

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

TALITA NAYARA BEZERRA LINS

**NÍVEIS SÉRICOS DE 25-HIDROXIVITAMINA-D EM CÃES COM INFECÇÃO
NATURAL POR *Leishmania infantum* (Nicollle, 1908)**

RECIFE

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

TALITA NAYARA BEZERRA LINS

**NÍVEIS SÉRICOS DE 25-HIDROXIVITAMINA-D EM CÃES COM INFECÇÃO
NATURAL POR *Leishmania infantum* (Nicollle, 1908)**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Biociência Animal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Gílcia Aparecida de Carvalho

Coorientador: Prof^o Dr^o Leucio Câmara Alves

RECIFE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L759n

Lins, Talita Nayara Bezerra
NÍVEIS SÉRICOS DE 25-HIDROXIVITAMINA-D EM CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR
Leishmania infantum (Nicollle, 1908) / Talita Nayara Bezerra Lins. - 2022.
51 f. : il.

Orientadora: Gilcia Aparecida de Carvalho.
Coorientador: Leucio Camara Alves.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal, Recife, 2022.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Calcitriol. 3. Zoonose. I. Carvalho, Gilcia Aparecida de, orient. II.
Alves, Leucio Camara, coorient. III. Título

CDD 636.089

TALITA NAYARA BEZERRA LINS

**NÍVEIS SÉRICOS DE 25-HIDROXIVITAMINA-D EM CÃES COM INFECÇÃO
NATURAL POR *Leishmania infantum* (Nicollle, 1908)**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Morfofisiologia, Sanidade Animal, Humana e Ambiental na linha de pesquisa Saúde Única

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Gílcia Aparecida de Carvalho
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco -UFAPE (Orientadora)

Prof^a Dr^a Edna Michelly de Sá Santos
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE (Membro Titular)

Prof^o Dr^o Rafael Antonio do Nascimento Ramos
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco -UFAPE (Membro Titular)

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma zoonose, causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, transmitidos por flebotomíneos, sendo o cão doméstico o principal reservatório urbano no Brasil. Nestes animais, a hipergamaglobulinemia causada em resposta a infecção, favorece a deposição de imunocomplexos que desencadeia o surgimento dos sinais clínicos como: dermatites, artrites, glomerulonefrite imunomediada, oftalmopatias, linfadenomegalias, diarreia, além de hepatoesplenomegalia. Sabe-se que a 25-hidroxivitamina-D pode modular a resposta inata e adaptativa em mamíferos e sua deficiência pode aumentar a suscetibilidade a infecção. Sendo assim o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina-D em cães com infecção natural por *Leishmania infantum* relacionando às manifestações clínicas nestes pacientes. Para tanto, foram utilizados soros de 43 animais, divididos em dois grupos: Grupo I, composto por 10 animais, negativos ao teste imunocromatográfico, e Grupo II, composto por 33 animais, reagentes ao teste imunocromatográfico e positivos para presença de formas amastigotas de *L. infantum* na biopsia de medula óssea. A mensuração dos níveis de 25-hidroxivitamina-D foi realizada pelo método de quimioluminescência. Os resultados evidenciaram que houve variação entre 20 - 52 ng/mL no Grupo I e de <3 - 176 ng/mL no Grupo II, sendo que 39,39% dos cães deste grupo apresentaram hipovitaminose com níveis abaixo de 20 ng/mL. O único sinal clínico identificado nos animais do Grupo I foi dermatite descamativa (20%). Por outro lado, no Grupo II foi possível observar onicogribose (69,69%), linfadenomegalia (51,51%), dermatite descamativa (60,60%), alopecia (63,63%), dermatite nodular (24,24%) dermatite ulcerativa (48,48%), dermatite pustular (6,06%), paroníquia (6,06%), conjuntivite (12,12%), uveíte (9,09%), problemas articulares (30,30%) epistaxe (3,03%). Os níveis séricos de 25-hidroxivitamina-D dos animais pertencentes aos dois grupos não diferiram significativamente em relação ao sexo e à faixa etária. Os dados observados neste estudo sugeriram que apesar de existir predominância da onicogribose nos animais com níveis séricos de 25-hidroxivitamina-D menores que 20 - 50 ng/mL e dermatite descamativa em animais com níveis séricos maiores que 50 ng/mL, novos estudos deverão ser realizados para avaliar a participação de 25-hidroxivitamina-D na patogênese destes quadros clínicos.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, Calcitriol, zoonose.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a zoonosis caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania*, transmitted by sandflies, with the domestic dog being the main urban reservoir in Brazil. In these animals, the hypergammaglobulinemia caused in response to infection favors the deposition of immune complexes that triggers the appearance of clinical signs such as: dermatitis, arthritis, immune-mediated glomerulonephritis, ophthalmopathies, lymphadenopathy, diarrhea, in addition to hepatosplenomegaly. It is known that 25-hydroxyvitamin-D can modulate the innate and adaptive response in mammals and its deficiency can increase susceptibility to infection. Therefore, the aim of this study was to evaluate the serum levels of 25-hydroxyvitamin-D in dogs with natural infection by *Leishmania infantum* relating to the clinical manifestations in these patients. For this purpose, sera from 43 animals were used, divided into two groups: Group I, composed of 10 animals, negative to the immunochromatographic test, and Group II, composed of 33 animals, reagents to the immunochromatographic test and positive for the presence of amastigote forms of *L. infantum* on bone marrow biopsy. The measurement of 25-hydroxyvitamin-D levels was performed by the chemiluminescence method. The results showed that there was a variation between 20 - 52 ng/mL in Group I and <3 - 176ng/mL in Group II, with 39.39% of the dogs in this group had hypovitaminosis with levels below 20ng/mL. The only clinical sign identified in Group I animals was desquamative dermatitis (20%). On the other hand, in Group II it was possible to observe onychogryphosis (69.69%), lymphadenopathy (51.51%), desquamative dermatitis (60.60%), alopecia (63.63%), nodular dermatitis (24.24%) ulcerative dermatitis (48.48%), pustular dermatitis (6.06%), paronychia (6.06%), conjunctivitis (12.12%), uveitis (9.09%), joint problems (30.30%) epistaxis (3.03%). Serum levels of 25-hydroxyvitamin-D in animals belonging to the two groups did not differ significantly in terms of sex and age. The data observed in this study suggested that despite the prevalence of onychogryphosis in animals with serum levels of 25-hydroxyvitamin-D less than 20 - 50 ng/mL and desquamative dermatitis in animals with serum levels greater than 50 ng/mL, further studies should be carried out. be performed to evaluate the participation of 25-hydroxyvitamin-D in the pathogenesis of these clinical conditions.

Key-words: Canine visceral leishmaniasis, calcitriol, zoonosis

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

25-(OH)-D- 25- Hidroxivitamina-D

ALT- Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

DBP- Proteína de ligação sérica à vitamina D

DII- Doença inflamatória intestinal

DRC- Doença renal crônica

ELISA- Ensaio imunoenzimático

FA- Fosfatase alcalina

FA- Frequência absoluta

FR- Frequência relativa

G1- Grupo 1

G2- grupo 2

HPLC- Cromatografia líquida de alta pressão

IgA- Imunoglobulina A

IgG- Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M

IL- Interleucina

INF- γ - Interferon-gama

LPG- Glicofosfoglicano

LPK-1- Proteína quinase da *Leishmania*

LV- Leishmaniose visceral

LVC- Leishmaniose visceral canina

mL- mililitro

Ng- nano grama

NO- Óxido nítrico

PCR- reação em cadeia de polimerase

PE- Pernambuco

RMR- Região Metropolitana do Recife

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SRD- Sem raça definida

TGF- β - Fator de crescimento beta

TH1- T helper 1

TH2- T helper 2

TLR- Receptors Toll-like

TR-DPP- Teste rápido Dual Path Platform

UFRPE- Universidade Federal Rural de Pernambuco

UV- Ultravioleta

VDR- Vitamina D receptor

WHO- World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Formas promastigotas de *Leishmania* sp. obtidas a partir de cultura celular. Fonte: Levy (2009).12
- Figura 2 *Leishmania* sp. parasitando macrófago em amostras de medula. Seta preta: Formas amastigotas. Setas vermelhas: núcleo e cinetoplasto. Aumento de 100x. Fonte: Bonatti (2022). 13
- Figura 3 Ciclo biológico de *Leishmania (L.) infantum*. Fonte: Harhay et al (2011).15

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Frequências absolutas (FA) e relativas (FR%) de animais pertencentes aos grupos G1 e G2 com diferentes níveis séricos de 25(OH)D. 41
- Tabela 2. Frequências absolutas (FA) e relativas (FR%) quanto ao sexo e idade dos animais dos Grupos G1 e G2 em relação aos níveis séricos de vitamina D 41
- Tabela 3. Frequências absolutas (FA) e relativas (FR%) de animais infectados por *L. infantum* (G2) e sinais clínicos apresentados de acordo com os níveis séricos de 25 (OH)D em ng/mL. 42

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Revisão de literatura	12
2.1 Agente etiológico e taxonomia	12
2.1.1 Morfologia	12
2.2. Hospedeiros susceptíveis	13
2.3. Vetores	14
2.4. Ciclo biológico	15
2.5. Epidemiologia	16
2.6. Immunopatogenia	17
2.7 Sinais Clínicos	19
2.8. Vitamina D	21
2.9. Diagnóstico	23
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos Específicos	25
4. Referências bibliográficas	26
Níveis séricos de 25-hidroxivitamina-d em cães com infecção natural por <i>Leishmania infantum</i> (Nicolle, 1908)	36
Resumo	37
Abstract	37
Introdução	38
Materiais e métodos	39
Aspectos éticos	39
Animais e processamento das amostras de soro	39
Dosagem de 25-hidroxivitamina-D	40
Análise de dados	40
Resultados	40
Discussão	43
Conclusão	47
Referências Bibliográficas	49

1. Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose negligenciada, que tem protozoários do gênero *Leishmania* como agentes etiológicos (SILVA et al., 2016). De origem rural, a enfermidade vem se urbanizando devido a expansão das cidades, desmatamento e modificações antrópicas, sendo o cão o principal reservatório urbano da doença no Brasil (ABRANTES et al., 2018). Ao serem infectados por *Leishmania infantum* os animais podem desenvolver a leishmaniose visceral canina (LVC) (BRASIL, 2014).

A principal forma de transmissão deste agente é vetorial, através do repasto sanguíneo de insetos fêmeas de flebotomíneos (WHO, 2016). No Brasil, as principais espécies transmissoras são o *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (AGRA et al., 2016; ANDRADE-FILHO et al., 2017; SILVA et al., 2019).

Em cães, geralmente a infecção por *Leishmania* sp. favorece a resposta imune mediada por células do tipo Th2, que produz citocinas inflamatórias, que por sua vez ativam a proliferação de linfócitos B e estes mediam a produção de anticorpos anti- *Leishmania*. E irão inibir ainda a resposta mediada por Th1, considerada protetiva contra a infecção (FREITAS et al., 2012; IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2014; BRASILEISH, 2018).

Tanto humanos, quanto os cães infectados, podem permanecer assintomáticos por longos períodos ou por toda a vida (MACHADO et al., 2020). O equilíbrio entre a resposta celular mediada por Th1 e a humoral mediada por Th2 é que irá determinar o surgimento das manifestações clínicas (ORDEIX et al., 2017), sendo mais comuns entre os animais: emagrecimento progressivo, caquexia, linfadenomegalia, onicogrifose, dermatite furfurácea, dermatite ulcerativa, alopecia, úlceras em ponta de orelha e plano nasal (ROSÁRIO et al., 2018), blefarite, uveíte, conjuntivite, nefropatias (EGUCHI et al., 2017).

Entretanto, as células de defesa como macrófagos, monócitos e células dendríticas apresentam receptores para a vitamina D, a qual além de seu papel já bem definido no sistema musculoesquelético, na regulação de cálcio e fósforo e também como precursora de hormônios esteroidais (VDR) (TEIXEIRA et al., 2018). É sugerido que em sua forma circulante a 25-hidroxivitamina-D, atue como cofator em reações nas células T e B, catalisando a produção de citocinas pró-inflamatórias derivadas de Th1 (RODRIGUEZ-CORTEZ et al., 2017; ZAFALON et al., 2019) além de aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (LIU et al., 2006).

Diferente de outros mamíferos, os cães não são capazes de sintetizar vitamina D através da absorção de raios ultra violeta (WEIDNER e VERBRUGGHE, 2016) e sua deficiência tem sido identificadas em animais com doenças infecciosas (RODRIGUEZ-CORTES et al., 2017), enteropatias crônicas, pancreatite, neoplasias, polineurites e doença renal crônica (ZAFALON et al. 2019; HUST, HOMER e MELLANBY, 2020, KURZBARD, BACKUS e YU, 2021).

Devido ao seu papel no sistema imune e sua relação com a resposta imune adaptativa, este estudo visa analisar os níveis séricos da vitamina D em animais naturalmente infectados por *L. infantum* em relação ao surgimento ou não de sinais clínicos característicos da enfermidade.

