

INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA PRESENÇA DE *LEISHMANIA INFANTUM* EM CÃES E POTENCIAL ANTI-LEISHMANIA DE EXTRATOS VEGETAIS

TÁBATA PEREIRA DIAS¹; RENATA MARQUES PIEROBOM GRESSLER²;
GABRIELA LADEIRA SANZO²; CAMILA CONTE²; LUCIANA AQUINI
FERNANDES GIL²; MARLETE BRUM CLEFF³

¹Universidade Federal de Pelotas 1 – tabata_pd@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – renatagressler@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – sanzogabi@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – camilaconte2@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - lafgil@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marletecleff@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença endêmica em países tropicais e subtropicais (MS/SVS/DVE, 2006), sendo causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp. Nas Américas, *Leishmania infantum* é o principal agente etiológico (MS/SVS/DVE, 2006), transmitido por meio da picada de flebotomíneos infectados, com destaque para *Lutzomyia longipalpis*. Esta antropozoonose, foi considerada inicialmente como de transmissão silvestre, ocorrendo principalmente em ambientes rurais, atualmente expandiu-se para áreas periurbanas e urbanas, possivelmente devido a urbanização sem planejamento em áreas de mata, associada a falta de saneamento básico que fornece condições para sobrevivência do flebotomíneo (COSTA, 2011). Assim, a leishmaniose tem sido reconhecida como um problema de saúde pública e encontra-se em franca expansão geográfica, além de ser considerada uma enfermidade negligenciada.

Segundo dados da nota informativa do Centro Estadual em Vigilância da Saúde do Rio Grande do Sul (CEVS/RS), publicada em 2017, até o ano de 2008, as áreas de transmissão de LV não incluíam a região sul. Em janeiro de 2009, a Secretaria Estadual da Saúde - SES/RS notificou o primeiro caso autóctone confirmado de leishmaniose visceral humana (LVH) no município de São Borja. O município de Uruguaiana confirmou o primeiro caso humano em 2011, e Itaqui em 2012. No ano de 2016, o município de Porto Alegre registrou o primeiro caso de LVH, totalizando, até o momento, cinco casos, com 4 óbitos. Em 2017, confirmou-se o primeiro caso de LVH em Viamão, evoluindo para cura.

No RS, no período de 2008 a 2017 foram confirmados 23 casos de LVH, e outros dois casos alóctones foram registrados no município de Esteio em 2008 e em Nova Petrópolis em 2010 (CEVS/RS). A partir do ano de 2017, ocorreram os primeiros casos autóctones da doença em cães, em humanos e o primeiro registro do vetor no estado, passando o Rio Grande do Sul a ser considerado como área de transmissão (CEVS/RS). No Rio Grande do Sul, os municípios onde foram relatados casos de transmissão em canídeos foram Barra do Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja, Porto Xavier, Santa Cruz do Sul, Porto Alegre e Viamão (CEVS/RS).

O cão é um importante elo na transmissão da doença, devido a atuar como reservatório. Assim, o vetor se contamina com o protozoário ao se alimentar do sangue do animal, e depois ao picar uma pessoa ou outro cão, transmite o parasita (FERREIRA, 2017). Geralmente, os casos caninos precedem os casos

humanos, porque os cães apresentam uma maior quantidade de parasitos no tegumento comparado ao homem, o que favorece a infestação por vetores.

Assim, os objetivos do presente projeto incluem investigar a presença de cães soropositivos e estabelecer a presença de infecção autóctone por *Leishmania infantum* no município de Pelotas, bem como avaliar o conhecimento da população atendida, Veterinários e estudantes de veterinária sobre a doença e verificar a susceptibilidade de *Leishmania* spp. a extratos vegetais e associações, justificado por existirem poucas drogas disponíveis para o tratamento humano e veterinário para a doença.

2. METODOLOGIA

Inicialmente, as amostras de sangue serão provenientes de animais que são atendidos pelo setor de clínicas do Ambulatório Veterinário e HCV da Universidade Federal de Pelotas.

