ROC* utilizando-se o MedCalc Statistical Software, no qual obteve-se um *cut-off* de 0,247.

Análise Estatística

Para identificação dos fatores de risco (gênero, raça, idade, forma de criação) associados à variável resposta (resultados dos exames), utilizou-se o modelo de regressão logística e o seu ajuste foi verificado através do gráfico de envelope simulado (*half-normal plot*). Ainda foi aplicado o teste de McNemar para verificar a concordância entre os testes RIFI e ELISA.

3.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra foi formada por 276 felinos; 140 fêmeas e 136 machos, 258 domiciliados (cinco animais residentes em apartamento e 253 em casas térreas) e 18 errantes, 55 animais de raça e 221 sem raça definida (SRD), entre dois meses e 18 anos de idade. Não foi realizado cálculo sobre o *n* amostral (amostra por conveniência) e todos os soros foram obtidos de proprietários, cujo poder aquisitivo permitiu que os felinos passassem por prévio atendimento veterinário.

Oitenta e dois animais (29,71%) foram reagentes no ELISA, 17 (6,15%) na RIFI e 10 (3,6%) em ambos os testes (RIFI e ELISA). Pelo método RIFI, foram obtidos títulos de 1:80 em três amostras, uma amostra com título de 1:320 e outra com título de 1:640. Não houve associação estatística entre soropositividade e sexo, raça e idade ($p > 0,05$), entretanto encontrou-se associação com estilo de vida dos animais ($p < 0,05$). Abaixo, a Tab. 1 com os resultados.

Tabela 1. Resultados da análise para determinação dos fatores de risco para LVF, pelos métodos sorológicos RIFI e ELISA, no município de Bauru no ano de 2015.

Fatores de Risco		Total de Animais	Testes RIFI/ELISA	
			Positivos (%)	Negativos (%)
Gênero	Machos	136	58 (42,65)	78 (57,35)
	Fêmeas	140	51 (36,42)	89 (63,58)
Idade	4 meses - 1 ano	24	5 (20,83)	19 (79,17)
	2 - 7 anos	92	36 (39,13)	56 (60,87)
	8 - 13 anos	76	30 (39,47)	46 (60,53)
	14 - 18 anos	51	29 (56,86)	22 (43,14)
	Não informada	33	18 (54,55)	15 (45,45)
Raça definida	Com	55	15 (27,27)	40 (72,73)
	Sem	221	94 (42,53)	127 (57,47)
Local	Domiciliado	258	91 (35,27)	167 (64,73)
	Errante	18	18 (100)	0

* Associação estatística encontrada entre forma de criação e soropositividade.

Trabalhos publicados em todo o mundo sugerem que a resposta imune celular da espécie felina é efetiva o suficiente para controlar e conferir certo grau de resistência natural frente à infecção por *L. infantum*. Assim, a espécie é considerada menos susceptível quando comparada à espécie canina, exceto nos casos onde ocorrem eventos imunossupressores, propiciando a disseminação e visceralização do parasito (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Sherry *et al.*, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012; Pennisi *et al.*, 2013). Espera-se então que o número de gatos infectados, com altos títulos de anticorpos e sinais clínicos, seja bem menor que o de cães (Solano-Gallego *et al.*, 2007).

Os métodos sorológicos são os mais utilizados para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (Oie, 2008). Nesta espécie, altos títulos de anticorpos indicam infecção ativa e potencial transmissão do protozoário para os vetores (Quinnell *et al.*, 2003). No entanto, estudos demonstraram que o mesmo não ocorre nos gatos (Simões-Mattos *et al.*, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007).