2. Revisão de literatura

2.1 Agente etiológico e taxonomia

As leishmanioses têm como agente etiológico o protozoário intracelular obrigatório pertencente ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Kinetoplastida, Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* Ross (1903), sendo divididos ainda em dois subgêneros principais: *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania* (Ticha et al., 2021). Atualmente são conhecidas cerca de trinta espécies que podem ser responsáveis pela infecção, dentre elas podemos citar *Leishmania infantum*, a principal espécie causadora da LVC (CUPOLILLO et al., 2014; FIOCRUZ, 2013; LAISON, 2010; REGUERA et al., 2016).

2.1.1 Morfologia

De ciclo de vida dimórfico, apresenta uma fase móvel flagelada (Figura 1), denominada promastigota, que é encontrada no vetor, sendo a forma infectante do parasito, de acordo com a espécie seu tamanho varia entre: 16 a 40 por 1,5 a 3 μm (CARNEIRO, 2014).

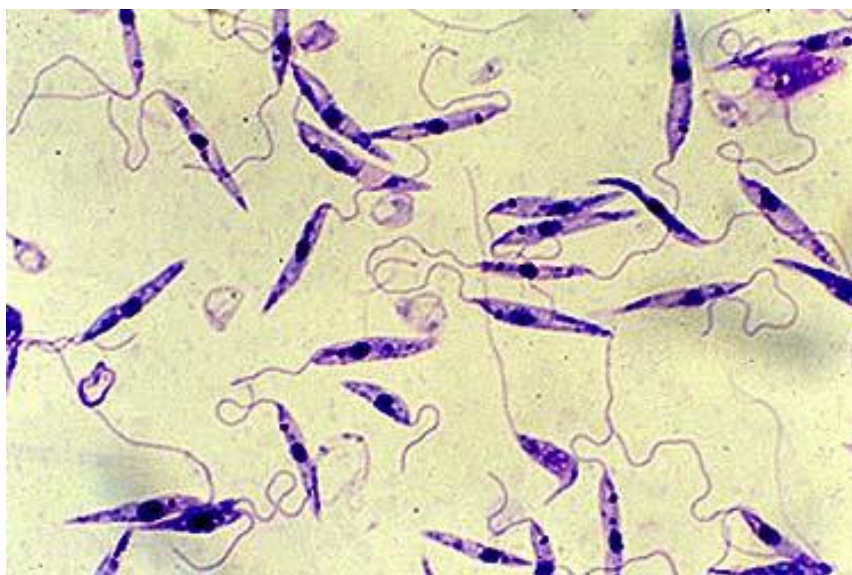


Figura 1 Formas promastigotas de *Leishmania* sp. obtidas a partir de cultura celular. Fonte: Levy (2009).

A forma amastigota é encontrada parasitando o hospedeiro vertebrado (Figura 2), estas por sua vez são arredondadas de núcleo central, medindo entre 1,5 a 2 por 2,5 a 5

µm (JÚNIOR, et al, 2021). Em ambas as formas é possível observar além do núcleo, o cinetoplasto, organela que possui DNA próprio e está ligada a única mitocôndria existente (CARNEIRO, 2014).

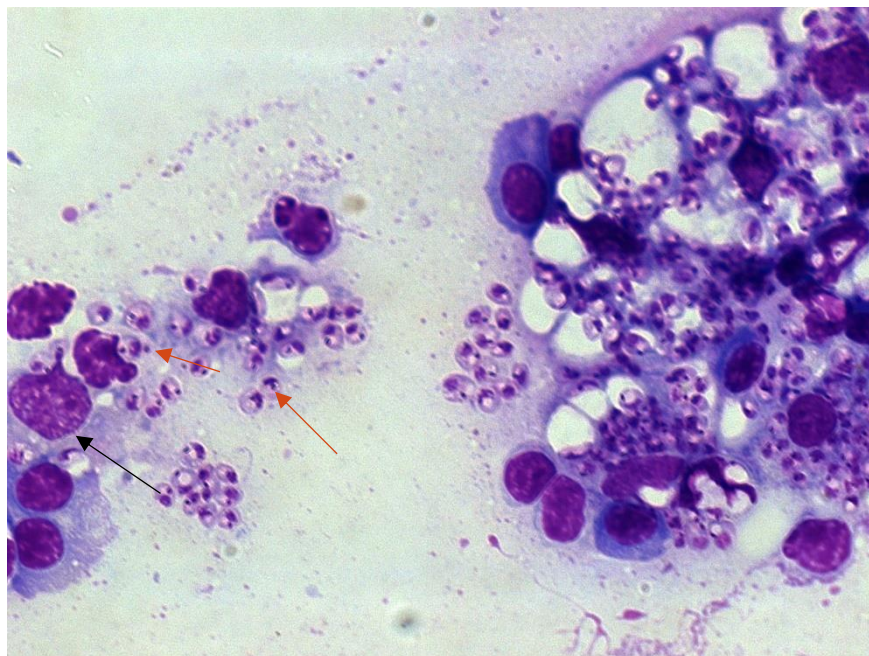


Figura 2 *Leishmania* sp. parasitando macrófago em amostras de medula. Seta preta: Formas amastigotas. Setas vermelhas: núcleo e cinetoplasto. Aumento de 100x. Fonte: Bonatti (2022).

2.2. Hospedeiros susceptíveis

Os mamíferos são susceptíveis a infecção por *Leishmania* sp., porém na maioria dos casos o homem é um hospedeiro acidental. Os canídeos são os principais hospedeiros de *L. infantum*. Originalmente a doença ocorre em ambientes silvestres e rurais em áreas de mata que favorecem o desenvolvimento do vetor, no ciclo silvestre os reservatórios naturais do parasito são o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*).

Outros animais como marsupiais (*Didelphis albiventris*) (AZEVEDO et al., 2021; GONTIJO e MELO, 2004), equinos (*Equus caballus*) (BENASSI et al., 2018), asininos (*Equus asinus*) (LEONEL et al., 2021) e morcegos (*Molusso pretiosus*, *Nyctinomops macrotis*, *Lasiurus cinereus*) (CASTRO et al., 2020; VIEIRA et al., 2022) também são susceptíveis a infecção.

No Brasil, em áreas urbanas, o cão (*Canis lupus familiaris*) apresenta importante papel como reservatório do agente, devido a sua frequente proximidade com os humanos (SILVA et al., 2013) e por apresentar alto parasitismo cutâneo, quer seja em animais sintomáticos ou assintomáticos, neste sentido estima-se que cerca de 50% dos animais não apresentam nenhum sinal clínico (SILVA, 2007; CORTES, 2012). O parasito também pode infectar gatos, mas o papel destes últimos na manutenção do ciclo urbano da doença não está bem definido (MAIA E CAMPINO, 2012; PIRAJÁ et al., 2013).

2.3. Vetores

No Brasil os vetores de *L. infantum* são insetos hematófagos do gênero *Lutzomyia* (BRASIL, 2006). São insetos dípteros (Ordem Diptera; Família Psychodidae; Subfamília Phlebotominae) (ALENCAR e FIGUEREDO, 2018), conhecidos como mosquito-palha, birigui e tatuquiras, que tem como habitat ambientes de matas, úmidos e com abundância de matéria orgânica, sendo facilmente encontrado no peridomicílio (REGO e SOARES, 2021; RODRIGUES et al., 2021).

Desde a década de 80 tem havido uma urbanização da enfermidade devido à invasão do homem em ambientes de mata, fazendo com que o vetor esteja presente em áreas rurais e urbanas (MENDES et al., 2020), bem como o crescimento desordenado das cidades sob condições insalubres (AGRA et al., 2016; BRAZIL, 2013; SALOMÓN et al., 2015,).

Os flebotomíneos machos se alimentam de seiva de plantas, porém as fêmeas fazem repasto sanguíneo obrigatoriamente para que haja maturação dos seus ovos, possuem atividade crepuscular e noturna, passando o dia em locais escuros e úmidos, protegidos de predadores (BRASIL, 2014).

As principais espécies responsáveis pela transmissão da *L. infantum* no Brasil são *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* (BRITO et al., 2014). No entanto, espécie como *Lu. migonei* já foi encontrada naturalmente infectada por *L. infantum* no município de São Vicente Ferrer, interior de Pernambuco e também no estado do Rio de Janeiro (GUIMARÃES et al., 2012). Guimarães et al. (2016) também demonstrou experimentalmente que *L. infantum* pode se desenvolver em *Lu. migonei* de maneira semelhante a maneira que se desenvolve em *Lu. longipalpis*, sugerindo que a espécie pode ter papel na transmissão de leishmaniose.

Em localidades que possuem casos humanos e animais notificados já foram identificadas outras espécies que podem estar envolvidas na transmissão vetorial como *Lu. evandroi* que foi identificada em Garanhuns-PE (UBIRAJARA FILHO et al., 2020).

2.4. Ciclo biológico

O ciclo de vida de *Leishmania* spp. é denominado heteróximo, ou seja, há uma alternância entre as fases do protozoário em um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor (BRASIL, 2014; MOTTA et al., 2021). Ao realizar um repasto sanguíneo em um animal previamente infectado, a fêmea do *Lutzomyia* sp. ingere macrófagos contendo formas amastigotas de *Leishmania* sp. (JÚNIOR et al., 2021; VIOL et al., 2014), no intestino destes insetos há o desenvolvimento do parasito até a forma promastigota infectante, estes escapam após romperem a membrana peritrófica que envolve a refeição de sangue e se multiplicam livremente (CAMPOLINA et al., 2020).

Ao realizar um novo repasto o vetor irá inocular as formas promastigotas do parasito no hospedeiro vertebrado, este por sua vez é fagocitado por macrófagos, mas são resistentes a ação do fagolisossoma. Há então a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, estando estas disponíveis para que um novo ciclo se inicie (Figura 3) (SILVA, 2007).

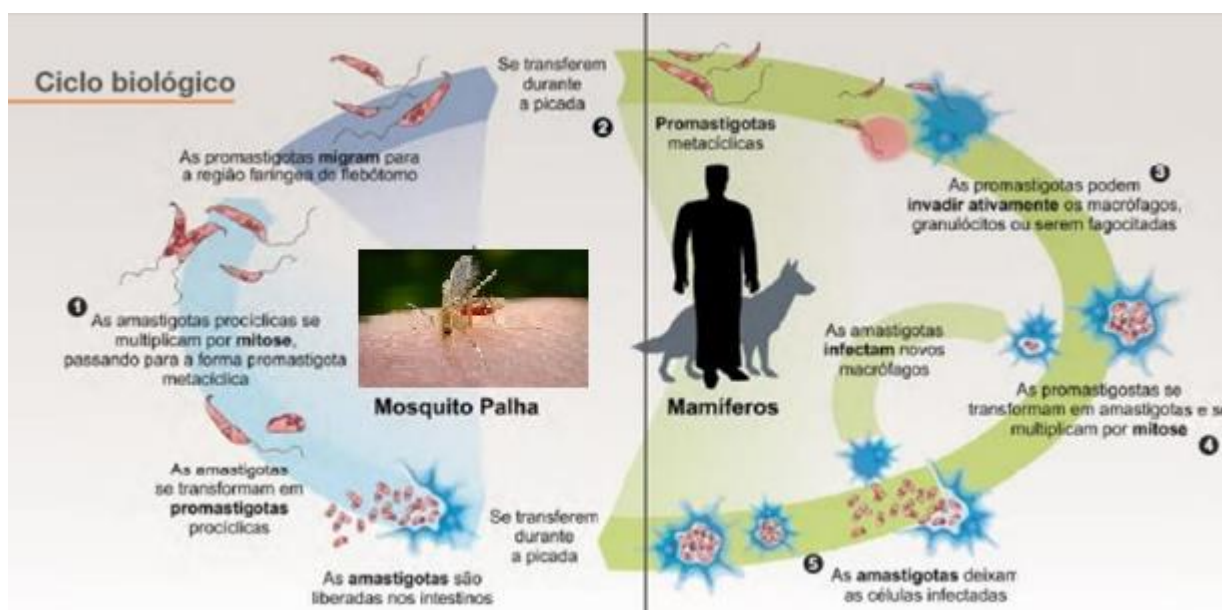


Figura 3 - Ciclo biológico de *Leishmania (L.) infantum*. Fonte: adaptado de Harhay et al (2011).

Embora ocorra em menor escala a transmissão sexual e vertical tem sido descrita como uma via importante principalmente em locais onde o vetor não foi identificado (SILVA et al., 2009; TURQUETTI et al., 2013). Riera e Valladares, (1996) foram os primeiros pesquisadores a identificar formas amastigotas em cultura de sêmen proveniente de animais infectados, já Silva et al., (2009) demonstrou a transmissão venérea de *L. infantum*.