Todas as amostras de sangue serão processadas no Laboratório de Patologia Clínica da FaVet - UFPel, pela técnica de centrifugação para separação do soro, sendo centrifugadas a 4.000 rpm e o soro armazenado -4°C. Após, será feita a análise pelo exame sorológico *Dual-Path Platform* (DPP®) validado pelo Ministério da Saúde (FIGUEIREDO et al., 2018) para inquéritos soroepidemiológicos por ter alta sensibilidade e especificidade. Trata-se de um teste cromatográfico para detectar anticorpos anti-leishmania nos soros dos animais através de um antígeno quimera do parasito rK28, teste rápido DPP® cedido pela Fiocruz.

Considerando uma sensibilidade de 89% e especificidade de 70% do DPP®, com uma prevalência de 2% e uma chance de erros tipo I e II $<0,05$, estabeleceu-se número amostral mínimo de 400 soros (SERGEANT, 2019).

Caso durante o estudo forem detectados soros positivos, o que é indicativo de presença de infecção por *Leishmania infantum*, será imediatamente notificado aos órgãos responsáveis (Secretaria Municipal de Saúde), realizada biópsia de órgãos como pele, linfonodos e baço para realização da contra-prova que consiste nos testes sorológico (ELISA) e/ou exame molecular através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para confirmação de diagnóstico e mensuração da carga parasitária. As coletas serão realizadas pela Equipe de Referência em Leishmaniose da Região Sul (Fiocruz-PR).

Para realizar a avaliação do conhecimento sobre a leishmaniose de graduandos do curso de medicina veterinária e veterinários da região de Pelotas, será confeccionado um questionário epidemiológico que conterá perguntas referentes à enfermidade. Esse questionário poderá ser entregue aos graduandos na forma impressa ou virtual (formulários Google), sendo necessário caracterizar o semestre atual do aluno participante, para que seja possível saber se o conhecimento acerca da doença é maior, menor ou igual dependendo do semestre que o aluno estiver cursando. Além disso, será necessário que o participante se identifique e autorize a utilização das suas respostas de forma anônima.

Para a avaliação do conhecimento sobre a leishmaniose com os tutores atendidos no HCV-FV-UFPel, será confeccionado um questionário epidemiológico que conterá perguntas referentes à enfermidade quanto ao conhecimento da existência, entendimento de formas de transmissão e conceitos como zoonose. Os resultados dos questionários epidemiológicos serão analisados pelo teste do Qui-quadrado, sendo utilizado o software Statistix 9.0 em ambos os casos.

Os extratos testados frente a isolados do protozoário serão preparados com folhas secas das plantas adquiridas de distribuidor comercial com laudo de certificação botânica e encaminhados para o Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), para a preparação dos extratos aquosos, etanólico e óleo essencial de acordo com as normas da Farmacopéia Brasileira IV (Farmacopéia Brasileira IV, 1988).

O material vegetal será submetido à extração com arraste de vapor em Clevenger, para obtenção do óleo essencial (Farmacopéia Brasileira IV, 1988), que posteriormente, será seco com sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração, até a utilização nos testes.

Para a preparação do extrato etanólico, será realizado o método de maceração. Assim, os frutos triturados serão misturados com 250 mL de etanol (solvente), sendo homogeneizados diariamente por sete dias. Após, o extrato será filtrado com papel filtro estéril e, em seguida, será adicionado 250 mL de etanol no extrato obtido. Depois de repetir esse processo três vezes, o solvente será evaporado em rotaevaporador.

Ao término dos processos, todos os extratos (óleos essenciais, aquosos e etanólico) serão armazenados em frascos protegidos da luz, sendo o óleo mantido em freezer, enquanto os extratos aquosos e etanólico serão congelados em ultrafreezer a -70°C para realização de liofilização dos mesmos e mantidos em freezer até serem utilizados nos testes.