Neste trabalho, 6,15% dos gatos foram reagentes pela técnica de RIFI. Alguns autores encontraram valores maiores (Vita *et al.*, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Sarkari *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010; Vides, 2010; Garrido, 2012; Pennisi *et al.*, 2012; Sobrinho *et al.*, 2012; Cardia *et al.*, 2013; Martin, 2013; Spada *et al.*, 2013; Chatzis *et al.*, 2014; Noé *et al.*, 2015; Caldart *et al.*, 2016; Can *et al.*, 2016; Spada *et al.*, 2016). Entretanto, outros autores encontraram valores menores (Rossi, 2007; Ayllon *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2009; Bresciani *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2014; Gomes, 2015). Pelo método ELISA, 29,71 % dos animais foram reagentes. Sobrinho *et al.* (2012), Martin (2013), e Caldart *et al.* (2016) obtiveram valores maiores de frequência, enquanto outros autores encontraram valores menores (Rossi, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Nasereddin *et al.*, 2008; Diakou *et al.*, 2009; Figueiredo *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2011; Sherry *et al.*, 2011; Vides, 2010; Longoni *et al.*, 2012; Chatzis *et al.*, 2014; Gomes, 2015; Can *et al.*, 2016). Observou-se que, assim como no presente trabalho, os autores que realizaram os dois métodos sorológicos obtiveram maior soropositividade no ELISA quando comparado à RIFI (Vides, 2010; Coelho *et al.*, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012; Caldart *et al.*, 2016), visto que o método ELISA é mais sensível que a RIFI.

Alguns trabalhos corroboram a falta de correlação existente entre testes sorológicos entre si e com os testes moleculares ou reações em cadeia de polimerase (PCR) (Ayllon *et al.*, 2008; Sherry *et al.*, 2011; Garrido, 2012; Pennisi *et al.*, 2012; Spada *et al.*, 2013; Miró *et al.*, 2014; Gomes, 2015; Spada *et al.*, 2016). Martín-Sánchez *et al.* (2007) encontraram alta

proporção de animais positivos na PCR de sangue (31,6%) e com baixos títulos de anticorpos pela RIFI (20) e, baixa positividade na PCR de sangue em animais com altos títulos de anticorpos (160). Simões-Mattos *et al.* (2005) afirmaram que não existe correlação entre infecção e produção de anticorpos nos felinos, pois estes tornam-se soropositivos somente na fase tardia da infecção. Prina *et al.* (2007) relataram que o parasito, ao infectar um organismo, pode ser degradado rapidamente e a presença do seu DNA, detectado por métodos moleculares, não significa necessariamente infecção ativa.

No trabalho, foi encontrada falta de correlação entre os métodos sorológicos avaliados ($p < 0,0001$). A porcentagem de felinos soropositivos foi muito maior pela técnica de ELISA que na RIFI, assim como encontrados por outros autores (Figueiredo *et al.*, 2009; Coelho, *et al.*, 2011; Vides, 2010; Sobrinho *et al.*, 2012; Cardia *et al.*, 2013; Caldart *et al.*, 2016). Abaixo, a Tab. 2 compara o resultado entre os dois métodos sorológicos realizados entre si e isoladamente.

Tabela 2. Valores absolutos e relativos dos resultados dos testes sorológicos isoladamente e entre si.

Exames	RIFI	ELISA	RIFI e ELISA
Positivo	17 (6,15%)	82 (29,71%)	10 (3,6%)
Negativo	259 (93,85%)	194 (70,29%)	266 (96,4%)
Total	276 (100%)	276 (100%)	276 (100%)

Legenda: RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA - Ensaio Imunoenzimático.

Na espécie canina, as duas técnicas sorológicas são recomendadas pelo Ministério da Saúde (2014) para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários; o ELISA para a triagem e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste ELISA. Tal procedimento pode ser estendido à espécie felina. Assim, no presente trabalho, foram considerados como infectados somente os gatos reagentes a ambos os testes.

Resultados falso-positivos podem ocorrer por reação cruzada com *Toxoplasma spp.*, *Trypanosoma spp.* e *Ehrlichia spp.* (Spada *et al.*, 2013; Chatzis *et al.*, 2014; Noé *et al.*, 2015). Nos felinos, a soropositividade para toxoplasmose aumenta à medida que o gato envelhece (Cardia *et al.*, 2013). Os protozoários causadores da doença de Chagas, assim como a *Leishmania SPP*, também pertencem à família *Trypanosomatidae* e compartilham vários antígenos que ocasionam reações cruzadas em diagnósticos sorológicos (Luciano *et al.*, 2009; Caldart *et al.*, 2016). Contudo, razões técnicas também podem levar a erros. Importante lembrar que procedimentos de coleta, processamento, transporte e/ou armazenamento indevidos podem ocasionar hemólise e consequente coloração avermelhada do soro, interferindo na absorvância de métodos colorimétricos (Bastos *et al.*, 2010), como o ELISA.