2.5. Epidemiologia

A LVC é uma doença grave, que tem maior ocorrência na bacia do mediterrâneo, América Latina, África e Ásia (VEGUERA et al., 2016). Estima-se que a prevalência da doença em países endêmicos chegue a cerca de 10% da população canina, porém estudos sorológicos demonstraram prevalência variada entre países da Europa, com cerca de 19,5% de prevalência no sul da Espanha (VELEZ et al., 2019) e 20% em Portugal (CORTES et al., 2012).

Estima-se que milhões de cães estejam infectados na América Latina. Este número é impreciso, pois muitos países não possuem programas de vigilância e controle, bem como não possuem estudos para identificar esses animais. Além disto os métodos de detecção empregados, como a sorologia, podem apresentar número subestimados, pois é um método de sensibilidade e especificidade variada (MARCONDES e DAY, 2019).

A leishmaniose encontra-se em expansão na Argentina, Paraguai e Brasil (GRILL e ZURMENDI, 2017). Estudos realizados em países latino-americanos obtiveram diferentes frequências, como 44,44% na Argentina (Solomon et al., 2008), 22% no Uruguai (SATRAGNO et al., 2017) e 26% no Paraguai (PORTILLO, BENÍTEZ e ACOSTA, 2011).

No Brasil a LVC encontra-se em expansão por todo o território nacional, o país tem importantes focos em algumas regiões metropolitanas, como ocorre em Belo Horizonte (XAVIER et al., 2006), Teresina (SILVA et al., 2012) e Fortaleza, nesta última no ano de 2013 Rodrigues et al., identificou uma prevalência de 10,48%. Em Pernambuco estima-se que 2,5% da população canina esteja infectada, mas esse número varia de acordo com o local estudado (DANTAS-TORRES E BRANDÃO-FILHO, 2006; LINS et al., 2018).

Na região centro-oeste Ribeiro et al. 2019 identificou uma prevalência de 55% de cães soro reagentes em área periurbana no Distrito Federal, enquanto no Mato Grosso uma prevalência de 14% foi registrada por Carvalho et al. (2020).

Mais recentemente também foram registrados casos autóctones na região Sul nos estados do Rio Grande do Sul (HIRSCHMANN et al., 2014; RIBOLDI et al., 2018) e Paraná (DIAS et al., 2020).

A modificação na epidemiologia da enfermidade está relacionada principalmente as pressões antrópicas nos ambientes rurais e periurbanos, que têm sido ocupados de forma desordenada e sem planejamento, expondo os animais domésticos e o homem a condições favoráveis a infecção (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; MISSAWA et al., 2008).

Além dos fatores ambientais, como locais próximos a áreas de preservação e com presença de flebotomíneos (KATAGIRI et al., 2021), as condições socioeconômicas e os hábitos de vida são importantes na epidemiologia da doença, que acomete principalmente a população mais pobre (BRASIL, 2014).

2.6. Imunopatogenia

A LVC é uma doença crônica, progressiva e sistêmica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011), após o parasito infectar o organismo do hospedeiro, haverá a liberação de moléculas quimiotáticas, vasoativas e que além de iniciar a resposta inflamatória irão ativar a diapedese das células de defesa (MOTTA, 2021). O parasito em seguida será fagocitado por células fagocíticas mononucleares, primeiramente os neutrófilos (e em seguida por macrófagos, no interior dos quais há o desenvolvimento da forma promastigota para a forma amastigota (PETERS et al., 2008).

Devido a inibição do sistema complemento do hospedeiro, causada pela presença de glicofosfoglicano (LPG) e proteína quinase da *Leishmania* (LPK-1) na membrana celular do parasito, as células imunes não conseguem eliminar as amastigotas (SILVA, 2007). Desta maneira, os parasitos se multiplicam no interior das células de defesa até que estas se rompam e através da corrente sanguínea e linfática outros órgãos são infectados (SILVA e WINCK, 2018), como medula óssea, baço, fígado, rins, olhos o que caracteriza a cronicidade da enfermidade (SCHIMMING e PINTO e SILVA, 2012; SILVA, 2007).

Frente a infecção por *Leishmania* sp. serão requeridas tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa (FERREIRA et al., 2014). Sabe-se, porém, que em cães a resposta adaptativa, com a ativação de linfócitos B e produção de anticorpos será favorecida. Diante

disse o organismo requer da imunidade inata células T-helper 1 (Th1) e T-helper 2 (Th2), ambos secretarão citocina e interleucinas e o equilíbrio entre essas respostas irá interferir na progressão ou regressão da doença (BURNHAM et al., 2020; MARÍN-GARCÍA e LLOBAT, 2022).

A Th1 está relacionada a resposta celular mediada por linfócitos T CD4⁺, que irá secretar a interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) (GIUNCHETTI et al., 2019). Estas estão diretamente relacionadas a eliminação intracelular do parasito, através da produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) no interior dos macrófagos, o que irá levar a apoptose do parasito (LIU et al., 2006; BURNHAM, et al., 2020; MARÍN-GARCÍA e LLOBAT, 2022).

Esta via é relacionada ao controle da infecção, ocorrendo principalmente em animais assintomáticos (ORDEIX et al., 2017; TODOLÍ et al., 2010). Solano-Gallego et al., (2016) demonstrou que os níveis de INF- γ são significativamente mais altos em animais assintomáticos ou com sinais clínicos leves e moderados, quando comparados a animais com doença severa, além de apresentarem menor produção de anticorpos anti-*Leishmania* e parasitemia mais baixa. Cães da raça Ibiza Hound são considerados resistente a doença, análises imunológicas identificaram alta produção de INF- γ e baixa ou nenhuma produção de anticorpos, além de alta quantidade de linfócitos T CD³⁺ e células mononucleares expressando TLR (BURNHAM et al., 2020).

Além destes fatores, em animais resistentes a infecção ou assintomáticos, também tem sido observada uma grande quantidade de células T CD4⁺ e CD8⁺, demonstrando um equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias intracelulares que aumentam a capacidade leishmanicida dos macrófagos (GIUNCHETTI et al., 2019). Além disto os receptores Toll-like (TLRs) desempenham também um importante papel de reconhecimento do patógeno no hospedeiro ativando sinalização em cascata que pode induzir ou suprimir a expressão de genes que irão mediar a resposta inflamatória (ORDEIX et al., 2017).

Já as células Th2 tem o papel inverso na progressão da doença, visto que estas células irão produzir interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e Fator de crescimento beta (TGF- β) estes irão induzir a produção de anticorpos específicos para a doença nos linfócitos B, entre eles IgG, IgG1, IgG2, IgA e IgM (RODRIGUEZ-

CORTÉS et al., 2010) o que geralmente ocorre nos animais que apresentam quadro clínico grave (GIUNCHETTI et al.,2019).

2.7 Sinais Clínicos

O período de incubação da LVC é bastante variável, podendo surgir sinais clínicos em alguns meses ou apenas após anos, porém a média varia de 3 a 7 meses (BRASIL, 2014). Os primeiros sinais apresentados pelos cães geralmente são inespecíficos como: febre, apatia, perda de peso e linfadenomegalia, que são comuns a outras doenças infecciosas e podem retardar o diagnóstico precoce (LIMA et al., 2013; SCHIMMING e PINTO e SILVA 2012; SILVA, 2007). Freitas et al. (2012), em um estudo com 85 animais 86,6% apresentavam mais de um sinal clínico característico da doença, sendo mais frequente a caquexia.

A clínica da LVC se manifesta de diversas formas e os cães podem ser aparentemente saudáveis, com sinais clínicos localizados ou gravemente doentes com prognóstico ruim (BURNHAM et al., 2020; FERREIRA et al., 2014; VIOL et al., 2014). Sendo os animais classificados em assintomáticos, se não apresentarem nenhum sinal clínico da enfermidade, oligossintomáticos, quando apresentam sinais inespecíficos como linfadenopatia, perda de peso e pelagem opaca e polissintomáticos quando apresentam os sinais já citados e outros mais característicos da enfermidade como a onicogribose, alterações dermatológicas, oculares, articulares (BRASIL,2014).

O surgimento dos diversos sinais clínicos, são relacionados a inflamação piogranulomatosa nos principais órgãos alvos do parasito (SILVA, 2007). Sendo os mais comuns linfadenomegalia, caquexia, hiporexia, letargia, esplenomegalia, hepatomegalia, mucosas hipocoradas, nefropatias, febre, vômito diarreia, artrite, dermatite esfoliativa, lesões ulcerativas na pele, alopecia, dermatite nodular, dermatite pustular, onicogribose, ceratoconjuntivite, uveíte, blefarite, epistaxe, poliúria e polidipsia (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

No cão além dos órgãos viscerais, até 90% dos animais infectados apresentam algum sinal clínico relacionado a pele (SCHIMMING e PINTO e SILVA, 2012) sendo comum o desenvolvimento de úlceras crostosas, que acometem focinho, orelhas, região periorbital, acompanhadas ou não de dermatite furfurácea, e alopecia local ou generalizada (SILVA,

2007), hiperqueratose, pelo seco, opaco, quebradiço e onicogrifose (SCHIMMING e PINTO e SILVA, 2012).

Por ser o maior órgão do corpo e apresentar múltiplos padrões de lesões, a pele é importante no diagnóstico e acompanhamento da progressão da doença (QUEIROZ et al., 2010). Através de imunocitoquímica é possível a quantificação de queratinócitos, macrófagos, células T e células de Langerhans e relacioná-los ao tipo de lesão desenvolvida pelo animal. Sendo também um dos locais de escolha para coleta de material para citologia diagnóstica, onde podem ser observadas formas amastigotas do parasito (SILVA, 2007).

Grande parcela dos animais infectados desenvolve linfadenomegalia devido ao estímulo de proliferação de linfócitos B, plasmócitos, histiócitos, macrófagos, tendo como consequência a produção de anticorpos mediada por Th2 (SALZO, 2008; SCHIMMING e PINTO e SILVA, 2012). Os anticorpos produzidos em resposta a esse estímulo podem formar imunocomplexos solúveis e circulantes, que se depositam tecidos e órgãos diversos causando diversos danos (FREITAS et al., 2012).

As lesões oftálmicas são comuns em animais infectados, mas raramente são a queixa principal, ou aparecem como único sinal clínico. As alterações mais comuns são ceratoconjuntivite, uveíte, corioretinite, também já foi relatado a presença de nódulos em conjuntiva ocular (EGUCHI et al., 2017). Os imunocomplexos também podem se depositar nas articulações causando artrites, assim como as próprias formas amastigotas podem ser encontradas no líquido sinovial dos infectados (Silva et al., 2014).

Ao longo da progressão da doença a deposição de imunocomplexos nos glomérulos podem levar a doença renal crônica (DRC), que leva a comprometimento da função renal por glomerulonefrite e nefrite intersticial, causando proteinúria e aumento da pressão arterial (FREITAS et al., 2012). Também é comum nesses animais azotemia renal, culminando muitas vezes em síndrome nefrótica, com aumentos nos níveis de ureia e creatinina, representando um mau prognóstico para os animais (SILVA, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Quanto as alterações hematimétricas, em relação a série eritrocitária, as mais comuns são: anemia regenerativa ligeira a moderada, geralmente normocítica e normocrômica, que por vezes pode ser hemolítica (QUINTALVA et al., 2021). Na série

leucocitária podem ocorrer tanto leucocitose, quanto leucopenia, associadas a linfopenia, neutrofilia e neutropenia. Também são notadas alterações relacionadas as plaquetas, geralmente trombocitopenia, também há redução da fibrinólise (FREITAS et al., 2012).

No perfil bioquímico sérico normalmente são detectadas alterações relacionadas a produção de anticorpos e aos principais órgãos viscerais atingidos pela doença, sendo as principais: hiperproteinemia, hiperglobulinemia (beta e/ou gamaglobulinemia), hipoalbuminemia, causando uma diminuição a relação albuminas: globulinas (MOTTA et al., 2021). Observa-se também um aumento das atividades das enzimas hepáticas: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST) e Fosfatase Alcalina (FA) (FREITAS et al., 2012).

2.8. Vitamina D

Fisiologicamente classificada como um hormônio esteroide, a vitamina D também é conhecida como Colecalciferol (Vitamina D3, de origem animal) e Ergocalciferol (Vitamina D2, de origem vegetal) (GALVÃO et al., 2013). Nos humanos é produzida principalmente na pele, após exposição aos raios UV, porém nos cães, a vitamina é obtida quase que exclusivamente pela alimentação, não havendo variação sazonal nos níveis séricos de vitamina D destes animais ao longo do ano (MARTORI et al., 2021; WEIDNER e VERBRUGGHE, 2017).

Após a ingestão da vitamina D3, esta liga-se a proteína de ligação sérica à vitamina D (DBP), também conhecida como GC-globulina, sendo transportada para o fígado, onde ocorre o processo conhecido como hidroxilação através da ação das enzimas hidroxilase CYP2R1 e citocromo P450 27A1, onde um radical OH se liga na posição 25, formando a 25-hidroxicalciferol (YANG et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2018).