Os compostos bioativos dos óleos essenciais serão identificados por cromatografia a gás acoplada a detector de massas (GC/MS-QP 2010SE-Shimadzu, Japão), equipado com auto injetor AOC-20i. As quantificações serão feitas por área normatizada e as identificações dos compostos pelo espectrômetro de massas, utilizando a biblioteca NIST 8 do GC/MS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante da importância de se manter uma vigilância nos animais de regiões peri-endêmicas e devido a leishmaniose se caracterizar como uma zoonose de impacto na saúde pública, sendo caracterizada como uma enfermidade negligenciada, estudos relacionados a esta parasitose são de grande relevância. A realização de inquéritos sorológicos caninos (amostrais ou censitários), além de sua função de controle do reservatório canino em extensas áreas, tem papel fundamental na detecção de focos silenciosos da doença e na delimitação de regiões ou setores de maior prevalência, onde a execução das medidas de controle se faz necessária (JULIÃO et al., 2007).

Em 2011, foi realizado por Hirschmann e colaboradores, um levantamento da presença de cães soropositivos em área indene do RS, especificamente até os municípios da fronteira oeste do estado. Nessa pesquisa, foi possível identificar a presença de cães soropositivos em Rio Grande, cidade limítrofe de Pelotas, servindo de alerta e incentivo para a realização de pesquisas sorológicas em cães desta região, uma vez que mudanças climáticas tem contribuído para o aumento da dispersão dos vetores e, consequentemente a ocorrência de casos autóctones, já sendo identificada inclusive a doença em humanos.

Diversas doenças originadas por protozoários têm sido estudadas em busca de alternativas terapêuticas, sendo que observa-se a participação de plantas para busca de novos tratamentos, incluindo testes contra diferentes espécies de *Leishmania* spp. (VILA-NOVA et al., 2011).

Atualmente, o tratamento e controle da leishmaniose em humanos e cães, a qual temos disponíveis, vêm mostrando-se aquém das expectativas, o que vêm gerando grande interesse no ramo científico na busca de alternativas viáveis no combate da enfermidade ou interferência no ciclo do agente. Como outras enfermidades negligenciadas, recursos escassos estão disponíveis para combater esta doença, bem como o número e a eficácia de fármacos atualmente utilizados para o seu tratamento são limitados (CROFT, SEIFERT & YARDLEY, 2006).

A Miltefosina, inicialmente desenvolvida como uma droga para ser usada no tratamento do câncer, é o último fármaco leishmanicida a entrar no mercado e, a primeira que permite um tratamento oral de leishmaniose visceral em cães, porém cepas resistentes de *Leishmania infantum* já foram isoladas, além de grande preocupação sobre seu potencial teratogênico e o tempo de meia-vida da droga, que pode estimular o surgimento de resistência (BRYCESON, 2001).

4. CONCLUSÕES

As hipóteses do trabalho incluem a confirmação de caso autóctone de leishmaniose em cães de Pelotas e região, assim como constatar através dos questionários que o conhecimento dos veterinários, estudantes de veterinária e população acerca da doença é escasso até o momento e, que há eficácia de extratos vegetais anti-leishmania com baixa toxicidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRYCESON, A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Tropical medicine & international health*, v. 6, n. 11, p. 928-934, 2001.
- COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.44, n.2, p.232-242, 2011.
- CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *The Indian journal of medical research*, v. 123, n. 3, p. 399-410, 2006.
- FERREIRA, M. U. *Parasitologia contemporânea*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- FIGUEIREDO, F. B., VASCONCELOS, T. C. B. D., MADEIRA, M. D. F., et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 11, p. 1-7, 2018.
- HIRSCHMANN, L. C. SIMON, C. F., BROD, C. S., RADIN, J. R. et al. Clinical and hematological evaluation of leishmaniasis serum-positive dogs in Rio Grande do Sul. *Science And Animal Health*, Pelotas, v. 4, n. 2, p. 179-197, 2016.
- JULIÃO, F.S. SOUZA, B.M.P.S. FREITAS, D.S. et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, p. 319-324, 2007.
- Nota sobre Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral Humana no RS. Acessado em 17 de novembro de 2017: <https://cevs.rs.gov.br/leishmaniose-visceral-humana> (CEVS/RS).
- SERGEANT, E., 2019. EpiTools epidemiological calculators. Acessado em 30 mar. 2019 Disponível em: <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=home>.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu. Parte 11,11.1-3, 1996.
- VILA-NOVA, N. S. et al. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonaceae species cultivated in Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 5, p. 567-571, 2011.
- MS/SVS/DVE-Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, p.120, 2006.