No método RIFI, a interpretação pode ser subjetiva. Nesse estudo, nas baixas diluições dos soros a serem testados, resíduos de fluoresceína foram confundidos com fluorescência citoplasmática do parasito, fato também relatado por Miró *et al.* (2014). Cães com menos de três meses de idade não devem ser avaliados através desses métodos, pois podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos (Braga *et al.*, 1998).

Não existe um método de RIFI padronizado para gatos, nem um valor de título de anticorpo aceito universalmente que corresponda à infecção. Os validados em cães são utilizados nos gatos (Spada *et al.*, 2013; Gomes, 2015).

A especificidade e a sensibilidade dos exames realizados poderiam aumentar se, em vez de promastigotas, fossem utilizadas as formas amastigotas, pois estas são as formas que parasitam o hospedeiro vertebrado. Embora as amastigotas possam ser utilizadas como antígenos, as promastigotas representam a forma de antígeno mais frequentemente utilizada (Oie, 2008).

Não houve associação estatística entre a soropositividade e a idade dos animais ($p > 0,05$) (Tab. 1) como observados por outros autores (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Nasereddin *et al.*, 2008; Bresciani *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012; Spada *et al.*, 2013; Miró *et al.*, 2014; Spada *et al.*, 2016); ao contrário de Rossi (2007) e Cardoso *et al.* (2010) que observaram predomínio em gatos adultos e idosos, respectivamente. Animais idosos adoecem com maior frequência quando comparados aos mais jovens (Garrido, 2012) e, proprietários de gatos não visitam clínicos veterinários rotineiramente (só quando adoecem) quando comparados aos dos cães; pelo menos em países em desenvolvimento, onde a leishmaniose é endêmica (Simões-Mattos *et al.*, 2005). Pennisi *et al.* (2012) afirmaram que o maior número de animais idosos soropositivos pode ser explicado pela exposição cumulativa ocorrida ao longo da vida.

Nos cães, a distribuição da idade é bimodal, sendo os menores de três anos e os maiores de oito anos os mais acometidos, fato explicado pela maior exposição ao vetor ou decorrentes de alterações imunológicas (Miranda *et al.*, 2008). No homem, a incidência é maior em crianças menores de dez anos (54,4%), com 41% dos casos registrados em menores de cinco anos, devido à relativa imaturidade imunológica celular, agravada pela desnutrição, comum nas áreas endêmicas (Desjeux, 2004). Segundo Gomes (2015), a baixa soropositividade em animais mais jovens estaria relacionada ao incompleto desenvolvimento imunitário.

Não houve associação estatística em relação ao gênero ($p > 0,05$), como também observado por outros autores (Ayllon *et al.*, 2008; Nasereddin *et al.*, 2008; Bresciani *et al.*,