Após este processo para atingir sua forma ativa a vitamina precisa passar por mais uma hidroxilação sob a ação da enzima citocromo P450 27B1, desta vez no rim, se tornando a 1,25-Di-hidroxicalciferol, conhecida como calcitriol (WEIDNER e VERBRUGGHE, 2017).

Os níveis de vitamina D podem ser mensurados através de diversos tipos de exames, entre eles: cromatografia líquida associada a espectrofotometria de massa, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), quimioluminescência e ELISA (DE CASTRO, 2011), onde são mensurados os níveis de 25- hidroxicalciferol, pois apesar de não ser a

forma ativa da doença, é a forma circulante mais estável e abundante da vitamina D, possuindo uma meia vida que varia entre 10 dias a 3 semanas (WEIDNER e VERBRUGGHE, 2017), sendo níveis abaixo de 20 ng/mL considerado como hipovitaminose (RODRIGUEZ-CORTEZ et al., 2017).

A vitamina D tem seu papel já bem definido no sistema musculoesquelético, na regulação de cálcio e fósforo (YANG et al., 2013) e também como precursora de hormônios esteroidais. Além dos distúrbios desses sistemas, a hipovitaminose tem sido relacionada a: doenças infecciosas, enteropatias crônicas (JORGENSEN et al., 2013), pancreatite, neoplasias, polineurites e doença renal crônica (ZAFALON et al., 2019; HUST, HOMER e MELLANBY, 2020, KURZBARD, BACKUS e YU, 2021).

A regulação da produção de calcitriol ocorre por meio de feedback negativo dos níveis do próprio calcitriol, estando envolvidos também os níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e paratormônio. Para cumprir sua função biológica o calcitriol necessita se ligar ao VDR- Vitamina D receptor, um receptor nuclear presente em diversas células como: linfócitos, células B e T, macrófagos, células Natural Killers, células dendríticas, do epitélio intestinal, túbulo renal, osteoclastos e osteoblastos (MARQUES et al., 2010).

O VDR atua como fator transcricional de genes e torna a vitamina D capaz de regular a expressão de genes através de cascata de sinalização, por ação direta ou interação com regiões promotoras de genes responsivas a vitamina D, ou ainda com interação com fatores de transcrição (MACHADO et al., 2021; WEIDNER e VERBRUGGHE, 2017).

A vitamina D também atua como cofator nas respostas das células B e T, catalisando a produção de citocinas pró-inflamatórias derivadas de Th1 e Th17 além de secreção de IgG17 (RODRIGUEZ-CORTEZ et al., 2017; ZAFALON, et al., 2019), já as células B quando expostas a vitamina D diminuem sua taxa de proliferação, o que reforça que esta apresenta um papel importante provavelmente na imunidade inata, sendo a vitamina mais eficiente em animais com padrão de resposta imune Th1, como ocorre nos murinos (MARTORI et al., 2021).

A vitamina D irá também mediar a ativação dos receptores da família Toll-like (TLR), que integram o sistema inato e possuem resposta antimicrobiana, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e modulação de expressão de citocinas (RODRIGUES-CORTES et al., 2017).

A ação da vitamina D em outros organismos infecciosos, como a *Mycobacterium* sp demonstram que o TLR-2 ativa células apresentadoras de antígenos e aumenta a expressão de genes catelicidina, γ -defensina 445, e CYP27B1, que por sua vez aumentam a produção de VDR e peptídeos antimicrobianos. Dentre estes últimos o peptídeo BMAP-28, da família das catelicidinas, demonstrou efeitos anti-*Leishmania* e propriedades imunomoduladoras em culturas in vitro (MARTORI et al., 2021, RODRIGUEZ-CORTEZ et al., 2017).

2.9. Diagnóstico

Nos últimos anos foram feitos muitos avanços no diagnóstico de LVC, visando validar métodos de alta especificidade e sensibilidade, evitando que animais saudáveis sejam diagnosticados erroneamente, mas ainda há uma grande dificuldade em obter um diagnóstico preciso, pois nenhum método é capaz de determinar o tempo de infecção e os resultados podem variar entre os exames, pois existem características que podem modificar os resultados (PINTO et al., 2016). Os métodos de diagnóstico se dividem em três: parasitológico, sorológico e moleculares.

O exame direto é realizado após coletas de material biológico do animal suspeito, a punção ou aspiração é realizada em órgãos como: baço, fígado, medula óssea, linfonodos e também citologia esfoliativa de pele (MAIA e CAMPINO, 2008; SILVA, 2012). O material colhido pode ser utilizado para realização de esfregaço em lâminas e identificação de formas amastigotas em microscópio óptico. A sensibilidade deste diagnóstico vai depender do órgão onde foi realizado a coleta, variando de 53 a 86% na medula óssea, 53 a 65% em linfonodo e podendo chegar a 98% em baço (LIMA et al., 2013; QUEIROZ et al., 2010; FARIA e ANDRADE, 2012).

Uma característica da LVC é a hipergamaglobulinemia que irá causar um aumento na quantidade de anticorpos, tornando-os detectáveis por inúmeras técnicas que se baseiam na reação antígeno-anticorpo. Estas são técnicas menos invasivas, pois são realizadas a partir de amostras sanguíneas. Como desvantagem podemos citar principalmente a possibilidade de reações cruzadas entre parasitos de morfologia semelhante, no caso de *Leishmania* sp. Podemos citar as reações que ocorrem principalmente com o *Trypanosoma cruzi* e hematozóarios como *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp., a reação de produção de anticorpos geralmente é intensa em animais sintomáticos, podendo o título variar durante as fases inicial e final da doença. Níveis altos de anticorpos,

que variam de 3 a 4 vezes o limiar do teste, conhecido como cut-off, em laboratórios de referência são considerados como positivos para diagnóstico de leishmaniose (LEISHVET, 2018).

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA), é atualmente a técnica utilizada como confirmatório de diagnóstico de LVC no Brasil. Este apresenta como facilidade a possibilidade de analisar várias amostras ao mesmo tempo, podendo também ser utilizados vários tipos de antígenos (MAIA e CAMPINO, 2008; FARIA e ANDRADE, 2012). É um teste que consiste em uma reação antígeno- anticorpo, que geralmente está conjugado em uma placa, que confere uma reação colorimétrica que é detectada por um leitor de espectrofotômetro (O'CONNOR, 2015; SILVA, 2016).

Os testes imunocromatográficos surgiram na década de 1960 para tentar suprir a necessidade de um método que fosse seguro, sensível, de rápida realização e não dependesse de uma infraestrutura laboratorial, visando a facilidade para os clínicos veterinários e realização de testes a campo. Outra facilidade destes testes é que eles podem ser realizados com sangue total, soro, ou outras amostras, como aspirado de medula óssea (GRIMALDI et al., 2012; PINTO et al., 2016; SILVA et al., 2016).

Um dos testes mais utilizados na rotina e que também é o recomendado como exame de para diagnóstico de triagem da LVC no Brasil, é o Dual Path Platform (TR-DPP®- Leishmaniose Visceral Canina). O Teste utiliza uma combinação de proteína A conjugada a ouro coloidal e antígenos recombinantes k28 ligados a uma membrana de nitrocelulose para detecção de anticorpos caninos anti-*Leishmania* (BIOMANGUINHOS, 2011). A sensibilidade do teste varia entre diversos estudos sendo encontrados sensibilidade de 57,45% (SILVA, 2016) a 98% (GRIMALDI, 2012). Atualmente a recomendação é o uso do TR-DPP da Bio-Manguinhos como método de triagem e o ELISA como método confirmatório (BRASIL, 2011).

A reação em cadeia de polimerase PCR, tem sido amplamente utilizada no diagnóstico da leishmaniose, após a extração do DNA do parasito este é amplificado e permite a detecção do agente, pode ser um método qualitativo (QUEIROZ et al., 2010) ou quantitativo (RAMOS et al., 2013) a depender do tipo de exame realizado. A chance de reação cruzada é rara e pode ser minimizada de acordo com o gene específico a ser identificado. É um método considerado de alta especificidade próximo a 100% e sensibilidade que varia entre 38% e 76% (LIMA et al., 2013), além de apresentar a

vantagem de poder ser realizado a partir de variados tipos de amostras como: sangue, medula, pele, linfonodo e secreção conjuntival, uma desvantagem para este tipo de exame ainda é seu alto custo para os tutores (BENASSI et al., 2017; DI PIETRO et al., 2020).

3.Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os níveis séricos de vitamina D em animais naturalmente infectados por *Leishmania infantum* relacionando-os aos sinais clínicos.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar os níveis séricos de vitamina D em animais hígidos e em animais naturalmente infectados por *L. infantum*;
- Associar níveis séricos de vitamina D ao sexo e as faixas etárias de cães naturalmente infectados por *L. infantum*;
- Relacionar os níveis de 25-hidroxivitamina-D com o aumento dos sinais clínicos apresentados pelos cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

4. Referências bibliográficas

ABRANTES, T.R.; WERNECK, G.L.; ALMEIDA, A.S.; FIGUEIREDO, F.B. Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro. **Cad. de saúde pública**. V. 34, 2018. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00021117>

AGRA, M.C.R.; COSTA, P.L.; DUQUE, A.E.S. et al. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an urban area of Northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. V. 49, p. 698-702, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0147-2016>

ALENCAR, B.F.P.; FIGUEIREDO, I.A. Perfil epidemiológico dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Maranhão no período de 2015 a 2017. **Rev. Investig, Bioméd**. V. 10, p. 243-250, 2018.

ALVES, F. S. Diagnóstico e tratamento das alterações de queratinização. In: Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia: Dermatologia em cães e gatos. Editora: fundação de estudo e pesquisa em medicina veterinária e zootecnia. Minas Gerais, 2013.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C.V; NUNES, C. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Rev Bras de Parasit**. V. 19 n 1. P.17-25. 2010.

AZEVEDO, E.M.R; DUARTE, S.C.; COSTA, H.X.et al. Estudo da leishmaniose visceral canina no município de Goiânia, Goiás, Brasil. **Rev Pat Trop**. V 40, n 2, p. 159-168, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v40i2.14941>

BENASSI, J.C.; BENVENGA, G.U.; FERREIRA, H.L.. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Exp parasitol**. V. 177, pg. 93-97. 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.004>

BENASSI, J.C.; BENVENGA, G.U.; FERREIRA, H.L. et al. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesq Vet Bras**. V. 38, n. 6, p. 1058-1063 DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5214

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. TR®-DPP Leishmaniose Visceral Canina. Teste rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*. Bio-Manguinhos, 2011.

BORGES, L.F.N.M.; LOPES, E.G.P.; FREITAS, A.C.P. et al. Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciênc Rural**, v.44, n.2, p.352-357, 2014.

BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1º Edição, 5ª reimpressão. 2014.

BRASIL, NOTA TÉCNICA Nº01/2011CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. 2011.

BRASIL, NOTA TÉCNICA Nº 11/2016/CPV/DFIP/ver/GM/MAPA. 2016.

BRAZIL, R.P. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. **Rev da Soc Bras de Med Trop.** V. 46, p. 263-264, 2013 <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0101-2013>

BRITO, V.N.; ALMEIDA, A.B.P.F.; NAKAZATO, L. et al. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** V. 109, p. 899-904, 2014.

BURNHAM, A.C.; ORDEIX, L.; ALCOVER, M. M. et al. Exploring the relationship between susceptibility to canine leishmaniosis and anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in Ibiza hounds and dogs of other breed in Mallorca, Spain. **Parasit Vectors** v.13, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3992-8>

CAMPOLINA, T.B. VILLEGAS, L.E.M.; MONTEIRO, C.C. et al. Tripartite interactions: *Leishmania*, microbiota na *Lutzomyia longipalpis*. **PLOS NEGL TROP DISEASES.** V. 14, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008666>

CAMPINO, L.; MAIA, C. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. **Act Méd Portuguesa**, v.23, p.859-864, 2010.

CARNEIRO, M.E. Protozoários Flagelados. In: MONTEIRO, S.G. (Org.) **Parasitologia na Medicina Veterinária.** São Paulo, Roca, 2014, p.138-140.

CARVALHO, M.R.; DIAS, A.F.L.; ALMEIDA, A.B.P.F. et al. Leishmaniose visceral canina: percepção, prevalência e distribuição espacial em Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet.** v.29, n 2020. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020017>.

Centers for Disease Control and Prevention- CDC. Parasites – Leishmaniasis, 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

CASTRO, L.S.; DORVAL, M.E.C.; MATHEUS, L.M.D. et al. Leishmania presence in bats in areas endemic for leishmaniasis in central-west Brazil. **Intern. J for Parasit: Parasites and Wildlife**, V. 11, P. 261-267, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.02.008>

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

CUPOLILLO, E.; BOITÉ, M.C.; PORROZZI, R.. Considerações sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. Leishmanioses do continente americano [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, pp. 39-51. ISBN 978-85-7541-568-9. <https://doi.org/10.7476/9788575415689.0003>.

DA SILVA, C.L.G. Nematocera-Mosquitos. In: MONTEIRO, S.G. (Org.) **Parasitologia na Medicina Veterinária.** São Paulo, Roca, 2014, p.104-106.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Vet Parasitol**, v.140, p. 54-60, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Rev de Saúde Pública**, v.40, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Rev da Soc Bras de Med Trop**, v.39, n.4, p.352-356, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; NOGUEIRA, F.S.; MENZ, I. et al. Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **Intern J for Parasit**. v. 50, pg. 171-176, 2020.

DE CASTRO, L.C.G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arq Bras Endocrino Metabólica**, v. 55, pg. 566-575, 2011.

DE SÁ, G. J. L. **Epidemiologia da leishmaniose visceral canina em Parauapebas, Pará, Brasil**. Orientador: Helcileia Dias Santos.2016 55f Dissertação (Mestrado).

DIAS, R.C.F.; PASQUALI, A.K.S; THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Autochthonous canine visceral leishmaniasis cases occur in Paraná state since 2012: isolation and identification of *Leishmania infantum*. **Braz J Vet Parasitol**. V. 29, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019083>

DI PIETRO, S.; CCRINO, C.; FALCONE, A. et al. Parasitemia and its daily variation in canine leishmaniasis. **Parasitol Research**. V. 119 pg. 3541–3548, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06845-7>

EHRCHEN, J.; HELMING, L.; VARGA, G. et al. Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*. **FASEB J**. v. 21, n. 12, 2007.

FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz de Saúde**, v.3, n.2, p.47-57, 2012.

FERREIRA, S.A.; FERREIRA, M.G.P.A.; HUPPES, R.R. et al. Leishmaniose visceral canina: Revisão de literatura. **Medvop Dermato - Rev de Edu Continuada em Dermatologia e Alergologia Vet**; V. 3, 2014.

FIGUEIREDO, M. J. F. M.; SOUZA, N.F.; FIGUEIREDO, H.F. et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciênc anim bras**. , v. 15, n. 1, p. 102-106, 2014.

FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endozoa area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet Parasitol**, v.111, p.161–173, 2003.

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

Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ. As leishmanioses, 1997. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/referencias.htm>

Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ. Doenças negligenciadas,2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>

Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ. Leishmaniose, 2013. Disponível em : <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>

GALVÃO, L.O.; GALVÃO, M.F; REIS, C.M.S. et al. Considerações atuais sobre a vitamina D. **Bras Médica** v. 50, n4, pg. 324-332, 2013.

GIUNCHETTI,R.C.; SILVEIRA, P.; RESENDE, L.A. et al. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Vet Parasitol**, V. 271, pg. 87-97, 2019. ISSN 0304-4017, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.05.006>.

GRIMALDI JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L. et al.. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transac of the Royal Society of Trop Med and Hygiene**. V. 106, n.1, p. 54-56, 2012.

GRILL, F.; ZURMENDI, M. Leishmaniasis visceral en Uruguay. **Arch Pediatr Urug**. V. 88, p.32-38,2017.

GONTIJO, C.; MELO, M. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev bras epidemiol**. vol.7 no.3 São Paulo Sept. 2004.

GUIMARÃES, V.C.F.V.; COSTA, P.L.; SILVA, F.J. et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Rev da Soc Bras de Med Trop**, v.45, n.1, p.66-70, 2012.

GUIMARÃES, V.C.F.V.; PRUZINOVA, K.; SADLOVA, J. et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competente for *Leishmania infantum*. **Parasit & Vect**. V. 9, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1444-2

HIRSCHMANN, L.C.; BROD, C.S.; RADIN, J. et al. Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul no Brasil. **Rev de Patol Trop**, v.44, n.1, p.33-44, 2015.

HUST, E.A.; HOMER, N.Z.; MELLANBY, R.J. Vitamin D Metabolism and Profiling in Veterinary Species. **Metabol**. V. 10, p.371, 2020. DOI: 10.3390/metabo10090371

IRIS- INTERNACIONAL RENAL INTEREST SOCIETY. Treatment recommendations for CKD in dogs. ©2019

JORGENSEN, S.P. HVAS, C.L.; AGNHOLT, J. et al. Active Crohn's disease is associated with low vitamin D levels. **Sciencedirect**. V. 7, n. 10, 2013.

JÚNIOR, J.D.F.; MAZZINGHY, C.L.; FRANÇA, E.C.; SILVA, A.C. Leishmaniose visceral canina: revisão. **Pubvet**. V. 15, n.3, p. 7-18, 2021. DOI: 10.31533/pubvet.v15n03a779.1-8

KURZBARD, R.A.; BACKUS,R.C.; YU, S. Rapid improvement in vitamin D status with dietary 25-hydroxycholecalciferol in vitamin D insufficient dogs. **Journal of Nutri Scien**, V. 10, 2021. Doi: 10.1017/jns.2021.4

LAISON, R. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev Pan-Amaz Saude**. V 1(2), p. 13-32, 2010. Doi: 10.5123/S2176-62232010000200002

LEONEL, J.A.F.; TANNINHÃO, B.; ARANTES, J. A. et al. Detecteion of *Leishmania infantum* DNA in blood samples of horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) by

PCR. **Rev do Inst de Med Trop de São Paulo**. V. 63, 2021. <http://doi.org/10.1590/S1678-9946202163012>

LEVY, B. Leishmaniose ocular: novidades sobre uma doença silenciosa. **Agência Fiocruz de Notícias**. 2009 Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose-ocular-novidades-sobre-doen%C3%A7a-silenciosa>

LIMA, C.A.; TEIXEIRA, K.R.; MOREIRA, J.P.F.F.; TEIXEIRA, K.R. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma revisão. **PUBVET** V. 7, N. 25, Ed. 248, Art. 1641, Suplemento 1, 2013.

LIU, P.T.; STENGER, S.; LI, H. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Scien**. V. 24, 2006. doi: 10.1126/science.1123933

MACHADO, P.A.; ESCRIVANI, D. O.; GOMES, D.C.O. et al. Vitamin D increases killing of intracellular *Leishmania amazonensis* *in vitro* independently of macrophage oxidative mechanisms. **Parasitol** v. 147, p.1792–1800, 2020. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001791>

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol**, v.158, p.274-287, 2008.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Braz J of Vet Research and Ani Scien**, São Paulo, v.50, n.5, p.341-352, 2013.

MARÍN-GARCIA, P.J.; LLOBAT,L. Canine cytokines profile in an endemic region of *L. infantum*: related factors. **Vet Scien**. V. 9, 2022. <https://doi.org/10.3390/vetsci9060305>

MARQUES, C.D.L.; DANTAS, A.T.; FRAGOSO, T. S.; DUARTE, A.L.B.P. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. **Bras J Rheumatol**. V.50, p. 67-80. 2010.

MARTORI, C.; VELEZ, R.; GALLEGO, M. et al. Vitamin and leishmaniasis: Neither seasonal nor risk factor in canine host but potential adjuvant treatment through *cbd103* expression. **PLOS Neg trop dis**. V.15(8): e0009681. 2021 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009681>

MAURÍCIO, L.; STOHARD, J.; MILES,M. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, vol.16, 5, 2000.

MENDES, J.R.; LOPES, A.S; SOUSA, M.S.C.; SILVA, M.J.M. O Piauí como coadjuvante da leishmaniose visceral brasileira. **Braz J of Development**. V. 6, n. 3, p. 11210-11219, 2020. DOI:10.34117/bjd6n3-114

MIRANDA, D. E. O.; SALES, K.G.S.; FAUSTINO, M.A.G. et al. Ecology of sand flies in a low-density residential rural area, with mixed forest/agricultural exploitation, in north-eastern Brazil. **Act Trop**. V. 146, pg. 89-94. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.011>

MISSAWA, N.A.; LOROSA, E.S.; DIAS, E.S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Rev da Soc Bras de Med Trop**, v.41, n.4, p.365-368, 2008.

MOREIRA, N. B.; PINTO, A. Z. L.; MUTZEMBERG, E. R. et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos dermatológicos e dermatoses associadas. **Act Scien Vet**, v. 44, p. 1–4, 2016.

MOTTA, L.M.; EBERT, K.G.; BATISTA, K.Z.S. Diagnóstico imunológico e molecular da Leishmaniose Visceral Canina: Revisão. **Pubvet Med Vet e Zoo**. v.15, n.08, p.1-7, 2021.

NAVEDA, L. A. B.; MOREIRA, E.C.; MACHADO, J.G. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.58, n.6, p.988-993, 2006.

O'CONNOR, T.P. Snap Assay technology. **Top in compa and med.** 30, p. 132-138, 2015.

ORDEIX, L.; DALMAU, A.; OSSO, M. et al. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. **Parasit & Vect.** V. 10, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2051-6>

OLÍAS-MOLERO, A.I., CORRAL, M.J., JIMÉNEZ-ANTÓN, M.D. et al. Early antibody response and clinical outcome in experimental canine leishmaniasis. **Scien Rep**, v.9, p. 18606, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55087-w>

PEIXOTO, P.V.; KLEM, M.A.P.; FRANÇA, T.N.; NOGUEIRA, V.A. Hipervitaminose D em animais. **Pesq vet bras.** V. 32, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700001>

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Scien**, v.321, p.970-974, 2008

PINTO, A.J.W.; RIBEIRO, V.M.; TAFURI, W.L. The immunochromatography use in canine visceral leishmaniasis in Brazil: a “quick solution” of a complex diagnostic? Rapide test in dogs with leishmaniasis. **Ann Clin Pathol** 2(4):1033, 2016.

PIRAJÁ, G. V.; SILVA, D. T.; PERUCA, L.C.B. et al. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Vet e Zoo**, v. 20, n. 2, p. 203-216, 2013.

PORTILLO, V.H.S; BENÍTEZ, S.R.B.; ACOSTA, L.E. Prevalencia de leishmaniasis visceral canina en el área de influencia de la unidad de salud de la familia Marín Ka'Aguy, Luque. **Rev. salud pública Parag.** V. 1, p. 11-18, 2011.

Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/140937>>.

QUEIROZ, N.M.G.P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T.M.F.S. et al. Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com RIFI e ELISA-teste. **Ver. Bras. Parasitol. Vet.** V. 19, p.32-38, 2010.

QUINTAVALLA, F.; BASINI, G. BUSSOLATI, S. et al. Redox Status in Canine Leishmaniasis. **Anim**, v. 11, 119. <https://doi.org/10.3390/ani11010119>

RAMOS, R. A. N.; RAMOS, C.A.N; SANTOS, E.M.S. et al., Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. **Rev Bras de Parasitol Vet**, v.22, n.3, p.346-350, 2013.

REGO, F.D.; SOARES, R.P. *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector. **An Acad Bras Cienc** V. 93, 2021. DOI 10.1590/0001-3765202120200254

- REGUERA, R.M.; MORÁN, M.; PÉREZ-PERTEJO, Y. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**, Vol. 227, P. 98-114, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011>.
- RIBEIRO, C.R.; GONÇALVES, C.A.; CRUZ, L.M.; GALERA, P. Prevalência da leishmaniose visceral canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal-Brasil. **Cienc. anim. bras.** v.20, p.1-8, 2019. DOI: 10.1590/1089-6891v20e-49589
- RIBOLDI, E.; CARVALHO, F.; ROMÃO, P.R.T. et al. Molecular method confirms canine *Leishmania* infection detected by serological methods in non-endemic área of Brazil. **Korean J Parasitol.** Vol. 56, n. 1: 11-19, 2018.
- RODRIGUES, A.C.M.; MELO, A.C.F.L.; JÚNIOR, A.D.S. et al. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Pesq. Vet. Bras.** v.37, p.1119-1124, 2017. DOI: 10.1590/S0100-736X2017001000013
- RODRIGUES, N.J.L.; BENETTON, R.P.P.; OLIVEIRA, N.N. et al. Situação da leishmaniose visceral canina (LVC) no estado de São Paulo. **Vet. e Zootec.** v 28, p. 001-009, 2021.
- RODRIGUEZ-CORTEZ, A.; OJEDA, A.; FRANCINO, O. et al. Leishmania Infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a “Gold Standard”. **The Americ Socie of Trop Med e Hygiene.** V.82 p.251-256, 2010.
- RODRIGUEZ-CORTEZ, A.; MARTORI, C.; MARTÍNEZ-FLOREZ, A. et al. Canine Leishmaniasis Progression is Associated with Vitamin D Deficiency. **Scient Report.** V. 7, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-03662-4
- ROSA, C.T.; SCHOEMAN, J.P.; BERRY, J. et al. Hypovitaminosis D in dogs with spirocercosis. **J Vet Intern Med.** 2013;27(5):1159-1164. doi:10.1111/jvim.12161
- ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral canina: atualizações no diagnóstico, controle e prevenção. **Pet J CEVA.** 2018.
- SALES, D.P.; CHAVES, D.P.; MARTINS, N.S.; SILVA, M.I.S. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina e Humana no estado do Maranhão, Brasil (2009-2012)*. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 24, n. 3, p. 144-150, 2017.
- SALZO, P.S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. **Nos clínic**, São Paulo, ano 11, n.63, p.30-34, 2008.
- SATRAGNO, D.; VERGER, C.L.; LOZANO, A. et al. Autochthonous Outbreak and Expansion of Canine Visceral Leishmaniasis, Uruguay. **Emerg Infect Dis.** V. 23, p. 536–538, 2017. doi: [10.3201/eid2303.160377](https://doi.org/10.3201/eid2303.160377)
- SCHIMMING, B.C.; J.R.C. PINTO E SILVA. Leishmaniose visceral canina- Revisão de literatura. **Rev eletrônica de med vet.** N. 19, 2012.
- SILVA, F.S. Patologia e Patogênese da Leishmaniose Visceral Canina. **Rev Tróp Ciên Agrá e Bio**, v.1, n.1, p. 20-31, 2007.
- SILVA, C.M.H.; WINCK, C.A. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Rev da Uni Vale do Rio Verde.** V. 16, n. 1, 2018.