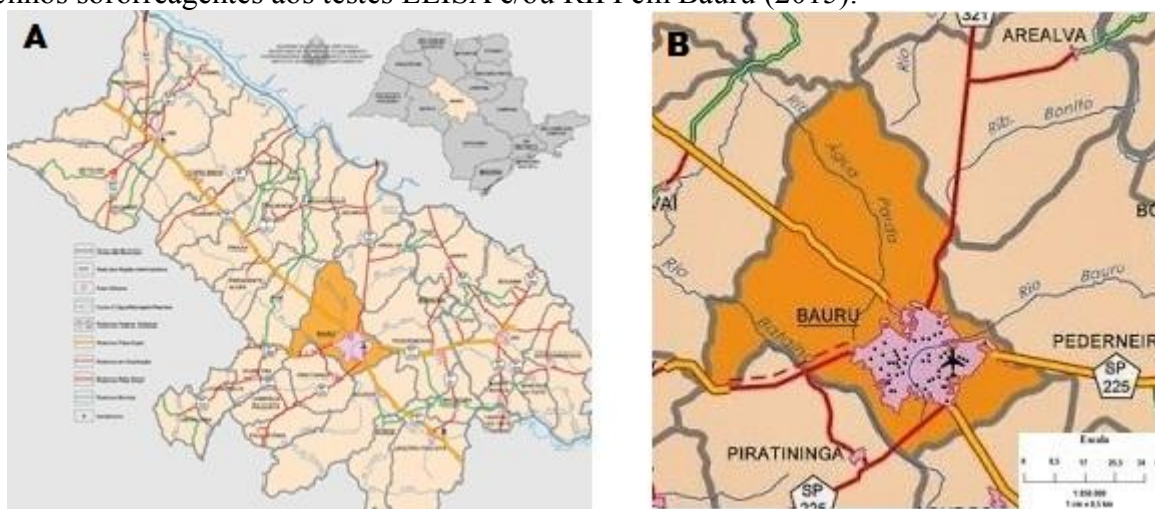
2010; Coelho *et al.*, 2011; Sherry *et al.*, 2011; Garrido, 2012; Spada *et al.*, 2013; Spada *et al.*, 2016). No entanto, Cardoso *et al.* (2010), Vides (2010) e Sobrinho *et al.* (2012) encontraram predomínio de machos felinos sororreagentes. Estes associaram o observado ao comportamento do macho, tanto na disputa territorial como por fêmeas para acasalamento. Por outro lado, Rossi (2007) obteve predomínio de soropositividade em fêmeas.

No homem, o sexo masculino é mais acometido (60% dos casos), principalmente após a adolescência. Isso poderia ser explicado pela maior exposição masculina ou por diferenças biológicas existentes entre os sexos (Ministério da Saúde, 2006). Esse fato também foi constatado em roedores, onde o número de animais acometidos diminui após a orquiectomia. Já nas fêmeas desta espécie, quando recebem tratamento hormonal a base de testosterona, tornam-se mais susceptíveis (Wilson *et al.*, 2005).

Em relação à forma de criação, encontrou-se associação estatística entre gatos domiciliados e errantes ($p > 0,05$). Dos 18 animais errantes, quatro foram positivos nos dois testes e 12 pelo método ELISA. Contudo, é importante ressaltar que não foram obtidas informações a respeito da quantidade de animais e da frequência com que os gatos domiciliados tinham acesso à rua. Já Cardoso *et al.* (2010) e Garrido (2012) em Portugal e, Ayllon *et al.* (2008) em Madrid (Espanha) não encontraram tal associação.

Na Fig. 1A é possível verificar a localização da cidade de Bauru, dentro do estado de São Paulo e na 1B, a localização dos domicílios de felinos sororreagentes aos testes ELISA e/ou RIFI em Bauru, no ano de 2015.

Figura 1A. Microrregião de Bauru, do estado brasileiro de São Paulo. **B.** Domicílio dos felinos sororreagentes aos testes ELISA e/ou RIFI em Bauru (2015).



FONTES: Fig. 1A - Governo do estado de São Paulo. Secretaria de Economia e Planejamento. Coordenadoria de Planejamento e Avaliação do Instituto Geográfico e Cartográfico, 2016. B - DER (Departamento de Estradas de Rodagem), 2006. Modificada pelo autor (2015).

Vita *et al.* (2005) observaram em seus estudos que 85% dos felinos sororreagentes eram errantes ou com acesso ao exterior dos domicílios. Cardoso *et al.* (2010) encontraram diferença significativa entre gatos de área urbana (0%) e rural (10,5%) de município na região norte de Portugal pelo método ELISA. Encontrou-se 29,71% pelo mesmo método em área urbana; diferença possivelmente associada a resultados falso-positivos (Chatzis *et al.*, 2014). Entretanto, pelo método RIFI, encontrou-se 6,15% de animais reagentes. Esses dados sugerem uma maior prevalência de leishmaniose felina no município de Bauru como um todo, já que não foram analisadas amostras de soros de gatos domiciliados na zona rural. Silva *et al.* (2010) sugerem que os gatos domésticos podem atuar como elo entre ambientes silvestres e domésticos ao se deslocarem para áreas periurbanas e rurais, favorecendo a disseminação do parasito devido à maior exposição ao vetor. É sabido que o repasto sanguíneo, realizado pela fêmea do flebotomíneo, pode ocorrer em diferentes espécies (Desjeux, 2004). Barata *et al.* (2005) observaram forte preferência do vetor por sangue de aves domésticas, embora não exista na literatura relato dessa espécie exercendo papel de reservatório para *L. infantum*. Estas seriam refratárias à infecção, exercendo somente papel atrativo e de manutenção do vetor no ambiente rural (Dias *et al.*, 2003).