SILVA, J.P. et al. Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. **Rev da Soc Bras de Med Trop** v. 45, p. 480-484, 2012.

SILVA, O.J.A.; SILVA, F.J.; MACEDO, L.O. et al Sandflies in na endemic área for Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** V.28, n.4, 2019. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019073>

SILVA, C.B.; VILELA, J.A.R.; PIRES, M.S. et al. Seroepidemiological aspects of *Leishmaniasis* spp. in dogs in the Itaguaí micro-region, Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** V.22, p. 39-45, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000100009>

SILVA, F.L, OLIVEIRA, R.G.; SILVA, T.M.S. et al. Venereal transmissions of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol.** V. 160, p. 55-59, 2009.

SILVA, A.R.S.; MACEDO, A.A.; MOROZ, L.R. et al. Caso alóctone de leishmaniose visceral canina, no município de Campo Mourão, Paraná, Brasil. **Sem: Ciên Agrárias**, v.33, n.2, p.769-774, 2012.

SILVA, M. N. G.; PEREIRA, D.T.P.; MISTIERI, M.L.A.; LUBECK, I. Parasitological analysis of synovial fluid from dogs naturally infected with *Leishmania* sp. **Ciên Rural**, v. 44, p. 1236-1239, 2014.

SILVA, R.B.S.; MENDES, R.S.; SANTANA, V.L. et al; Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pes Vet Bras.** V. 36, 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000700011

SILVA, C. M. H. S.; WINCK, C. A. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Rev Da Uni Vale Do Rio Verde**, v. 16, n 1, p. 1–12, 2018.

SILVA, E.B.; SILVA, P.N.; MORAES, S.C.; KATAGIRI,S. Análise de fatores de risco para leishmaniose visceral canina em área urbana. **Rev Saúde e Meio Ambiente- UFMS.** V.12, p.144-153, 2021.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit & Vect**, v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; MONTSERRAT-SAGRA, S.; ORDEIX, L.; MARTÍNEZ-ORELLANA, P. *Leishmania infantum*-specific production of INF- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasit & Vect** v.9, 2016.

DOI: 10.1186/s13071-016-1598-y

SOLOMON, O.D.; SINAGRA, A.J.; NEVOT, M.C. et al. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V. 103, p.109-111, 2008.

TEIXEIRA, H.C.; DIAS, L.S.; BIZARRO, H,D.S.; CASTRO, J.M.A. Efeitos contrastantes da vitamina D sobre a resposta imune inata e adquirida e seu impacto na recuperação da tuberculose. **HU Rev.** v. 44, n. 3, p. 369-378, 2018.

TESTASICCA, M.C.S.; SANTOS, M.S.S.; MACHADO, L.M. et al. Antibody responses induced by Leish-Tec, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Vet Parasitol.** v. 204, pg. 169-176. 2014.

TICHA, L.; KYKALOVA, B.; SADLOVA, J. et al. Development of Various *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae* Strains in Three *Phlebotomus* Species. **Microorganisms.** V. 29, n 9, 2021. doi: 10.3390/microorganisms9112256. PMID: 34835382; PMCID: PMC8622532.

TODOLÍ, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; DE JUAN, R. et al. Humoral and In Vivo Cellular Immunity against the Raw Insect-Derived Recombinant *Leishmania infantum* Antigens KMP11, TRYP, LACK, and papLe22 in Dogs from an Endemic Area. **The Ame Socie of Trop Med and Hygiene.** V.83, n. 6, p. 1287-1294, 2010. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0784>

UBIRAJARA FILHO, C.R.C.; SALES, K.G.S.; LIMA, T. A.R.F. et al. *Lutzomyia evandroi* in a New Area of Ocvurence of Leishmaniasis. **Act Parasitol.** V. 65, p 716-7122, 2020. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00215-0>

VELEZ, R.; BALLART, C.; DOMENECH, E. et al. Seroprevalence of canine *Leishmania infantum* infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: The example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain, **Prevent Vet Med**,V. 162, p. 67-75, 2019. ISSN 0167-5877, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.015>

VIEIRA, T.M.; SILVA, S.O.; LIMA, L. et al. *Leishmania* diversity in bats from an endemic area for visceral and cutaneous leishmaniasis in Southeasterns Brazil. **Act Trop.** V.228, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106327>

VON ZUBEN, A.P.B.; DONALÍSIO, M.R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 32(6):e00087415, jun, 2016

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00087415>

XAVIER, S.C.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arq. Med. Vet. Zootec.**, v.58, p.994-1000, 2006.

YANG, C.; LEUNG, P.S.C.; ADAMOPOULOS, I.E. GERSHWIN, M.E. The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: a Comprehensive Review. **Clinic Rev Allerg Immunol.** 2013. DOI 10.1007/s12016-013-8361-3

ZAFALON, R. V.A.; RISOLIA, L.W.; PEDRINELLI, V. et al. Vitamin D metabolism in dogs and cats and its relation to diseases not associated with bone metabolism. **J Anim Physiol Anim Nutr.** N.104, p.322–342,2020.

WEIDNER, N., e VERBRUGGHE, A. Current knowledge of vitamin D in dogs. **Critical reviews in food scien and nutrit**, V.57, p.3850–3859, 2017. 10.1080/10408398.2016.1171202

World Health Organization- WHO. Leishmaniasis, 2016.

Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

World Organization for Animal Health- OIE. Leishmaniasis, Terrestrial Manual OIE, 2008.
Disponível em:
http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.01.08_LEISHMANIOSIS.pdf

World Health Organization. Leishmaniasis- Epidemiological situation, 2019

Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

**Níveis séricos de 25-hidroxivitamina-D em cães com infecção natural por
Leishmania infantum (Nicollle, 1908)**

**(manuscrito a ser submetido ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina
Veterinária e Zootecnia)**

Níveis séricos de 25-hidroxivitamina-D em cães com infecção natural por *Leishmania infantum* (Nicollle, 1908)

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina-D em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* relacionando às manifestações clínicas nestes pacientes. Foram utilizados soros de 43 animais, divididos em dois grupos: Grupo I, composto por 10 cães, negativos ao teste imunocromatográfico, Grupo II, com 33 animais, reagentes ao teste imunocromatográfico e positivos para formas amastigotas de *L. infantum* na biopsia de medula óssea. Os níveis de 25-hidroxivitamina-D foram mensurados por quimioluminescência. Os resultados evidenciaram variação entre 20 - 52 ng/mL no Grupo I e de <3 - 176 ng/mL no Grupo II, sendo que 39,39% dos cães deste grupo apresentaram hipovitaminose, com níveis abaixo de 20 ng/mL. Os animais do Grupo I apresentaram dermatite descamativa. No Grupo II foi observado onicogribose, linfodemegalia, dermatites, alopecia, paroníquia, oftalmopatias, artrites, diarreia. Os níveis de 25-hidroxivitamina-D não diferiram significativamente em relação ao sexo e faixa etária nos grupos I e II. Os dados deste estudo sugeriram que apesar da predominância de onicogribose nos animais com níveis séricos de 25-hidroxivitamina-D menores que 20 - 50 ng/mL e dermatite descamativa em animais com níveis séricos maiores que 50 ng/mL, novos estudos são necessários para avaliar a participação de 25-hidroxivitamina-D na patogênese destes quadros clínicos.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, zoonose, calcitriol, hipovitaminose.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the serum levels of 25-hydroxyvitamin-D in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* relating to the clinical manifestations in these patients. Sera from 43 animals were used, divided into two groups: Group I, composed of 10 dogs, negative to the immunochromatographic test, Group II, with 33 animals, reagent to the immunochromatographic test and positive for amastigote forms of *L. infantum* in the bone marrow biopsy. Levels of 25-hydroxyvitamin-D were measured by chemiluminescence. The results showed a variation between 20 - 52 ng/mL in Group I and <3 - 176 ng/mL in Group II, with 39.39% of the dogs in this group showing hypovitaminosis, with levels below 20 ng/mL. Group I animals had desquamative dermatitis. In Group II, onychogryphosis, lymphademegaly, dermatitis, alopecia, paronychia, ophthalmopathies, arthritis, diarrhea were observed. Levels of 25-hydroxyvitamin-D did not differ significantly in terms of sex and age group in groups I and II. The data from this study suggested that despite the predominance of onychogryphosis in animals with serum levels of 25-hydroxyvitamin-D less than 20 - 50 ng/mL and desquamative dermatitis in animals with serum levels greater than 50 ng/mL, further studies are needed to evaluate the participation of 25-hydroxyvitamin-D in the pathogenesis of these clinical conditions.

Key-words: Canine visceral leishmaniasis, zoonosis, calcitriol, hypovitaminosis.

Introdução

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose parasitária emergente que atinge entre 2% a 50% da população canina nos países endêmicos (Rombolà et al., 2021). Os protozoários do gênero *Leishmania* sp. são responsáveis por esta enfermidade transmitida principalmente de maneira vetorial através do repasto sanguíneo de fêmeas dos insetos flebotomíneos (Brasil, 2014). De origem rural, a doença tem sofrido mudanças na sua epidemiologia devido as modificações antrópicas e expansão das cidades brasileiras, com urbanização desordenada. Desta forma, o cão doméstico passou a ter maior importância nestas áreas densamente povoadas por ser considerado o principal reservatório urbano do parasito (Abrantes et al., 2018).

Uma vez infectado por *L. infantum*, o organismo do animal desencadeia respostas imunes inata e adaptativa. A relação entre estas respostas é determinante para o surgimento dos sinais clínicos, que estão relacionados a inflamação piogranulomatosa que o parasito causa nos principais órgãos-alvo da doença (ORDEIX et al., 2017). Em cães, a resposta imune mediada por células T-helper 2 (Th2) é favorecida frente a infecção o que resultará na produção de citocinas inflamatórias que irão ativar a proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos, que irão se depositar em diferentes órgãos, além de inibir a resposta mediada por células T-helper 1 (Th1) que ativará a resposta imune celular considerada protetiva contra a infecção (Freitas et al., 2012).

O diagnóstico da LVC muitas vezes é difícil pois os sinais clínicos são inespecíficos e comuns a outras enfermidades, sendo os principais: onicogribose, linfadenopatia, febre, dermatites: descamativa, pustular, ulcerativa e nodular, caquexia, hiporexia, esplenomegalia, hepatomegalia, diarreia, vômitos, problemas articulares e oftálmicos (Solano-Gallego et al., 2011) além de alterações hematimétricas e bioquímicas relacionadas ao processo inflamatório vascular, hepático e renal (Quintavalla, et al 2011).

Estudos tem demonstrado que o papel da vitamina D vai além do metabolismo do cálcio e fósforo, estando relacionada a vários processos envolvendo diversas células que possuem receptores para a vitamina D (VDR), como por exemplo, células dendríticas, macrófagos, células T CD4+, CD8+, interferindo na resposta inflamatória através da transcrição de genes (Weidner e Verbrugghe, 2017).

Para cães a vitamina D é obtida exclusivamente através da alimentação, a Associação de Controle Alimentar Oficial Americana recomenda que para a manutenção de cães adultos deve haver um acréscimo de 500-5000 UI de vitamina D por matéria seca de ração, ainda existem poucos estudos avaliando o papel da vitamina no metabolismo extra esquelética em cães e não há um parâmetro definido para os níveis séricos de 25 (OH) D (Weidner e Verbrughe, 2017).

Apesar da relação da leishmaniose com a inflamação em diversos órgãos, a relação entre a infecção e o status dos níveis séricos de vitamina D nesses animais ainda não está bem estabelecido. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina-D em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e relacionar aos sinais clínicos característicos da doença.

Materiais e métodos

Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o número: 8764010520.

Animais e processamento das amostras de soro

O estudo foi realizado a partir de um banco de soros de cães de diferentes raças, idades e sexo, provenientes da Região Metropolitana de Recife (RMR).

Foram selecionados 43 soros após análise das fichas clínicas individuais de primeiro atendimento dos animais e obtenção de dados referentes a raça, sexo, idade, sinais clínicos e informações sobre coleta de amostras biológicas.

Os soros dos foram divididos em dois grupos: Grupo I (GI), composto por 10 amostras, para o qual foi utilizado como critério de inclusão o teste imunocromatográfico para Leishmaniose visceral canina não reagente. O Grupo II (GII), composto por 33 soros, para o qual o critério de inclusão foi o teste de triagem imunocromatográfico reagente e exame parasitológico de medula óssea positivo para formas amastigotas de *Leishmania* sp.

Dosagem de 25-hidroxivitamina-D

Para os grupos GI e GII foram avaliados os níveis de 25-hidroxivitamina-D em laboratório privado. Para a quantificação de 25-(OH)-D, pelo método de quimiluminescência, foi utilizada uma alíquota de soro de 500µl. As amostras de soro foram processadas no analisador de imunodiagnóstico UniCelDxl 800 (BeckmanCoulter) e o kit de ensaio Access 25 (OH) Vitamin D total (BeckmanCoulter) para Sistemas de Imunoensaio Access 2, de acordo com as especificações do fabricante, para obter os níveis séricos de 25-(OH)-D.

Níveis de vitamina D <20 ng/mL foram considerados como hipovitaminose, ≥20 ng/mL e <50ng/mL como insuficiência e acima de 50ng/mL como suficiência, segundo Rodriguez-Cortez et al., (2017), níveis acima de 169 ng/mL como hipervitaminose Nachreiner et al. (2014).

Análise de dados

Os dados foram analisados por estatística descritiva. O Teste-G foi utilizado para comparar os níveis séricos de vitamina D nos grupos GI e GII, bem como, para associar os níveis de vitamina D ao sexo, as faixas etárias e aos sinais clínicos apresentados pelos cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

O nível de significância foi de 5%. As análises foram realizadas utilizando o software BioEstat versão 5.3 (Ayres et al., 2007).

Resultados

O grupo GI foi composto por 60% (6/10) de fêmeas e 40% (4/10) de machos. Todos os animais (100%) estavam na faixa etária entre 2 e 8 anos e não possuíam raça definida (SRD). Por outro lado, o grupo de animais positivos (GII) foi composto por 45,45% (15/33) de fêmeas e 54,55% (18/33) de machos. Em relação às faixas etárias dos animais componentes do GII, 15,15% (5/33) tinham até dois anos, 69,69% (23/33) de dois a oito anos e 15,15% (5/33) apresentavam idade acima de 8 anos. Quanto as raças, 54,55% (18/33) dos animais eram SRD, enquanto que, 9,09% (3/33) eram Daschund, 6,06% (2/33) Maltes e 3,03% (1/33) pertenciam a cada uma das raças: Beagle, Boiadeiro Australiano, Border Collie, Fox Paulistinha, Labrador, Pinscher, Pitbull, Poodle, Pug e Samoieda.

Entre as raças de GII, os Maltês, o Pug e dois Daschund apresentaram hipovitaminose D (38,46%), e um Daschund apresentou insuficiência. Os sinais clínicos desses animais foram variados, porém todos apresentaram onicogribose. Entre os animais com suficiência de vitamina D 69,23% (9/13) pertenciam a raças puras nos quais 88,88% (8/9) apresentaram dermatite descamativa e ulceração.

Os valores de vitamina D obtidos entre os grupos estudados apresentaram variações. Dentre os animais do GI, os níveis séricos variaram entre 20 ng/mL e 52,2 ng/mL, portanto a maioria dos animais com insuficiência da vitamina D e um com suficiência. Os cães agrupados no GII apresentaram valores inferiores a 3 ng/mL até 176 ng/mL. Vale ressaltar que destes, 39,39% (13/33) apresentaram hipovitaminose com níveis abaixo de 20ng/mL (Teste-G = 22,0082 p < 0,0001) (Tabela 1).

As frequências absolutas e relativas de animais de ambos os grupos, relacionadas com os níveis séricos de vitamina D baseados em Rodriguez-Cortez et al., (2017) e Nachreiner et al. (2014) estão descritas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Frequências absolutas (FA) e relativas (FR%) de animais pertencentes aos grupos GI e GII com diferentes níveis séricos de 25(OH)D.

GRUPOS	FA (FR%)		
	<20 ng/mL 25(OH)D	≥20 ng/mL <50 ng/mL 25(OH)D	> 50 ng/mL 25(OH)D
GI	-	9 (90)	1 (10)
GII	13 (39,39)	7 (21,21)	13 (39,39)

Tabela 2. Frequências absolutas (FA) e relativas (FR%) quanto ao sexo e idade dos animais dos Grupos GI e GII em relação aos níveis séricos de vitamina D.

Sexo	Faixa etária	FA (FR%)					
		Níveis séricos de vitamina D (ng/mL)					
		<20 ng/mL		≥20- <50 ng/mL		>50ng/mL	
		GI	GII	GI	GII	GI	GII
Fêmea	<2 anos			-	1 (3,03)	-	1 (3,03)
	2-8 anos	-	5 (15,15)	5 (83,33)	3 (9,09)	1(16,66)	3 (9,09))
	>8 anos	-	2 (6,06)	-	-	-	-
Macho	<2 anos	-	2 (6,06)	-	-	-	1 (3,03)
	2-8 anos	-	3 (9,09)	4 (100)	3 (9,09)	-	6 (18,18)
	>8 anos	-	1 (3,03)	-	-	-	2 (6,06)

Não houve diferença estatística em relação aos níveis de vitamina D entre machos e fêmeas do grupo GI (Teste-G = 0,7139; p = 0,3981) e também no grupo GII (Teste-G = 1,7996 p = 0,4067). Quando comparados os animais não infectados (GI) com os infectados por *L. infantum* (GII) houve diferença estatística em relação aos níveis de vitamina D e o sexo dos animais avaliados (Teste-G = 9,5864; p = 0,0083) com predominância de machos com suficiência de vitamina D (GII).

Em relação à idade, a predominância de animais foi para a faixa etária de 2 a 8 anos e sem diferença estatística em relação aos níveis de vitamina D (Teste-G = 2,5705; p = 0,6321).

Dentre os animais do GI, 20% (2/10), eram fêmeas e apresentavam sinais clínicos sugestivo de LVC, como dermatite descamativa e estavam dentro da faixa de nível sérico de 20-50 ng/mL de 25 (OH)D.

No GII todos os animais apresentavam sinais clínicos da doença (100%; 33/33), dos quais 96,96% (32/33) desenvolveram mais de um sinal clínico de LVC.

Os principais sinais clínicos identificados nos animais do GII foram: linfadenomegalia (51,51%), dermatite descamativa (60,60%), alopecia (63,63%) dermatite ulcerativa (48,48%), dermatite nodular (24,24%) dermatite pustular (6,06%), onicogrifose

(69,69%), paroníquia (6,06%), conjuntivite (12,12%), uveíte (9,09%), problemas articulares (30,30%), epistaxe (3,03%). Foi observado que os animais do grupo GII com níveis de vitamina D <20ng/mL e níveis de $\geq 20 - \leq 50$ ng/mL apresentaram predominância de onicogribose, enquanto que em animais com níveis > 50ng/mL houve predominância de dermatite descamativa (Teste-G = 34,3212 p < 0,0001) (Tabela 3)

Tabela 3. Frequências absolutas (FA) e relativas (FR%) de animais infectados por *L. infantum* (GII) e sinais clínicos apresentados de acordo com os níveis séricos de 25 (OH)D em ng/mL.

SINAIS CLÍNICOS	FA (FR%)			Total
	<20 ng/mL 25(OH)D	≥ 20 ng/mL <50 ng/mL 25(OH)D	> 50 ng/MI 25(OH)D	
Onicogribose	13/13 (100)	5/7 (71,42)	5/13 (38,46)	25/33 (75,75)
Linfoadenomegalia	10/13 (76,92)	4/7 (57,14)	3/13 (23,07)	17/33 (51,51)
Alopecia	11/13 (84,61)	4/7 (57,14)	6/13 (46,15)	21/33 (63,63)
Dermatite descamativa	7/13 (53,84)	4/7 (57,14)	9/13 (69,23)	20/33 (60,60)
Dermatite ulcerativa	5/13 (38,43)	3/7 (42,85)	8/13 (61,53)	16/33 (48,48)
Dermatite pustular	1/13 (7,69)	1/7 (14,28)	-	2/33 (6,06)
Dermatite nodular	-	4/7 (57,14)	4/13 (30,76)	8/33 (24,24)
Conjuntivite	3/13 (23,07)	1/7 (14,28)	-	4/33 (12,12)
Uveíte	2/13 (15,38)	1/7 (14,28)	-	3/33 (9,09)
Paroníquia	-	1/7 (14,28)	1/13 (7,69)	2/33 (6,06)
Epistaxe	1/13 (7,69)	-	-	1/33 (3,03)
Alterações articulares	4/13 (30,76)	2/7 (28,57)	4/13 (30,76)	10/33 (30,30)

Discussão

A maioria dos cães do grupo GI apresentaram insuficiência de vitamina D, que pode estar relacionado a uma alimentação pobre neste nutriente. Em relação ao grupo GII, 39,39% dos animais apresentaram hipovitaminose com níveis abaixo de 20 ng/mL (Teste-

G = 22,0082 p < 0,0001). Os baixos níveis de vitamina D observados causa preocupação devido a sua grande importância na manutenção do fortalecimento do sistema imunológico.

Sabe-se que na pele de cães não são encontrados metabólitos intermediários da vitamina D como o D,7-desidrocolesterol, sendo a vitamina D obtida essencialmente da alimentação e não há um controle rigoroso na indústria de rações (Wiedner e Verbrugge, 2016), deste modo, embora os animais do GI sejam cães negativos pra *Leishmania* sp., os mesmos são provenientes de abrigos, no qual os animais não tem acesso muitas vezes a uma dieta equilibrada e com ração de boa qualidade.

Os animais do grupo GII, pertenciam a tutores diferentes e recebiam alimentações diversas, o que pode contribuir para a ampla variação dos valores de 25 (OH) D encontrados neste grupo (< 3ng/mL a 176 ng/mL).

Além da alimentação outras enfermidades podem ter relação ao consumo de vitamina D, como desordens musculoesqueléticas, insuficiências hepáticas e renais (Peixoto et al., 2012). A hipovitaminose D pode ser associada a progressão de doenças infecciosas, relacionadas provavelmente a processos inflamatórios, já que esta atua na ativação de macrófagos induzida por interferon- γ , que agem em sinergismo a expressão de receptores de vitamina D na presença da vitamina (Ehrchen et al., 2007; Rosa et al., 2013).

Estudos demonstram que animais infectados pelo protozoário *Babesia rossi*, apresentam níveis de 25(OH)D inferiores a animais saudáveis e que há uma relação com a gravidade da enfermidade, sendo a hipovitaminose não relacionada a danos hepáticos ou renais, o que sugere que em processos infecciosos a deficiência está relacionada ao processo inflamatório (Dvir et al., 2019).

Estes fatores podem influenciar para que os níveis séricos da vitamina D em alguns animais estejam próximo ao limite inferior para as necessidades caninas, Martori et al. (2021) demonstrou que apesar dos níveis de vitamina D diminuírem ao longo da progressão da LVC e que não há diferença estatisticamente significativa entre animais infectados ou não.

Apesar de não serem reagentes para *Leishmania* sp., 20% dos animais do GI apresentaram dermatite descamativa, um sinal clínico inespecífico que pode acometer animais infectados, porém não é patognomônico da enfermidade e está presente em outras

doenças que acometem a pele dos animais como dermatofitose, demodicose, dermatite atópica, hipersensibilidade alimentar, desordens nutricionais, doenças autoimunes (Alves, 2013).

Dentre os animais do GII, os principais sinais clínicos identificados foram as alterações dermatológicas que incluem além das dermatites furfuráceas, ulcerativas, nodulares e papulares, a alopecia, corroborando com os achados de Schimming e Pinto e Silva, 2012 e Assis et al. (2010) que identificou esses sinais em 71,6% dos animais oligossintomáticos e 100% dos animais polissintomáticos e de Moreira et al. (2016) em que 70% dos animais apresentavam sinais dermatológicos.

Nesta avaliação 84,84% (28/33) dos animais que apresentaram ao menos uma lesão dermatológica, também obtiveram níveis séricos de vitamina D abaixo de 50 ng/L, sendo que 36,36% (12/33) apresentaram níveis abaixo de 20ng/mL.

Nos animais do GII, as principais lesões dermatológicas identificadas entre os animais com hipovitaminose D foram a alopecia e dermatite descamativa. Havendo uma diminuição destes sinais em animais que apresentam suficiência da vitamina. Estes sinais clínicos se relacionam a variações dos mecanismos de defesa da pele, no quais as lesões alopécicas estão relacionadas a presença de células de Langherans e queratinócitos MIIC II⁺, infiltrado de células T e parasitos na pele (Silva, 2007). Já a dermatite descamativa tem sido associada a resposta celular mediada por linfócitos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, CD45 o que pode estar relacionado a uma resposta imune mais efetiva do animal mediado por Th1 (Azevedo e Marcili, 2020).