Comportamentos típicos dos felinos podem favorecer a disseminação do parasito nesta espécie, sobretudo no que se refere ao acesso à rua; onde exercem atividade predatória, percorrem grandes distâncias, coabitam com reservatórios silvestres e sinantrópicos; reforçados ainda pelo hábito noturno, similar ao dos flebotomíneos (Desjeux, 2004).

Assim como Bresciani *et al.* (2010) e Garrido (2012), não se observou associação estatística para o fator raça ($p > 0,05$). Navarro *et al.* (2010) verificaram que a raça felina Europeu Comum foi mais acometida que as demais. Entretanto, faz-se necessário verificar se realmente há predisposição racial ou se a referida raça é muito comum na localidade estudada. Solano-Gallego *et al.* (2000) em ensaio realizado na ilha de Maiorca (Espanha), observaram que o Ibizian é uma raça canina geneticamente resistente por apresentar resposta imune do tipo celular.

Novas e continuadas pesquisas devem ser realizadas a fim de elucidar o verdadeiro papel do gato na epidemiologia da doença a fim de que medidas cabíveis em saúde pública sejam tomadas com relação à espécie.

3.1.4 CONCLUSÃO

Demonstrou-se a ocorrência de anticorpos anti- *Leishmania* spp nos felinos da cidade de Bauru, estado de São Paulo, área endêmica para LVC. Não houve concordância entre os

testes utilizados, já que o ELISA é mais sensível que a RIFI. Não houve associação estatística relacionada à idade, gênero e raça. Porém, não podemos descartar a importância desses fatores de risco, já que o n amostral não representou a população felina da cidade de Bauru e as amostras foram de conveniência. Houve associação estatística relacionada ao modo de criação, onde 100% (18) dos felinos reagentes eram errantes.

3.1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*, v.7, n.5, 2012.
- AYLLON, T.; TESOURO, M.A.; AMUSATEGUI, I. et al. Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1149, p.361-364, 2008.
- BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, n.5, p.421-425, 2005.
- BASTOS, M.S.; BERNER, A.; RAMOS, E.R.P. Avaliação do grau de hemólise e sua interferência em análises bioquímicas de amostras obtidas por diferentes técnicas de coleta de sangue venoso. In: MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 2010, Maringá-PR. *Anais da V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica*. Maringá-PR: Editora Cesumar, 2010.
- BRAGA, M.D.; COELHO, I.C.; POMPEU, M.M. et al. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.31, n.5, p.419-424, 1998.
- BRESCIANI, K.D.S.; SERRANO, A.C.M.; MATOS, L.V.S. et al. Ocorrência de *Leishmania spp.* em felinos do município de Araçatuba, SP. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.19, n.2, p.127-129, 2010.
- CALDART, E.T; FERREIRA, F.P.; MATTOS, A.M.R.N.M. et al. Diagnóstico sorológico de *Leishmania spp.* em felinos e reação cruzada/coinfecção com *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma spp.* In: CONGRESSO DE PESQUISA EM SAÚDE ANIMAL E HUMANA, 1., 2016. Londrina- PR. *Rev. C. Vet. e Saúde Públ.*, v.3, p.166-169, 2016.