Já na pele que apresenta lesões nodulares não houve presença de células MIIC, porém um padrão de infiltrado significativo de parasitos e macrófagos (Silva, 2007), os animais deste estudo que apresentaram hipossuficiência D não desenvolveram nódulos, porém os animais os animais que apresentaram acima de 50 ng/mL de 25 (OH)D desenvolveram, o que pode sugerir que a vitamina D não influencie no surgimento deste sinal clínico.

Na dermatite ulcerativa é encontrado histologicamente um padrão de inflamação intermediária com presença de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos (Azevedo e Marcili, 2020; Silva, 2007) nos animais estudados não houve diminuição do surgimento destes sinal clinico relacionado a suficiência da vitamina D.

A onicogrifose foi o segundo sinal clínico mais observados nos animais de GII. Tanto a onicogrifose quanto a paroníquia sofreram influência em relação a hipovitaminose D, enquanto que 100% dos animais com deficiência desenvolveram onicogrifose, apenas 38,46% dos animais com níveis séricos acima de 50ng/mL desenvolveram o sinal clínico. A onicogrifose foi o sinal mais frequente encontrado por Figueredo et al., (2014) e o segundo mais frequente de acordo com Azevedo et al., (2008) estando associado a presença do parasito e reação inflamatória local.

Nos animais infectados por *L. Infantum* sugere-se deficiência de vitamina D devido ao alto consumo da vitamina, através da ativação de células T devido ao processo inflamatório. Além destas, outras células envolvidas na imunidade como monócitos, macrófagos e células dendríticas possuem receptores VDR (Machado et al., 2020) que irão catalisar a produção de citocinas pró-inflamórias, havendo uma rápida conversão de 25(OH) na forma ativa da vitamina. (Rodriguez-Cortez et al., 2017; Zafalon, et al., 2019).

A linfadenomegalia é encontrada frequentemente entre os animais infectados, ocorrendo devido a proliferação linfoplasmohistiocitária que ocorre nos órgãos linfoides (Silva, 2007; Silva E Winck, 2018), os valores encontrados neste estudo 51,51%, sendo que 76,92% dos animais com hipovitaminose D também apresentou esse sinal, são superiores aos encontrados por Assis et al. (2010), no qual 50% dos animais apresentaram o sinal clínico, porém foi observado uma diminuição da porcentagem de animais de acordo com o aumento sérico da vitamina apenas 23,07% dos animais com níveis acima de 50ng/mL desenvolveram este sinal.

Quanto as oftalmopatias os animais que apresentaram níveis séricos da 25 (OH) D acima de 50ng/mL não desenvolveram sinais clínicos como conjuntivite e uveíte. Os animais com lesões oculares, geralmente desenvolvem um padrão inflamatório linfoplasmocítico, sendo muitas vezes encontrado o parasito na conjuntiva dos animais infectados (Eguchi et al.,2017).

Uma das principais manifestações clínicas da LVC é hepatomegalia devido a reação inflamatória granulomatosa crônica, podendo causar insuficiência hepática nos animais e como consequência diminuição da hidroxilação que ocorre no fígado através da ação da enzima citocromo P450 27A1, onde um radical OH se liga na posição 25, formando a 25-hidroxicálciferol (Silva, 2007; Weidiner e Verbrugghe, 2017).

Casanova et al. (2019) identificou através de imuno-histoquímica de trato gastrointestinal que cães com doença inflamatória intestinal (DII) podem estar infectados por *Leishmania* spp. e o trabalho de Gow et al. (2011) , demonstrou que animais com DII podem desenvolver hipoalbuminemia e baixos níveis de 25-hidroxitamina D, pois a DBP é uma globulina que pertence a superfamília das proteínas de ligação da albumina, a hipoalbuminemia é uma alteração comum em animais com leishmaniose (Motta et al., 2021) o que sugere que e o mesmo mecanismo possa causar hipovitaminose em animais com esta doença.

Devido a reação de hipergamaglobulinemia desenvolvida por animais com LVC, algumas enfermidades podem se desenvolver, como por exemplo a doença renal crônica (DRC), que é desencadeada devido a degeneração tubular, nefrite e glomerulonefrite, causada pela deposição de imunocomplexos nos rins (Silva e Winck, 2018).

A DRC, pode levar os animais a quadros de hipoparatiroidismo secundário renal, pois estes animais irão apresentar menores concentrações de metabólitos intermediários da vitamina D, devido a menor conversão de calcidiol em calcitriol, além de nos casos de proteinúria haver grande perda da proteína ligadora de vitamina D, o que pode justificar os baixos níveis séricos de vitamina D em animais com LVC associada a DRC (Silva, 2007, Silva e Winck, 2018, Peixoto et al., 2012).

Conclusão

Após avaliação dos níveis séricos de 25 (OH)D dos animais infectados por *L. infantum*, foi observado que animais com hipovitaminose D e níveis séricos até 49,99 ng/mL apresentaram maior desenvolvimento de onicogrifose.

Atualmente os modelos de estadiamento da LVC não levam em consideração a mensuração dos níveis séricos da vitamina D. Este poderia ser incluído visto que a vitamina D atua cofator em processos inflamatórios em diversos tecidos envolvidos na patogênese da LVC, além de sua relação com células do sistema inum inato e adaptativo. Sendo assim esta mensuração poderia auxiliar o clínico de pequenos animais a melhorar sua conduta e acurácia de prognóstico frente a infecção.

Para melhor relacionar a intensidade e o desenvolvimento de sinais clínicos em relação aos níveis séricos da vitamina D novos estudos são necessários para acompanhar e avaliar a variação destes níveis séricos de acordo com a progressão da doença ao longo do tempo.

Referências Bibliográficas

- ABRANTES, T.R.; WERNECK, G.L.; ALMEIDA, A.S.; FIGUEREDO, F.B. Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro. *Cadernos de saúde pública*. V. 34, 2018. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00021117>
- ALVES, F. S. Diagnóstico e tratamento das alterações de queratinização. In: *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia: Dermatologia em cães e gatos*. Editora: fundação de estudo e pesquisa em medicina veterinária e zootecnia. Minas Gerais, 2013.
- ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C.V.; NUNES, C.. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Revista Brasileira de Parasitologia*. V. 19 n 1. P.17-25. 2010.
- AVEZEDO, M.A.; DIAS, A.K.; DE PAULA, H.B. et al. Avaliação da Leishmaniose Visceral Canina em Pexoréo, estado do Mato Grosso, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. ,v. 17, n. 3, p. 123-127, 2008.
- AZEVEDO, R.C.F; MARCILLI, A. Alterações cutâneas secundárias à infecção por leishmania sp.: revisão de literatura. *Brazilian Journal of Development*. v. 6, n. 4, p.19328-19346, 2020. DOI:10.34117/bjdv6n4-195
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- DE SÁ, G. J. L. Epidemiologia da leishmaniose visceral canina em Parauapebas, Pará, Brasil. Orientador: Helcileia Dias Santos.2016 55f Dissertação (Mestrado).
- CASANOVA, M.I.; MARTÍN, S.; MARCO, A.; SOLANO-GALLEGU, L. Detection of Leishmania spp. Infection by Immunohistochemistry in Archived Biopsy Samples from Dogs with Colitis in an Area Endemic for Leishmaniosis. *Journal Comparative Pathology* V. 167, p. 12-17, 2019.
- DVIR, E.; ROSA, C.; HANDEL, I. et al. Vitamin D status in dogs with babesiosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. V. 86, n.1, 2019. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v86i1.1644>
- EGUCHI, G.U.; OLIVEIRA, G.G.; BABO-TERRA, V.J. et al. Ceratoconjuntivite nodular em um caso de leishmaniose visceral canina: Relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 69, n. 6, p. 1480-1484, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9465>
- EHRCHEN, J.; HELMING, L.; VARGA, G.; P, et al. Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with Leishmania major. *FASEB Journal*. v. 21, n.12, 2007.
- FIGUEIREDO, M. J. F. M.; SOUZA, N. F.; FIGUEREDO, H.F. et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. *Ciência animal brasileira*. v. 15, n. 1, p. 102-106, 2014.
- FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemica area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.111, p.161–173, 2003.

- FREITAS, J.C.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; NETO, B.E.L. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V. 45, n.1. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000100006>
- GOW, A.G.; ELSE, R.; EVANS, H. et al. Hypovitaminosis D in dogs with inflammatory bowel disease and hypoalbuminaemia. *Journal of Small Animal Practice*. V. 52, p. 411-418, 2011. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2011.01082.x
- MACHADO, P.A.; ESCRIVANI, D.O.; GOMES, D.C. et al. Vitamin D increases killing of intracellular *Leishmania amazonensis* *in vitro* independently of macrophage oxidative mechanisms. *Parasitology* v. 147, p.1792–1800, 2020. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001791>
- MARTORI, C.; VELEZ, R.; GÁLLEGO, M. et al. Vitamin and leishmaniasis: Neither seasonal nor risk factor in canine host but potential adjuvant treatment through *cbd103* expression. *PLOS Neglected tropical diseases*. V.15, n. 8, 2021 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009681>
- MOREIRA, N. B.; PINTO, A. Z. L.; MUTZEMBERG, E. R., et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos dermatológicos e dermatoses associadas. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44, 1–4, 2016.
- MOTTA, L.M.; EBERT, K.G.; BATISTA, K.Z.S. Diagnóstico imunológico e molecular da Leishmaniose Visceral Canina: Revisão. *Pubvet Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.15, n.08, p.1-7, 2021.
- Nachreiner, R. F., Refsal, K. R.; Rick, M., et al. Endocrinology reference ranges. *Diagnostic Center for Population & Animal Health*, Michigan State University, Lansing, Michigan, United States of America, 2014.
- NAVEDA, L. A. B.; MOREIRA, E.C.; MACHADO, J.G.; et al.. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. *Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.58, n.6, p.988-993, 2006.
- ORDEIX, L.; DALMAU, A.; OSSO, M. et al. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. V. 10, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2051-6>
- PEIXOTO, P.V.; KLEM, M.A.P.; FRANÇA, T.N.; NOGUEIRA, V.A. Hipervitaminose D em animais. *Pesquisa veterinária brasileira*. V. 32, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700001>
- QUINTAVALLA, F.; BASINI, G.; BUSSOLATI, S. et al. Redox Status in Canine Leishmaniasis. *Animals*, v. 11, 119. <https://doi.org/10.3390/ani11010119>

- RODRIGUEZ-CORTEZ, A.; MARTORI, C.; MARTINEZ-FLOREZ, A. et al. Canine Leishmaniasis Progression is Associated with Vitamin D Deficiency. *Scientific Reports*. V. 7, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-03662-4
- ROMBOLÀ, P.; BARLOZZARI, G.; CARVELLI, A. et al. Seroprevalence and risk factors associated with exposure to *Leishmania infantum* in dogs, in an endemic Mediterranean region. *PLoS ONE*. v.16, n.1, 2021. e0244923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244923>
- RONCHI FC, SONAGLI M, RONCHI MGC. Prevalência de Hipovitaminose D em população de consultório médico. *Revista Medicina e Residência, Curitiba*. v.14, n.3, p. 173-180, 2012.
- ROSA CT, SCHOEMAN JP, BERRY JL, et al. Hypovitaminosis D in dogs with spirocercosis. *Journal Veterinary Intern Medicine*. V. 27, n.5, p.1159-1164, 2013. doi:10.1111/jvim.12161
- ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral canina: atualizações no diagnóstico, controle e prevenção. *Pet Journal CEVA*. 2018.
- SALES, D.P.; CHAVES, D.P.; MARTINS, N. S.; SILVA, M.I.S. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina e Humana no estado do Maranhão, Brasil (2009-2012)*. *Revista brasileira de Ciencia Veterinária*., v. 24, n. 3, p. 144-150, 2017.
- SCHIMMING, B.C.; J.R.C. PINTO E SILVA. Leishmaniose visceral canina- Revisão de literatura. *Revista eletrônica de medicina veterinária*. N. 19, 2012.
- SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*. V.1. p.20, 2007.
- SILVA, C. M. H. S.; WINCK, C. A. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. *Revista Da Universidade Vale Do Rio Verde*. V. 16, n. 1, p. 1–12, 2018.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011.
- ZAFALON, R. V.A.; RISOLIA, L.W.; PEDRINELLI, V. et al. Vitamin D metabolism in dogs and cats and its relation to diseases not associated with bone metabolism. *Journal Animal Physiology Animal Nutrition*. N.104, p.322–342,2020
- WEIDNER, N., e VERBRUGGHE, A. Current knowledge of vitamin D in dogs. Critical reviews. *Food science and nutrition*, V.57, p.3850–3859, 2017. 10.1080/10408398.2016.1171202