- CAN, H.; DOSKAYA, M.; ÖZDEMİR, H.G. et al. Seroprevalence of Leishmania infection and molecular detection of Leishmania tropica and Leishmania infantum in stray cats of Izmir, Turkey. *Exp. Parasitol.*, v.167, p.109-114, 2016.
- CARDIA, D.F.F.; CAMOSSO, L.G.; SILVEIRA NETO, L. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania spp.* infection in cats from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.197, p.634-637, 2013.
- CARDOSO, L.; LOPES, A.P.; SHERRY, K. et al. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infectious in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet. Parasitol.*, v.174, n.1-2, p.37-42, 2010.
- CHATZIS, M.K.; LEONTIDES, L.; ATHANASIOU, L.V. et al. Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Exp. Parasitol.*, v.147, p.54–59, 2014.
- COELHO, W.M.D.; RICHINI-PEREIRA, V.B; LANGONI, H. et al. Molecular detection of *Leishmania sp.* in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, Sao Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.176, n.2-3, p.281-282, 2011.
- COSTA, T.A.C; ROSSI, C.N.; LAURENTI, M.D. et al. Occurrence of leishmaniasis in cats from endemic area for visceral leishmaniasis. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, v.47, n.3, p.213-217, 2010.
- DER (Departamento de Estradas de Rodagem). *Mapa Rodoviário do Estado de São Paulo*. São Paulo, 2006. Escala 1:1.000.000.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.27, n.5, p.305-318, 2004.
- DIAKOU A.; PAPADOPOULOS, E.; LAZARIDES, K. Specific anti-*Leishmania spp* antibodies in stray cats in Greece. *J Feline Med Surg.*, v.11, n.8, p.728-30, 2009.
- DIAS, F.D.O.P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.M. Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad. Saúde Pública*, v.19, n.5, p.1373-1380, 2003.
- FIGUEIREDO, F.B.; BONNA, I.C.F.; NASCIMENTO, L.D. et al. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.42, n.2, p.141-145, 2009.
- GARRIDO, J.M.C.B.G. *Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por Leishmania infantum em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu*. 2012.

115f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

GOMES, P.I.S. *Detecção da infeção por leishmania spp., em gatos da área metropolitana de Lisboa, através de técnicas de diagnóstico serológico (IFI e ELISA) e de uma técnica molecular (qPCR) aplicada a células conjuntivais e a sangue*. 2015. 155f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa.

GUIMARÃES, M.C.; GIOVANNINI, V.L.; CAMARGO, M.E. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.16, n.3, p.145-148, 1974.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Cidades*: Bauru, São Paulo. 2016. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=350600>>. Acesso em: 18 maio 2017.

INSTITUTO PASTEUR. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria da Saúde. *Campanha de Vacinação*. 2016. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/instituto-pasteur/paginas-internas/vacinacao/campanha-de-vacinacao>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

LONGONI, S.S.; LÓPEZ-CEPEDES, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M. et al. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.35, n.5, p.469-476, 2012.

LUCIANO, R.M.; LUCHEIS, S.B.; TRONCARELLI, M.Z. et al. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, v.46, n.3, p.181-187, 2009.

MAIA, C.; GOMES, J.; CRISTÓVÃO J. et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet. Parasitol.*, v.174, n.3-4, p. 336-340, 2010.

MAROLI, M.; PENNISI, M.G.; MUCCIO T. et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.145, n.3-4, p.357-60, 2007.

MARTIN, M.F.A. *Avaliação diagnóstica para Leishmania spp. e Trypanosoma cruzi em gatos domésticos procedentes da associação protetora dos animais do Município de Ilha Solteira, SP, Brasil*. 2013. 134f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

- MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOZ-PÉREZ, M. et al. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.*, v.145, n.3-4, p. 267-273, 2007.
- MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C. et al. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.22, p.149-155, 1980.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar*, Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*, Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília: MS, 2006, 122p.
- MIRÓ, G.; RUPÉREZ, C.; CHECA, R. et al. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recente outbreak of human leishmaniosis? *Parasit. Vectors*, v.7, n.112, p.1-7, 2014.
- MIRANDA, S.; ROURA, X.; PICADO, A. et al. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Res.Vet. Sci.*, v.85, n.1, p.35-38, 2008.
- NAVARRO, J.A.; SÁNCHEZ, J.; PEÑAFIEL-VERDÚ, C. et al. Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. *J. Comp. Path.*, v.143, n.4, p. 297-302, 2010.
- NASEREDDIN, A.; SALANT, H.; ABDEEN, Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Vet. Parasitol.*, v.158, n.4, p.364-369, 2008.
- NEMATI, T.; KHANMOHAMMADI, M.; BAZMANI, A. et al. Study on *Leishmania* infection in cats from Ahar, East Azerbaijan Province and North West Iran by parasitological, serological and molecular methods. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, v.5, n.1, p.40-43, 2015.
- NOÉ, P.; DOMINGOS, S.L.; OSHIRO, E.T. et al. Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. *Ci. Anim.*, v.25, n.4, p.3-14, 2015.
- OIE. The World Organisation for Animal Health. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 6.th. Paris: Office International des Epizooties, 2008.

- PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.R.; SANTOS, W.C. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.55, n.1, p.39-44, 1996.
- PENNISI, M.G.; HARTMANN, K.; LLORET, A. et al. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.*, v.15, p.638-642, 2013.
- PENNISI, M.G.; LUPO, T.; MALARA, D. et al. Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Southern Italy. *J. Feline Med. Surg.*, v.17, n.14, p. 656-657, 2012.
- PRINA, E.; ROUX, E.; MATTEI, D. et al. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes. Infect.*, v.9, n.11, p.1307-1315, 2007.
- QUINNELL, R.J.; KENNEDY, L.J.; BARNES, A. et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, v.55, p. 23-28, 2003.
- ROSSI, C.N. *Ocorrência de Leishmania sp. em gatos do município de Araçatuba - São Paulo - Brasil*. 2007. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- SARKARI, B.; HATAM, G.R.; ADNANI, S.J. et al. Seroprevalence of feline leishmaniasis in areas of Iran where *Leishmania infantum* is endemic. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.103, n.3. p.275-277, 2009.
- SHERRY, K.; MIRÓ, G.; TROTTA, M. et al. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v.11, n.3, p.239-245, 2011.
- SILVA, S.M.; RABELO, P.F.; GONTIJO, N.D.E.F. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.174, n.1-2, p.150-154, 2010.
- SIMÕES-MATTOS, L.S.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J. et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet. Parasitol.*, v.127, p.199-208, 2005.
- SOBRINHO, L.S.; ROSSI, C.N.; VIDES, J.P. et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.187, n.1-2, p.302-306, 2012.

- SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L. et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.76, n.4 p.676-680, 2007.
- SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G. et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.*, v.90, n.1-2, p.37-45, 2000.
- SOUSA, K.C.M.; HERRERA, H.M.; DOMINGOS, I.H. et al. Detecção sorológica de *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum* e *Neospora caninum* em gatos de uma área endêmica para leishmaniose no Brasil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v.23, n.4, p.449-455, 2014.
- SPADA, E.; CANZI, I.; BAGGIANI, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.45, p.53-58, 2016.
- SPADA, E.; PROVERBIO, D.; MIGLIAZZO, A. et al. Serological and molecular evaluation of *Leishmania infantum* infection in stray cats in a nonendemic area in northern Italy. *ISRN Parasitol.*, p. 1-6, 2013.
- SZARGIKI, R.; CASTRO, E.A.; LUZ, E. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.13, n.1, p.47-52, 2009.
- VIDES, J.P. *Infeção por Leishmania chagasi em gatos com dermatopatias provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral*. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de mesquita Filho, Araçatuba.
- VITA, S.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E. et al. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet. Res. Commun.*, v.29 (S.2), p.319-321, 2005.
- WILSON, M.; JERONIMO, S.; PEARSON, R. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis*, v. 38, p. 147-160, 2005.

3.2 Normas para publicação do artigo

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Política Editorial

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

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

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos são feitas exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

Orientações Gerais

Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo - ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.

Leia "PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE"

Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema,

sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.

Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).

É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.

O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Conmittee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico:

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

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

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

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso:

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação:

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

O texto NÃO deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 6), no formato A4, com margem de 3 cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

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

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*.

* na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA. (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

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

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem

também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

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

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

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

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

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

Como referenciar:

1. Citações no texto

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

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

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

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

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

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de

publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

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

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores et al.):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

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

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

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores et al.):

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

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

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

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

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

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores et al.):

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

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

Taxas de submissão e de publicação

Taxa de submissão: A taxa de submissão de R\$ 50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação: A taxa de publicação de R\$ 150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.

OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

Submission and Publication fee. The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be in the invoice issuance.

Recursos e diligências

No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item “Justification” (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.

No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.